

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-
Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Expression von microRNA-21 im in vitro Modell bei vier
Plattenepithelkarzinom-Zelllinien der Kopf-Hals-Region nach singulärer
Gammabestrahlung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Christoph Kroschke
aus Nürtingen

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Dr. M. Moergel

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Dr. K. Sagheb

Tag der Promotion: 06.07.2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| Abbildungsverzeichnis..... | IX |
| Tabellenverzeichnis..... | XI |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 2. Literaturdiskussion | 3 |
| 2.1. Das Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Hals-Bereiches | 3 |
| 2.1.1. Epidemiologie..... | 3 |
| 2.1.2. Ätiologie | 3 |
| 2.1.3. Pathogenese | 4 |
| 2.1.4. Präkanzerose | 6 |
| 2.1.4.1. Leukoplakie | 6 |
| 2.1.4.2. Erythroplakie | 7 |
| 2.1.5. Klassifikation | 7 |
| 2.1.5.1. Karzinome der Lippen und der Mundhöhle | 9 |
| 2.1.5.2. Karzinome des Oropharynx..... | 10 |
| 2.1.6. Therapie..... | 13 |
| 2.1.6.1. Chirurgische Therapie..... | 13 |
| 2.1.6.2. Radiotherapie..... | 15 |
| 2.1.6.2.1. Dosis | 17 |
| 2.1.6.3. Nebenwirkungen | 18 |
| 2.2. microRNA und ihre Bedeutung..... | 20 |
| 2.2.1. Allgemeine biochemische Grundlagen | 20 |
| 2.2.2. Der Weg zur Entdeckung der microRNA..... | 21 |
| 2.2.3. RNA-Interferenz und die ersten microRNAs | 22 |
| 2.2.4. microRNA Biogenese | 23 |

| | |
|--|----|
| 2.2.4.1. Transkription der DNA der microRNA | 23 |
| 2.2.4.2. Cleavage der pri-microRNA | 24 |
| 2.2.4.3. Verlassen der pre-microRNA des Nukleus..... | 24 |
| 2.2.4.4. Die zytoplasmatische Reifung der microRNA durch Dicer | 24 |
| 2.2.5. Funktion der microRNA | 25 |
| 2.2.5.1. microRNA im RNA induced silencing complex..... | 25 |
| 2.2.5.2. mRNA Degradation oder mRNA Speicherung in P-Bodies | 26 |
| 2.2.5.3. Inhibition der ribosomalen Translation | 27 |
| 2.2.5.4. Gene Silencing durch RISC | 27 |
| 2.2.5.5. Regulatorische Eigenschaften..... | 27 |
| 2.2.5.6. microRNA und DNA – Gegenseitige Steuerung..... | 28 |
| 2.2.5.7. Einfluss von microRNAs auf die Apoptoseproteine p53, p63 und p73 | 29 |
| 2.2.5.8. Die p53 Familie: Zusammenarbeit und Konkurrenz in epitheliale Krebs | 29 |
| 2.2.5.9. microRNA abhängige Regulation in Karzinomen und die p53 Familie | 30 |
| 2.2.5.9.1. p53 ist ein Regulator des microRNA Processing Komplexes | 32 |
| 2.2.5.9.2. p63 ist ein Regulator des microRNA Processing Komplexes | 32 |
| 2.2.5.9.3. p73 ist ein Regulator des microRNA Processing Komplexes | 33 |
| 2.2.5.9.4. Interaktion von p63/ Δ Np63 mit microRNA-21..... | 33 |
| 2.2.5.9.5. Induzierte Chemoresistenz durch p63/p73 Feed-Forward Regulierung . | 34 |
| 2.2.6. microRNA und orale Plattenepithelkarzinome..... | 34 |
| 2.2.6.1. Gründe für veränderte microRNA Expressionsmuster | 34 |
| 2.2.6.2. Die Auswirkung einer erhöhten intrazellulären microRNA Expression | 34 |
| 2.2.6.3. Die Auswirkung einer verminderten intrazellulären microRNA Expression | 35 |
| 2.2.6.4. microRNAs und Metastasierung im Karzinom des Kopf- und Hals- Bereiches | 35 |
| 2.2.6.5. microRNA-21 und ihre Bedeutung für die Apoptose | 36 |
| 2.2.6.6. Alteriertes Expressionsniveau von microRNA-21 in unterschiedlichen malignen Karzinomen | 37 |

| | |
|---|----|
| 2.2.6.6.1. Mammakarzinom..... | 37 |
| 2.2.6.6.2. Glioblastoma multiforme..... | 37 |
| 2.2.6.6.3. Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Hals-Bereiches | 37 |
| 2.3. Fragestellung | 38 |
| 3. Materialien und Methodik | 39 |
| 3.1. Materialien | 39 |
| 3.1.1. Laborgeräte..... | 39 |
| 3.1.2. Software | 40 |
| 3.1.3. Chemikalien | 40 |
| 3.1.4. Verbrauchsmaterial | 41 |
| 3.1.5. Zelllinien..... | 41 |
| 3.1.6. Oligonukleotide | 42 |
| 3.1.6.1. Primer für microRNA real-time PCR..... | 42 |
| 3.1.6.2. Oligosequenzen der siRNA für microRNA-21 Transfektion der Zelllinien . | 42 |
| 3.1.7. Fertigsätze (Kits) | 42 |
| 3.2. Methodik | 43 |
| 3.2.1. Zellkultur | 43 |
| 3.2.2. Zellkultur aufteilen | 44 |
| 3.2.3. Zellen zählen und auf Petrischalen verteilen..... | 45 |
| 3.2.4. Bestrahlung..... | 45 |
| 3.2.5. microRNA Isolation | 45 |
| 3.2.6. Isolieren von mRNA | 47 |
| 3.2.7. Konzentrationsbestimmung Nukleinsäuren..... | 47 |
| 3.2.8. Reverse Transkription | 48 |
| 3.2.8.1. Reverse Transkription der microRNA..... | 48 |
| 3.2.8.2. Reverse Transkription der mRNA | 48 |
| 3.2.9. Quantitative real-time PCR von microRNA und mRNA | 48 |
| 3.2.9.1. PCR der microRNA..... | 48 |

| | |
|--|----|
| 3.2.9.2. PCR der mRNA..... | 51 |
| 3.2.10. Caspase 3/7 Assay | 52 |
| 3.2.11. WST-1 Assay | 52 |
| 3.2.12. Transfektion | 53 |
| 3.2.13. Statistische Analyse | 55 |
| 4. Ergebnisse | 56 |
| 4.1. Expression von microRNA-21 in den Zellreihen PCI-1, -13, -52, SCC-68 ohne Bestrahlung..... | 56 |
| 4.2. Expression von microRNA-21 in den Zellreihen PCI-1, -13, -52, SCC-68 unter Bestrahlung..... | 58 |
| 4.3. Caspaseaktivität mit und ohne Bestrahlung | 62 |
| 4.3.1. Caspaseaktivität der Zellreihe PCI-1 mit und ohne Bestrahlung | 63 |
| 4.3.2. Caspaseaktivität der Zellreihe PCI-13 mit und ohne Bestrahlung | 64 |
| 4.3.3. Caspaseaktivität der Zellreihe PCI-52 mit und ohne Bestrahlung | 65 |
| 4.3.4. Caspaseaktivität der Zellreihe SCC-68 mit und ohne Bestrahlung..... | 66 |
| 4.3.5. Caspaseaktivität der humanen oralen Keratinozyten mit und ohne Bestrahlung..... | 67 |
| 4.4. Caspaseaktivität mit und ohne Bestrahlung in transfizierten Zellen | 68 |
| 4.4.1. Caspaseaktivität der Zellreihe PCI-1 mit und ohne Bestrahlung in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen..... | 68 |
| 4.4.2. Caspaseaktivität der Zellreihe PCI-52 mit und ohne Bestrahlung in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen..... | 69 |
| 4.5. Zellviabilität mit und ohne Bestrahlung in transfizierten Zellen..... | 70 |
| 4.5.1. Zellviabilität der Zellreihe PCI-1 mit und ohne Bestrahlung in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen | 70 |
| 4.5.2. Zellviabilität der Zellreihe PCI-52 mit und ohne Bestrahlung in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen | 72 |
| 4.6. Einflussfaktoren auf die Apoptose..... | 73 |
| 4.6.1. Einflussfaktor Zeit auf die Apoptose..... | 75 |

| | |
|--|-----|
| 4.6.2. Einflussfaktor Bestrahlung auf die Apoptose..... | 75 |
| 4.6.3. Einflussfaktor Zelltyp auf die Apoptose | 75 |
| 4.6.4. Einflussfaktor microRNA-21 Expression auf die Apoptose..... | 75 |
| 5. Diskussion..... | 77 |
| Ausblick..... | 83 |
| Zusammenfassung..... | 84 |
| Anhang..... | 85 |
| Literaturverzeichnis | 86 |
| Danksagung | 123 |
| Tabellarischer Lebenslauf | 124 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|-------------------------------------|
| Ago2 | Argonaute 2 |
| Bcl-2 | engl. B-cell lymphoma 2 |
| bp | Basenpaare |
| °C | Grad Celsius |
| CDK | engl. cyclin dependent kinase |
| cDNA | engl. complementary DNA |
| C. elegans | Caenorhabditis elegans |
| DGCR8 | engl. DiGeorge critical region 8 |
| DNA | engl. desoxyribonucleic acid |
| DND1 | engl. dead end 1 |
| EMT | epitheliale mesenchymale Transition |
| Exp5 | Exportin-5 |
| FOXO3 | Forkhead-Box-Protein O3 |
| g | Erdanziehungskraft |
| GRD | Gesamtdosis |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| Gy | Gray |
| HiF | Hypoxie induzierender Faktor |
| HOK | humane orale Keratinozyten |
| HPV | humanes Papillomavirus |
| IMRT | Intensitätsmodulierte Radiotherapie |
| L | Liter |
| m | Meter |
| min | Minute |

| | |
|-------------------|---|
| min ⁻¹ | Umdrehung/Minute |
| μl | Mikroliter |
| ml | Mililiter |
| MMP1 | Metalloproteinase 1 |
| mRNA | engl. messengerRNA |
| n | nano |
| nt | Nukleotide |
| p | piko |
| PCI | engl. Pittsburgh Cancer Institute |
| PKM2 | engl. pyruvate kinase type M2 |
| pri-microRNA | engl. primary microRNA |
| RISC | engl. RNA induced silencing complex |
| RNA | engl. ribonucleic acid |
| ROCK | engl. Rho associated coiled-coil containing protein kinase |
| qPCR | real time Polymerasekettenreaktion |
| s | Sekunde |
| SCC | engl. squamosa cell carcinoma |
| si-microRNA | engl. short interfering microRNA |
| siRNA | engl. short interfering RNA |
| TPM1 | Tropomyosin 1 |
| TRBP | engl. human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein |
| UICC | franz. Union internationale contre le cancer |
| UTR | untranslatierte Region |
| WST-1 | engl. water soluble tetrazolium |

5-FU

5-Fluoruracil

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1 Reifung der microRNA-21 | 25 |
| Abbildung 2 Einfluss von microRNA auf das Apoptosesystem..... | 26 |
| Abbildung 3 Interaktion und Abhängigkeit zwischen microRNA und den Apoptoseproteinen p63 und p73 | 31 |
| Abbildung 4 Versuchsaufbau zur Bestimmung der microRNA-21 Expression unter Bestrahlung | 43 |
| Abbildung 5 Anzüchten der Zellen über 5 Tage | 44 |
| Abbildung 6 Bestrahlung der Zellen mit 6 Gy γ -Strahlung..... | 45 |
| Abbildung 7 96 well plate mit cDNA | 50 |
| Abbildung 8 Schematische Darstellung der 96 well plate für eine qPCR der microRNA-21 Expression | 50 |
| Abbildung 9 Transfektion von siRNA, Bestimmung der Caspaseaktivität der transfizierten Zellen | 55 |
| Abbildung 10 Expression von microRNA-21 in PCI-1..... | 56 |
| Abbildung 11 Expression von microRNA-21 in PCI-13..... | 57 |
| Abbildung 12 Expression von microRNA-21 in PCI-52..... | 57 |
| Abbildung 13 Expression von microRNA-21 in SCC-68 | 58 |
| Abbildung 14 Expression von microRNA-21 in PCI-1 mit Applikation von ionisierender Strahlung | 59 |
| Abbildung 15 Expression von microRNA-21 in PCI-13 mit Applikation von ionisierender Strahlung | 59 |
| Abbildung 16 Expression von microRNA-21 in PCI-52 mit Applikation von ionisierender Strahlung | 60 |
| Abbildung 17 Expression von microRNA-21 in SCC-68 mit Applikation von ionisierender Strahlung | 60 |
| Abbildung 18 Expression von microRNA-21 in HOK ohne Applikation von ionisierender Strahlung | 61 |
| Abbildung 19 Expression von microRNA-21 in HOK mit Applikation von ionisierender Strahlung..... | 61 |
| Abbildung 20 Caspaseaktivität der Karzinomzellen PCI-1, -13, -52 und SCC-68 mit/ohne Applikation von ionisierender Strahlung..... | 62 |
| Abbildung 21 Caspaseaktivität in PCI-1 mit/ohne Applikation ionisierender Strahlung | 63 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 22 Caspaseaktivität in PCI-13 mit/ohne Applikation ionisierender Strahlung | 64 |
| Abbildung 23 Caspaseaktivität in PCI-52 mit/ohne Applikation ionisierender Strahlung | 65 |
| Abbildung 24 Caspaseaktivität in SCC-68 mit/ohne Applikation ionisierender Strahlung | 66 |
| Abbildung 25 Caspaseaktivität in HOK mit/ohne Applikation ionisierender Strahlung | 67 |
| Abbildung 26 Caspaseaktivität in transfizierter PCI-1 mit/ohne Applikation von ionisierender Strahlung | 68 |
| Abbildung 27 Caspaseaktivität in transfizierter PCI-52 mit/ohne Applikation von ionisierender Strahlung | 69 |
| Abbildung 28 WST-1, Zellviabilität in transfizierter PCI-1 | 71 |
| Abbildung 29 WST-1, Zellviabilität in transfizierter PCI-52 | 72 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1 TNM-Klassifikation der Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches (außer CUP) .9 | 9 |
| Tabelle 2 TNM-Klassifikation der Karzinome der Lippen und der Mundhöhle | 9 |
| Tabelle 3 UICC Einteilung für Karzinome der Lippen und der Mundhöhle | 10 |
| Tabelle 4 Tumorausdehnung und Lymphknotenbefall bei p16 negativen Oropharynxkarzinomen | 11 |
| Tabelle 5 Tumorausdehnung und Lymphknotenbefall bei p16 positiven Oropharynxkarzinomen | 11 |
| Tabelle 6 UICC-Klassifikation für p16 negative Oropharynxkarzinome | 12 |
| Tabelle 7 UICC-Klassifikation für p16 positive Oropharynxkarzinome | 12 |
| Tabelle 8 Einteilung der Lymphknotenregionen nach Robbins..... | 14 |
| Tabelle 9 Entfernung der Lymphknoten bei der selektiven Neck-Dissection | 15 |
| Tabelle 10 Therapieprotokoll der primären simultanen Radiochemotherapie und der Radioimmuntherapie | 18 |
| Tabelle 12 Logarithmisierte Apoptose | 73 |
| Tabelle 13 Unifaktorielle ANOVA der linearen Regression | 74 |
| Tabelle 14 Signifikanz der Einflussgrößen auf die Caspaseaktivität | 76 |

1. Einleitung

Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich sind für die Betroffenen auf Grund ihrer Lokalisation im Rachenraum, in der Mundhöhle, der Zunge und an den Lippen häufig mit einer funktionellen Einschränkung sowie einer starken psychischen Belastung verbunden. Daraus resultiert eine deutliche Beeinträchtigung der Lebensqualität (Johnson et al. 2011). Es besteht daher für den individuell betroffenen Patienten, aber auch auf Grund ihrer Häufigkeit von ca. drei bis vier Prozent an der Anzahl aller malignen Tumore, für die Gesellschaft als Gesamtes ein Interesse die Diagnostik- und Therapieoptionen zu verbessern (Probst et al. 2008; Rivera 2015). In der prätherapeutischen Diagnostik werden zunehmend Biomarker verwendet, da sich Tumore unter anderem nach ihrem genetischen Profil oder nach der Expression molekularbiologischer Stoffwechselprodukte unterscheiden lassen (Gasparri et al. 2018; Musolino et al. 2007; Orphanos und Kountourakis 2012; Kruijff und Hoekstra 2012). Dahinter steht das Ziel die Therapie für den einzelnen Betroffenen zu optimieren (Dienstmann und Tabernero 2011; Lamparella et al. 2013; Ludwig und Weinstein 2005). Für das Mundhöhlenkarzinom besteht die Therapie in der Hauptsache aus den drei Pfeilern einer chirurgischen Resektion, der Bestrahlungstherapie und ggf. einer Chemotherapie (AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. und Deutsche Krebshilfe e.V. 2012). Da Bestrahlungs- und Chemotherapie in die Zellteilung und den Stoffwechsel der malignen Zelle eingreifen, gilt diesen Mechanismen ein großes Interesse und sind daher Gegenstand intensiver Forschung. Prinzipiell haben beide Therapieansätze das Ziel durch erzeugte DNA-Schäden die Apoptose der Karzinomzelle zu induzieren. Voraussetzung ist eine intakte intrinsische Kaskade der Apoptose (Shao et al. 2018; Ramalingam et al. 2018; Seitz et al. 2010; Luqmani 2005; Liu et al. 2017; Crowther et al. 2016; Benard et al. 2014). Daher lohnt ein Blick auf die intrazellulären Genregulatoren, zu denen unter anderem auch microRNAs (micro-Ribonucleic acid) gehören. MicroRNAs sind kurze RNA-Fragmente, die eine wichtige Rolle als Genregulatoren auf transkriptioneller Ebene spielen (Lee et al. 2004a; Wu et al. 2011). Bis heute wurden mehr als 38.000 microRNAs entdeckt (Kozomara und Griffiths-Jones 2014, 2011; Griffiths-Jones et al. 2008; Griffiths-Jones et al. 2006; www.mirbase.org) (Stand März 2018). Ihre Expressionsmuster unterscheiden sich je nach Gewebetyp und Entwicklungsstadium der Zelle (Zhang et al. 2009b). Sie interagieren über die 3'-UTR (untranslatierte Region) Bindestelle von Proteinen und messenger RNA (mRNA). Stimmt die 3'-UTR

Bindestelle der mRNA komplett mit der entsprechenden Domäne der microRNA überein, so führt dies zur Degradation der mRNA. Existiert nur eine unvollständige Übereinstimmung wird die entsprechende mRNA blockiert und somit die Translation der Proteinbiosynthese gehemmt (Lee et al. 2004a; Wu et al. 2011).

Durch DNA-Mutationen sowie epigenetische Veränderungen kommt es häufig zur Ausbildung eines Karzinoms, welches eine Alteration in der Expression von microRNAs verursachen kann (Cowland et al. 2007). Bisher wurde gezeigt, dass ein verändertes microRNA Expressionsmuster in Krebszellen deren Fähigkeit der Proliferation, der Metastasierung, der Resistenz beziehungsweise der Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika und auch gegenüber ionisierender Strahlung beeinflusst (Lynam-Lennon et al. 2009; Lo et al. 2011; Yu et al. 2010). Veränderungen durch ionisierende Strahlung, die durch microRNAs vermittelt werden, wurden bereits für verschiedene Malignomtypen nachgewiesen, darunter Prostatakarzinom, Lungenkarzinom, Glioblastom und Karzinome des Kopf- und Halsbereiches (Lynam-Lennon et al. 2009; Lo et al. 2011; Zhang et al. 2007; Gomes und Gomez 2008).

In der vorliegenden Promotionsarbeit wird daher im invitro Zellexperiment der Frage nachgegangen, ob die Expression von microRNA-21 die Sensitivität von Plattenepithelkarzinomzelllinien gegenüber ionisierender Strahlung beeinflusst. Vier Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region werden hierbei in ihrem Expressionsprofil zu einer humanen Keratinozytenzelllinie verglichen. Der Einfluss von microRNA-21 auf verschiedene Enzyme der Apoptosekaskade wird ebenfalls untersucht. Die vorgelegte Arbeit möchte hierdurch einen Beitrag zum Verständnis der unterschiedlichen Strahlenresistenz von Karzinomen des Kopf- Hals-Bereiches liefern.

2. Literaturdiskussion

2.1. Das Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Hals-Bereiches

2.1.1. Epidemiologie

Sowohl Tumore der Mundhöhle als auch Tumore des Oropharynx und des Hypopharynx sind in ihrer überwiegenden Mehrheit (annähernd 95 %) Plattenepithelkarzinome (Probst et al. 2008; Rivera 2015; Lingen et al. 2008; Warnakulasuriya 2009; Scully et al. 1997). An der Gesamtzahl aller malignen Tumore auf dem europäischen Kontinent machen orale Plattenepithelkarzinome ca. drei bis vier Prozent aus (Probst et al. 2008; Rivera 2015). Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen 60 und 70 Jahren (Argiris et al. 2008; Argiris und Eng 2003), wobei Männer im Vergleich zu Frauen früher erkranken (63 zu 66 Jahre). Des Weiteren sind sie um den Faktor zwei bis drei häufiger betroffen als Frauen (Rivera 2015). Als dominierender Faktor wird der häufigere Alkohol- und Tabak-Konsum von Männern vermutet (Ebhardt et al. 2018, S. 38). Während in den vergangenen Jahren bei Männern die standardisierte Erkrankungs- sowie Sterberate rückläufig waren, verblieb sie bei Frauen konstant (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2019, S. 24).

2.1.2. Ätiologie

Genetische Alterationen, die zur Ausbildung eines Karzinoms des Kopf- und Hals-Bereiches führen, finden sich zum einen in der Inaktivierung sogenannter Tumorsuppressorgene. Dazu gehören die verschiedenen Arten von Mutation (Punktmutation, Deletionsmutation, Insertionsmutation, Duplikationsmutation), epigenetische Modifizierung durch DNA-Methylierung oder der Verlust der Heterozygotie (Ebhardt et al. 2018, S. 39). Zum anderen kann durch die Aktivierung von Onkogenen durch Genamplifikation und einer erhöhten Transkription das Wachstum eines Karzinoms initiiert werden (Ebhardt et al. 2018, S. 39). Die Ursache für diese Veränderungen finden sich für Plattenepithelkarzinome vor allem im Genuss von Alkohol und Tabak, wobei hier die wechselseitige Potenzierung des Erkrankungsrisikos hervorsteht (zwei bis viermal erhöhtes Risiko bei alleinigem Tabakkonsum, 6-15 mal erhöhtes Risiko bei kombiniertem Tabak- und Alkoholkonsum) (Probst et al. 2008; Rivera 2015; Scully et al. 1997; Reidy et al. 2011; Gandini et al. 2008). In Süd- und Südostasien ist darüber hinaus der Genuss von Kautabak, bestehend aus der Arecanuss, Betelblättern, Löschkalk und oftmals Tabak, ein Grund für das Entstehen eines oralen Plattenepithelkarzinoms (Jethwa und

Khariwala 2017; Muttagi et al. 2012; Joshi et al. 2014). Nachdem bereits für die humanen Papillomaviren (HPV) 16 und 18 eine Rolle in der Pathogenese des Zervixkarzinoms festgestellt wurde, konnte auch für die pharyngealen Plattenepithelkarzinome ein Zusammenhang zwischen einer Virusinfektion und der Karzinomentstehung aufgezeigt werden (Ebhardt et al. 2018, S. 38; Kleinsorge und Schmidmayr 2018; Wagner et al. 2018). Dies spielt vor allem für junge Patienten eine Rolle, da diese in aller Regel eine bessere Prognose besitzen (Probst et al. 2008; Hiddemann 2010; Rivera 2015). In der klinischen Chemie fallen häufig erniedrigte Vitaminspiegel von Vitamin A, B12 und C, eine erniedrigte Folsäure und β -Karotin auf. Daher wird angenommen, dass der Verzehr von Obst und Gemüse zu einem protektiven Effekt bei der Karzinogenese des Plattenepithelkarzinoms führt (Maasland et al. 2015; Galvão De Podestá et al. 2019).

2.1.3. Pathogenese

Die Karzinogenese lässt sich vereinfacht in vier Phasen unterteilen, zunächst gibt es eine Initiationsphase, eine Promotionsphase, eine Progressionsphase sowie zuletzt eine Invasionsphase. In der Initiationsphase manifestieren sich DNA Veränderungen durch endogen (v.a. Entzündungsreaktionen) oder exogen zugeführte Noxen (wie oben erwähnt allen voran Nikotin- beziehungsweise Alkoholkonsum für das Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich) (Cunningham et al. 2011; Pu et al. 2009; Kanavy und Gerstenblith 2011; Handa et al. 2011; Koide 1975). Durch den an der DNA verursachten Schaden kommt es zu epigenetischen Veränderungen. Dies umfasst auch Veränderungen im Bereich der Expression von Genen der DNA-Reparatur. Durch Gene silencing oder verminderte Expression resultiert der teilweise oder komplette Verlust der Fähigkeit der Zelle die DNA-Schäden zu reparieren (Halford et al. 2005). Dies führt zu weiterer beschädigter DNA, wodurch das Risiko an einem Karzinom zu erkranken weiter steigt (Malkin 2011). Durch die verminderte Expression von DNA-Reparaturgenen steigt die Häufigkeit von DNA-Schäden, was zu weiteren Mutationen führt (Narayanan et al. 1997; Hegan et al. 2006). Dies hat im Verlauf zur Folge, dass aus den Epithelzellen immortale Zellklone entstehen (Hiddemann 2010; Probst et al. 2008).

Oft gehen dem Plattenepithelkarzinom Präkanzerosen voraus. Diese Epithelreaktionen sind eine hyperregenerative Antwort auf die gegenüber den entsprechenden Noxen fortbestehende Exposition. Mit andauerndem Kontakt steigt die Wahrscheinlichkeit, dass sich aus dieser Metaplasie eine epitheliale Dysplasie

entwickelt, die wiederum zu einer intraepithelialen Neoplasie führen kann. Diesen veränderten Zellen fehlt zunehmend die Möglichkeit genetische Veränderungen zu reparieren beziehungsweise die Apoptosekaskade korrekt durchzuführen. Am Ende der Entartung respektiert die veränderte Zelle die Basalmembran nicht mehr als physiologische Barriere. Ab diesem Zeitpunkt spricht man von einem invasiven Karzinom. Es kommt in der basalen Zellschicht des Epithels zu einem Klon transformierter Zellen, der nach und nach das physiologische Epithel verdrängt. Darüber hinaus entwickeln entartete Zellen die Möglichkeit zur Metastasierung (Hiddemann 2010; Probst et al. 2008).

In diesem Zusammenhang ist der Begriff „field cancerization“ zu nennen (Slaughter et al. 1953). Er beschreibt den Zustand des entstehenden Tumors, der sich sein eigenes Umfeld vorbereitet (Nguyen et al. 2010; Bernstein et al. 2008). Dabei wird von multiplen Arealen ausgegangen, welche bereits mutierte oder epigenetisch veränderte Zellen besitzen (Vogelstein et al. 2013). Hier haben die Zellen bereits eine verminderte Fähigkeit DNA-Schäden zu reparieren. Diese Zellen verdrängen das physiologische Gewebe auf Grund natürlicher Selektion. Sie können dabei erneute Mutationen erlangen, so dass sie einen Vorteil gegenüber den benachbarten Zellen besitzen und diese in der Folge verdrängen. Dieser Vorgang wiederholt sich beliebig oft bis es zur Ausbildung von Präkanzerosen oder malignen Neoplasien kommt (Slaughter et al. 1953).

Auf molekularbiologischer Ebene wurden bisher 6-10 genetische Ereignisse beschrieben, welche aus einer gesunden Epithelzelle eine Karzinomzelle des Kopf- und Hals-Bereiches entstehen lassen. Zu Beginn steht oftmals ein Verlust des p-Arms des 9. Chromosoms (van der Riet et al. 1994; Mao et al. 1996). Dies lässt aus der physiologischen Epithelzelle eine zunächst benigne Hyperplasie entstehen. Dies hat zur Folge, dass der Cyclin-D1/CDK4-Komplex (cyclin-dependent kinase) nicht mehr adäquat inhibiert wird. Daraufhin kommt es häufig zu einem Verlust von 3p und 17p (Mao et al. 1996). Dies resultiert in einer dysplastischen Zelle, welche noch prinzipiell reversible DNA Mutationen in ihrem Genom trägt. Durch den weiteren Verlust von 11q, 13q, 14q sowie einer Mutation von 17p13, auf dem die genetische Information für p53 liegt, wird die Dysplasie in ein irreversibel geschädigtes Carcinoma in situ transformiert (Singchat et al. 2016). In der Progressionsphase verliert das Genom 6p, 8q und 4q, dies führt zur Ausprägung eines invasiven Karzinoms (Shah 2014). Darüber hinaus spielen in der Karzinogenese noch zahlreiche andere Einflüsse wie weitere DNA-

Mutationen, Wachstumsfaktoren oder Adhäsionsmoleküle bzw. Enzymvariationen eine Rolle (Hiddemann 2010; Counts und Goodman 1995; Demokan und Dalay 2011; Hoffman 1984; Boguszewski et al. 2016; Stoscheck und King 1986; Grandis und Tweardy 1993).

2.1.4. Präkanzerose

In der vierten Auflage der „WHO Classification of Head and Neck Tumours“ wurde eine Vereinfachung der präkanzerösen Läsionen festgeschrieben. Die Alterationen der Schleimhaut werden nun als „oral potentially malignant disorders“ zusammengefasst und sind per Definition mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines Tumors vergesellschaftet. Diese können aus Vorläuferläsionen (precursor lesions) oder aber auch aus klinisch unauffällig vorliegender oraler Mundschleimhaut entstehen. Des Weiteren wurde zum Beispiel die Definition der Leukoplakie sowie der Erythroplakie deutlich gekürzt (Reichart et al. 2018; Sarradin et al. 2018; Gale et al. 2017; Ebhardt et al. 2018, S. 25).

2.1.4.1. Leukoplakie

Die Leukoplakie ist eine klinische Diagnose und wird durch eine Biopsie in eine histologische Diagnose mit entsprechendem Grading der Dysplasie überführt. Orale Leukoplakien sind die häufigste potenziell maligne Läsion der Mundschleimhaut. Jedoch unterscheidet sich die Häufigkeit je nach Lokalisation auf der Welt als Folge des unterschiedlich ausgeprägten Tabakkonsums sowie der unterschiedlichen Ernährung. Auch wenn nicht alle Leukoplakien automatisch zu einem Karzinom führen, dient die „epitheliale Dysplasie“ als Prognosefaktor für eine mögliche maligne Transformation. Dabei gilt je höher der Grad der Dysplasie, desto häufiger findet eine maligne Transformation statt. Dysplasien werden in geringgradig, mittelgradig, hochgradig und dem Carcinoma in situ eingeteilt. Leukoplakien, die als mittelgradig oder hochgradig klassifiziert wurden, weisen im Vergleich zu Leukoplakien ohne epitheliale Dysplasie ein bis zu fünffach erhöhtes Risiko einer malignen Transformation auf. Dennoch kann auch aus einer unauffälligen Mundschleimhaut ein Plattenepithelkarzinom entstehen. Insgesamt gilt, dass der Verzicht auf Tabak das Risiko einer oralen Leukoplakie und dem damit verbundenen erhöhten Risiko an einem oralen Plattenepithelkarzinom zu erkranken, am deutlichsten minimiert (Holmstrup 2018; Warnakulasuriya und Ariyawardana 2016; Warnakulasuriya 2018; Ebhardt et al. 2018, S. 26–32).

Leukoplakien werden als homogen oder inhomogen bezeichnet. Ca. 10% der Leukoplakien sind inhomogen. Während homogene Leukoplakien ein glattes oder gewelltes Aussehen besitzen und meist asymptomatisch sind, sind inhomogene Leukoplakien durch ein verruköses, noduläres oder ulzerierendes Erscheinungsbild gekennzeichnet. Diese können durchaus mit Beschwerden oder einer Schmerzsymptomatik einhergehen. Teilweise sind die inhomogenen Leukoplakien in Nachbarschaft zu roten Mukosabereichen. In diesen Fällen spricht man von Erythroleukoplakien. Oftmals kann hier bereits eine maligne Transformation stattgefunden haben (van der Waal 2019; Ebhardt et al. 2018, S. 27–28; Capella et al. 2017; Bewley und Farwell 2017; Akrish et al. 2019).

2.1.4.2. Erythroplakie

Eine Erythroplakie ist als Rötung der oralen Schleimhaut definiert, die keiner konkreten Ursache zugeführt werden kann. Die Ursache findet sich meist im Genuss von Tabak und Alkohol und einer daraus resultierenden Mutation des p53 Gens. Meist sind sie im weichen Gaumen, dem Mundboden und der Wangenschleimhaut lokalisiert. Die homogene Erythroplakie zeigt in der histopathologischen Untersuchung in etwa der Hälfte der Fälle (51 %) ein invasives Karzinom und in weiteren 40 % der Fälle ein Carcinoma in situ und besitzt damit die höchste Rate an malignen Transformationen aller Präkanzerosen (Saranath et al. 1999; Suwasini et al. 2018; Vora et al. 2006; Ebhardt et al. 2018, S. 34–35).

Die Hauptmerkmale der malignen Transformation sind die Überwindung der epithelialen Basalmembran, die lokale Destruktion des ortsständigen Gewebes und die Möglichkeit Tochtergeschwülste bzw. Metastasen zu bilden (Aghbari et al. 2017; Warnakulasuriya und Ariyawardana 2016).

2.1.5. Klassifikation

Die Karzinome des Kopf- und Hals-Bereiches werden nach der TNM-Klassifikation eingeteilt. Sie wird von der UICC (Union internationale contre le cancer) definiert und dient der Einschätzung der Prognose des Krankheitsverlaufes und des Therapieerfolges. Nach dieser Klassifikation richtet sich demnach auch die Therapieplanung. Seit 2017 ist die 8. Auflage der TNM Klassifikation veröffentlicht. Durch die TNM-Klassifikation werden neben der Tumorausdehnung (T) der Lymphknotenbefall (N) und die Metastasierung (M) beschrieben. Jeder dieser drei Hauptkategorien kann eine Ziffer zugewiesen werden, diese gibt Aufschluss über die Ausbreitung des Malignoms (siehe Tabellen 1 bis 6).

Für die Karzinome des Kopf- und Hals-Bereiches gibt es eine genauere Beschreibung der anatomischen Bezirke und Unterbezirke sowie der regionären Lymphknoten. Die regionären Lymphknoten sind immer die Halslymphknoten. Die TNM Klassifikation wird zum einen klinisch und zum anderen pathologisch erfasst. Darüberhinaus unterläuft das Karzinom einem histopathologischen Grading, dabei wird auf den Differenzierungsgrad der Karzinomzellen näher eingegangen.

GX Keine Aussage über den Differenzierungsgrad möglich

G1 Gut differenziert

G2 Mäßig differenziert

G3 Schlecht differenziert

G4 Undifferenziert (Wittekind 2017, S. 25–26)

Während G1 differenzierte Plattenepithelkarzinome noch eine große Ähnlichkeit zum physiologischen Ausgangsepithel aufweisen, zeigen mäßig differenzierte (G2) Plattenepithelkarzinome bereits einen Kernpolymorphismus mit mitotischer Aktivität, die eine irreguläre Zellteilung zur Folge hat. Schlecht differenzierte G3 Plattenepithelkarzinome fallen in der histopathologischen Untersuchung durch vor allem unreife Zellen mit erhöhter Mitoserate und minimaler Keratinisierung auf. Der häufigste Differenzierungsgrad beim Plattenepithelkarzinom ist G2 (Zätterström et al. 1991; Ebhardt et al. 2018, S. 39).

Darüber hinaus kann die TNM Formel um mehrere spezifizierende Kategorien erweitert werden. Der Erfolg oder Misserfolg einer Therapie lässt sich durch die R-Klassifikation (für Residualtumor) einschätzen. Diese kann auch Einfluss auf die weitere Therapieplanung nehmen.

RX Keine Aussage über Existenz eines Residualtumors möglich

R0 Kein Residualtumor

R1 Mikroskopischer Residualtumor

R2 Makroskopischer Residualtumor (Wittekind 2017, S. 12–15)

Für alle Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches gilt folgende TNM-Klassifikation (Ausnahme CUP)

Tabelle 1 TNM-Klassifikation der Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches (außer CUP)

| | |
|--|---|
| T - Tumorausdehnung | |
| TX | keine Angaben zum Primärtumor möglich |
| T0 | Primärtumor unbekannt (z.B. beim CUP) oder nicht mehr nachweisbarer Primarius |
| Tis | Die Basalmembran wird durch das veränderte Gewebe respektiert |
| N - Ausbreitung in regionäre Lymphknoten | |
| NX | Keine Beurteilung der Lymphknoten möglich |
| N0 | Keine Metastasierung in regionäre Lymphknoten |
| M - Fernmetastasierung | |
| M0 | Keine Fernmetastasierung |
| M1 | Fernmetastasierung |

2.1.5.1. Karzinome der Lippen und der Mundhöhle

Tabelle 2 TNM-Klassifikation der Karzinome der Lippen und der Mundhöhle

(Wittekind 2017, S. 29 und Korrektur von Oktober 2017)

| | |
|--|--|
| T - Tumorausdehnung für die Mundhöhle | |
| T1 | Der Durchmesser des Primärtumors beträgt maximal 20 mm, die Invasionstiefe \leq 5 mm |
| T2 | Der Primärtumor ist \leq 20 mm groß, die Invasionstiefe liegt bei $>$ 5 mm und \leq 10 mm oder der Durchmesser des Primarius liegt zwischen $>$ 20 mm und \leq 40 mm überschreitet jedoch nicht 10 mm Invasionstiefe |
| T3 | Der Durchmesser des Primärtumors ist $>$ 40 mm oder die Invasionstiefe ist $>$ 10 mm |
| T4a | Der Tumor infiltriert durch die Kortikalis von Maxillar- oder Mandibularknochen, in die äußere Zungenmuskulatur, die Kieferhöhle oder die Gesichtshaut. |
| T4b | Infiltration von Spatium masticatorium, des Processus pterygoideus, der Schädelbasis oder Ummauerung der Arteria carotis interna |
| N - Ausbreitung in regionäre Lymphknoten | |
| N1 | Befall eines einzelnen, ipsilateralen Lymphknoten, der 30 mm in der größten Ausdehnung nicht überschreitet und keine extranodale Ausbreitung aufweist |
| N2 | a Solitäre, ipsilaterale Lymphknotenmetastase $>$ 30 mm \leq 60 mm, keine extranodale Ausbreitung |

| | | |
|------------------------|--|---|
| | b | Multiple, ipsilaterale Lymphknotenmetastasen \leq 60 mm, keine extranodale Ausbreitung |
| | c | Bi- oder kontralaterale Lymphknotenmetastasen \leq 60 mm, keine extranodale Ausbreitung |
| N3a | Lymphknotenmetastase \geq 60 mm in grösster Ausdehnung, kein extranodaler Befall | |
| N3b | Solitäre (> 30 mm) oder multiple ipsilaterale, kontralaterale oder bilaterale Lymphknotenmetastasierung mit extranodaler Ausbreitung | |
| M - Fernmetastasierung | | |
| M0 | Keine Fernmetastasierung | |
| M1 | Fernmetastasierung | |

*Tabelle 3 UICC Einteilung für Karzinome der Lippen und der Mundhöhle
(Wittekind 2017, Korrektur von Oktober 2017)*

| | | | |
|--------------|-----------------|---------|----|
| Stadium 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stadium I | T1 | N0 | M0 |
| Stadium II | T2 | N0 | M0 |
| Stadium III | T3 | N0 | M0 |
| | T1, T2, T3 | N1 | M0 |
| Stadium IV A | T4a | N0, N1 | M0 |
| | T1, T2, T3, T4a | N2 | M0 |
| Stadium IV B | Jedes T | N3 | M0 |
| | T4b | Jedes N | M0 |
| Stadium IV C | Jedes T | Jedes N | M1 |

2.1.5.2. Karzinome des Oropharynx

Für das Oropharynxkarzinom gilt die Besonderheit, dass der Status von HPV 16 ausschlaggebend für die T Stadieneinteilung sein kann. Es ist von entscheidendem prognostischem Wert, ob das Oropharynxkarzinom HPV positiv oder negativ in der histopathologischen Untersuchung diagnostiziert wird (Nguyen-Tan et al. 2014; Ang et al. 2014; Lorch et al. 2011). Diese Tatsache schlägt sich in der TNM Klassifikation für Oropharynxkarzinome nieder.

Tabelle 4 Tumorausdehnung und Lymphknotenbefall bei p16 negativen Oropharynxkarzinomen

(Wittekind 2017, S. 34–37)

| | |
|--|--|
| T - Tumorausdehnung für p16-negative Oropharynxkarzinome | |
| T1 | Der Durchmesser des Primärtumors beträgt maximal 20 mm |
| T2 | Der Primärtumor ist > 20 mm und ≤ 40 mm Primärtumor im größten Durchmesser |
| T3 | Der Durchmesser des Primärtumors ist > 40 mm in der größten Ausdehnung oder Beteiligung der linguale Oberfläche der Epiglottis |
| T4a | Der Tumor infiltriert Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Zungenmuskulatur, die Lamina medialis des Processus pterygoideus, den harten Gaumen oder den Unterkiefer |
| T4b | Der Tumor infiltriert entferntere Nachbarstrukturen |
| N - Ausbreitung in regionäre Lymphknoten für p16-negative Oropharynxkarzinome und Hypopharynxkarzinome | |
| N1 | Befall eines einzelnen, ipsilateralen Lymphknoten, der 30 mm in der größten Ausdehnung nicht überschreitet und keine extranodale Ausbreitung aufweist |
| N2 | a Solitäre, ipsilaterale Lymphknotenmetastase(n) > 30 mm ≤ 60 mm, keine extranodale Ausbreitung |
| | b Multiple, ipsilaterale Lymphknotenmetastasen ≤ 60 mm, keine extranodale Ausbreitung |
| | c Bi- oder kontralaterale Lymphknotenmetastasen ≤ 60 mm, keine extranodale Ausbreitung |
| N3a | Lymphknotenmetastase(n) ≥ 60 mm in größter Ausdehnung, kein extranodaler Befall |
| N3b | Solitäre (> 30 mm) oder multiple ipsilaterale, kontralaterale oder bilaterale Lymphknotenmetastasierung mit extranodaler Ausbreitung |
| M - Fernmetastasierung | |
| M0 | Keine Fernmetastasierung |
| M1 | Fernmetastasierung |

Tabelle 5 Tumorausdehnung und Lymphknotenbefall bei p16 positiven Oropharynxkarzinomen

(Wittekind 2017, S. 34–35)

| | |
|--|--|
| T - Tumorausdehnung für p16-positive Oropharynxkarzinome | |
|--|--|

| | |
|---|--|
| T1 | Der Durchmesser des Primärtumors beträgt maximal 20 mm |
| T2 | Der Primärtumor ist > 20 mm und ≤ 40 mm Primärtumor im größten Durchmesser |
| T3 | Der Durchmesser des Primärtumors ist > 40 mm in der größten Ausdehnung oder Beteiligung der linguale Oberfläche der Epiglottis |
| T4 | Der Tumor infiltriert Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Zungenmuskulatur, die Lamina medialis des Processus pterygoideus, den harten Gaumen oder den Unterkiefer; des Weiteren den M. pterygoideus lateralis, die Lamina lateralis des Processus pterygoideus, der laterale Nasopharynx, die Schädelbasis oder Ummauerung der A. carotis |
| N - Ausbreitung in regionäre Lymphknoten für p16-positive Oropharynxkarzinome | |
| N1 | Solitäre oder multiple ipsilaterale Lymphknotenmetastase(n) ≤ 60 mm in der größten Ausdehnung |
| N2 | Bilaterale oder kontralaterale Lymphknotenmetastasen ≤ 60 mm in der größten Ausdehnung |
| N3 | Lymphknotenmetastase ≥ 60 mm in größter Ausdehnung |

*Tabelle 6 UICC-Klassifikation für p16 negative Oropharynxkarzinome
(Wittekind 2017, S. 39)*

| | | | |
|--------------|-----------------|---------|----|
| Stadium 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stadium I | T1 | N0 | M0 |
| Stadium II | T2 | N0 | M0 |
| Stadium III | T3 | N0 | M0 |
| | T1, T2, T3 | N1 | M0 |
| Stadium IV A | T4a | N0, N1 | M0 |
| | T1, T2, T3, T4a | N2 | M0 |
| Stadium IV B | Jedes T | N3 | M0 |
| | T4b | Jedes N | M0 |
| Stadium IV C | Jedes T | Jedes N | M1 |

*Tabelle 7 UICC-Klassifikation für p16 positive Oropharynxkarzinome
(Wittekind 2017, Korrektur von März 2017)*

| | | | |
|-------------|----------------|---------|----|
| Stadium 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stadium I | T1, T2 | N0, N1 | M0 |
| Stadium II | T1, T2 | N2 | M0 |
| | T3, T4 | N0, N1 | M0 |
| Stadium III | T1, T2, T3, T4 | N3 | M0 |
| | T4 | Jedes N | M0 |
| Stadium IV | Jedes T | Jedes N | M1 |

Das Stadium IV des Oropharynxkarzinoms wird erst mit M1 für HPV positive Karzinome erreicht. Für HPV negative Karzinome wird dieses Stadium jedoch schon ab einer Tumorausdehnung T1-T3 und mindestens einem unilateral befallenen Lymphknoten > 30 mm oder multipler Lymphknoten bis 60 mm erlangt.

2.1.6. Therapie

Patienten mit Malignomen im Kopf-Hals-Bereich werden nach heutigen modernen Therapiekonzepten multimodal und individuell therapiert. Hierzu wird der Patient nach Eingang der positiven Histologie und Abschluss der Staginguntersuchungen in einer interdisziplinären Tumorkonferenz besprochen. Bei gegebener Operabilität wird der Patient bei AJCC 1-2 (entspricht UICC I-II) Tumoren in aller Regel operiert und bei freien Resektionsgrenzen (mehr als 5 mm am Paraffin fixierten Präparat) in die Nachsorge überführt. Bei AJCC 3-4 (entspricht UICC III-IV) Tumoren schließt sich nach der Resektion in der Regel eine adjuvante Therapieform an, die je nach Histologie als Radiotherapie mit und ohne Chemotherapie durchgeführt werden kann. Bei inoperablen Tumoren wird die Möglichkeit einer primären Radiochemotherapie geprüft. Inoperabilität besteht im Allgemeinen bei Infiltration der Fossa pterygopalatina, der Schädelbasis, dem oberen Anteil des Epipharynx, der Karotiden, der Wirbelsäule sowie des Mediastinums (Honecker et al. 2018).

2.1.6.1. Chirurgische Therapie

Prinzipiell steht an erster Stelle das Ziel den Tumor in toto zu reseziieren (R0-Resektion). Dies gelingt im Bereich des Kopfes beziehungsweise des Halses auf Grund der anatomischen und funktionellen Grenzen nicht immer in gewünschtem Maße (Honecker et al. 2018). Bei großen Tumoren, die auch unter Einsatz der Radiatio nicht sicher ansprechen, kann durch die Operation eine deutliche Verkleinerung des Tumors bewirkt werden, das sogenannte „Debulking“ (Paleri et al. 2005). In aller Regel

wird bei der primären Tumorresektion heute unter Einsatz mikrovaskulärer Verfahren, die direkte und definitive Rekonstruktion des Defektes angestrebt (Meier et al. 2019). Eine modifizierte Neck-Dissection der Halslymphknoten ist fast immer Bestandteil des Therapiekonzepts, alternativ existiert die perkutane Strahlentherapie (Probst et al. 2008; Hiddemann 2010; AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. und Deutsche Krebshilfe e.V. 2012; Manikantan et al. 2016; Veij Mestdagh et al. 2019). Die Lymphknotenregionen werden in sechs unterschiedliche Subgruppen nach Robbins eingeteilt.

*Tabelle 8 Einteilung der Lymphknotenregionen nach Robbins
(Robbins et al. 1991)*

| | |
|---|--|
| Level I submentale und submandibuläre Lymphknoten | |
| Ia | Submentale Lymphknoten, beschränkt durch M. digastricus, Os hyoideum, medianem Hals und Zungenbein |
| Ib | Submandibuläre Lymphknoten, beschränkt durch M. digastricus, M. stylohyoideus und Unterkiefer |
| Level II kraniojuguläre Lymphknoten | |
| IIa | Mediale kraniojuguläre Lymphknoten, beschränkt durch M. stylohyoideus, N. accessorius, Schädelbasis und Os hyoideum |
| IIb | Laterale kraniojuguläre Lymphknoten, beschränkt durch N. accessorius, M. sternohyoideus und M. sternocleidomastoideus |
| Level III mediojuguläre Lymphknoten, beschränkt durch mittlere V. jugularis, Ringknorpel, Klavikula, M. sternohyoideus und M. sternocleidomastoideus | |
| Level IV kaudojuguläre Lymphknoten, beschränkt durch untere V. jugularis, Ringknorpel, Klavikula, M. sternohyoideus und M. sternocleidomastoideus | |
| Level V Accessoriusgruppe, posteriores Halsdreieck | |
| Va | Kraniales posteriores Halsdreieck, beschränkt durch posterioren Anteil des N. accessorius, M. sternocleidomastoideus, M. trapezius und Ringknorpel |
| Vb | Lymphknoten der transversal verlaufenden Halsgefäße und supraklavikuläre Lymphknoten |
| Level VI para- und retropharyngeale Lymphknoten, dazu zählen die paratrachealen und parathyroidalen Lymphknoten sowie die perinervalen Lymphknoten des N. | |

laryngeus recurrens, die laterale Beschränkung besteht aus den Aa. carotides communes, nach kranial aus dem Os hyoideum und nach kaudal aus der Fossa jugularis

Dabei wird zwischen der radikalen Neck-Dissection, einer modifizierten, einer funktionellen und einer selektiven Neck-Dissection unterschieden. Die radikale Neck-Dissection beinhaltet die Entfernung der Lymphknoten inklusive folgender anatomischer Strukturen: Vena jugularis interna, Musculus sternocleidomastoideus, Musculus sternohyoideus, Musculus sternothyroideus, Musculus omohyoideus, Glandula submandibularis und Nervus accessorius (Li et al. 2017c; Robbins et al. 1991). Bei der modifizierten Neck-Dissection lassen sich drei Typen unterscheiden. Die Lymphknoten Robbins I-V werden bei jedem Typen entfernt. Bei Typ I bleibt der N. accessorius erhalten, bei Typ II der N. accessorius und die V. jugularis interna. Bei Typ III wird zusätzlich der M. sternocleidomastoideus reseziert (Ito et al. 2017; Govers et al. 2015). Die funktionelle Neck-Dissection zeichnet sich durch die Erhaltung von Muskeln, des N. accessorius und nach Möglichkeit der V. jugularis interna aus (Li et al. 2017c). Bei der selektiven Neck-Dissection werden sicher diagnostizierte oder vermutete Metastasen in den Lymphknoten entfernt. Dabei lässt sie sich wie folgt einteilen:

Tabelle 9 Entfernung der Lymphknoten bei der selektiven Neck-Dissection (Manikantan et al. 2016)

| | |
|-----------------|--|
| Supraomohyoidal | Entfernung der Lymphknoten Robbins I-III |
| Lateral | Entfernung der Lymphknoten Robbins II-IV |
| Posterolateral | Entfernung der Lymphknoten Robbins II-V |
| Anterior | Entfernung der Lymphknoten Robbins VI |
| Anterolateral | Entfernung der Lymphknoten Robbins I-IV |

2.1.6.2. Radiotherapie

Durch den Einsatz der 3D-konformalen Bestrahlung und der intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) zur Optimierung der Dosis im Tumorbett bei gleichzeitiger Schonung physiologischer Strukturen (insbesondere der Speicheldrüsen) kommt der Radiotherapie im modernen Therapieansatz ein hoher Stellenwert zu (Honecker et al.

2018; Leeman et al. 2017). Für besondere Lokalisationen eignet sich die intensitätsmodulierte Protonenradiotherapie (Gunn et al. 2016). Bei kleinen Zungen-, Mundboden-, Lippen- sowie Rezidivkarzinomen kann auch die interstitielle Brachytherapie mit ¹⁹²Ir angewandt werden. Dabei handelt es sich um eine lokale Applikation einer Strahlenquelle direkt am Karzinom. Sowohl als alleinige Primärtherapie aber auch als neoadjuvantes beziehungsweise adjuvantes Therapiekonzept in Verbindung mit Chemotherapeutika hat die Radiotherapie ihren festen Stellenwert in der Therapie der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches. Vor allem lokal fortgeschrittene, inoperable Karzinome und die Nasopharynxkarzinome werden mittels einer primären Radio- bzw. Radiochemotherapie behandelt. AJCC 1 Nasopharynxkarzinome sowie T1/2 N0 Karzinome von Larynx, Oropharynx und Mundhöhle werden mittels alleiniger Radiotherapie, alle weiteren mit einer Radiochemotherapie behandelt. Die Indikation zur adjuvanten Strahlentherapie wird ab einer Tumorausdehnung AJCC 3 und 4 (entspricht UICC III und IV) gestellt. Darüber hinaus gibt es weitere Risikofaktoren, die für eine Strahlentherapie sprechen. Dazu gehören eine extrakapsuläre Lymphknotenextension, knappe bzw. positive Resektionsränder in der histologischen Untersuchung, eine perineurale Invasion durch das Karzinom, mindestens zwei nachgewiesene positive Lymphknoten (mindestens N2b), zwei unterschiedlich befallene Lymphknotengruppen oder wenn der größte Lymphknoten mehr als 30 mm im Durchmesser bemisst (Hiddemann 2010; AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. und Deutsche Krebshilfe e.V. 2012; Honecker et al. 2018). Als adjuvante Therapie kommt die Radiochemotherapie bei einem postoperativen Lokalbefund R1, N+ oder bei weiteren Risikofaktoren zum Einsatz (Reiser und Bartenstein 2011; Honecker et al. 2018). Als gleichwertige Therapie im Vergleich zur operativen Resektion kann bei Glottiskarzinomen T1/2 N0 eine Radiochemotherapie angewandt werden (Honecker et al. 2018). Dabei ist zu beachten, dass vor dem Beginn der Therapie eine Inspektion des Zahnstatus und gegebenenfalls die Sanierung infektiöser Quellen gewährleistet ist (Schweyen et al. 2017).

Ist eine chirurgische Resektion auf Grund eines schlechten Allgemeinzustandes des Patienten oder aber eines hohen perioperativen Risikos nicht möglich, dann wird eine definitive Strahlentherapie angewandt (Reiser und Bartenstein 2011).

Oropharynxkarzinome sind weniger HPV-assoziiert (p16 positiv) und weisen somit auch ein unterschiedliches biologisches Profil und unterschiedliche Sensibilität gegenüber Bestrahlung auf (Marur et al. 2010; Lassen et al. 2009).

2.1.6.2.1. Dosis

Eine reine Strahlentherapie wird bei T1/2 N0 Karzinomen des Larynx, des Oropharynx und der Mundhöhle angewandt. Die Einzeldosis für die alleinige primäre IMRT beträgt 2,0 Gray (Gy) mit einer Gesamtdosis (GRD) von 60 - 70 Gy, bei glottischen Larynxkarzinomen bei 2,25 Gy bis zu einer GRD von 63 Gy (T1) bzw. 67,5 Gy (T2) (Honecker et al. 2018).

Eine adjuvante Radiochemotherapie beinhaltet eine Chemotherapie mit Cisplatin oder Carboplatin sowie 5-Fluoruracil (5-FU). Die Indikation dazu wird bei Tumorinvasion in das perineurale Gewebe und Lymphgefäße, pT3/4 Tumore, mehr als 2 Lymphknotenmetastasen, Lymphknoten > 30 mm, extrakapsulärer Lymphknoteninfiltration, N2/3, dem Knochen anliegender Tumor, Robins IV und V sowie R1/2 Resektion gestellt. Eine alleinige Radiotherapie wird insbesondere bei Patienten mit einem Karnofskyindex unter 60 oder weiteren Begleiterkrankungen, durch welche eine Chemotherapie auf Grund ihrer potentiellen Toxizität kontraindiziert ist, angewandt. Sie ist in ihren Ergebnissen der Radiochemotherapie unterlegen. Die IMRT wird dabei mit einer Einzeldosis von 2 Gy bzw. einer GRD von 60 - 66 Gy im Bereich befallener Lymphknoten sowie des Tumors durchgeführt (Honecker et al. 2018).

Bei fortgeschrittenen, inoperablen Karzinomen kann eine alleinige Radiotherapie bei vorhandener Kontraindikation gegen eine Chemotherapie angewandt werden. Es wird nach Möglichkeit eine hyperfraktionierte Radiotherapie, z.B. mit einem concomitant boost, angestrebt. In diesem Schema werden das Karzinom sowie die zugehörigen ableitenden Lymphwege morgens, das nähere Tumorareal in sechsstündigem Abstand nachmittags bestrahlt. Bei kurativem Therapieansatz kommt standardmäßig eine Chemotherapie mit Cisplatin bzw. Carboplatin und 5-FU in Verbindung mit einer Radiotherapie zum Einsatz. Die adjuvante Therapie beinhaltet lediglich Cisplatin und eine Radiotherapie. Sollte eine Kontraindikation gegen Platin bestehen wird stattdessen Mitomycin verwendet. Die GRD beträgt im Bereich des Karzinoms und von befallenen Lymphknoten 66-70 Gy. Nach kompletter Resektion, also R0, werden die ehemals befallenen Areale mit einer GRD von 60 Gy bestrahlt. Bei extrakapsulärer Ausbreitung oder oben genannten anderen Risikofaktoren wird eine GRD > 60 Gy angestrebt (Reiser und Bartenstein 2011; Hiddemann 2010; Honecker et al. 2018). Bei

einer generellen Kontraindikation gegen Chemotherapeutika ist eine Radioimmuntherapie mit Cetuximab einer alleinigen Radiotherapie überlegen (Honecker et al. 2018).

Tabelle 10 Therapieprotokoll der primären simultanen Radiochemotherapie und der Radioimmuntherapie

(Honecker et al. 2018)

| Protokoll der primären simultanen Radiochemotherapie bzw. Radioimmuntherapie | | | |
|--|------------------|--------------------------------------|--|
| 1 | Cisplatin (mono) | 100 mg/m ² | Tag 1, Wdh. Tag 22 oder 29 |
| 2 | Cisplatin | 20 mg/m ² | Tag 1-5, Wdh. Tag 29 |
| | 5-FU | 600 mg/m ² | Tag 1-5, Wdh. Tag 29 |
| 3 | Carboplatin | AUC (area under the curve) 5 | Tag 1, Wdh. Tag 29 |
| | 5-FU | 600 mg/m ² | Tag 1-5, Wdh. Tag 29 |
| 4 | Mitomycin | 10 mg/m ² | Tag 1, Wdh. Tag 29 |
| | 5-FU | 600 mg/m ² | Tag 1-5, Wdh. Tag 29 |
| 5 | Cetuximab | 400 mg/m ² (loading dose) | 1 Woche vor Beginn der Radiotherapie, dann Fortführung mit 250 mg/m ² wöchentlich während der Radiotherapie |
| Schema 1-5 in Kombination mit Radiotherapie mit einer GRD von 70 Gy und einer ED von je 2 Gy | | | 35 Fraktionen an Tag 1-47 |

2.1.6.3. Nebenwirkungen

Die Nebenwirkungen lassen sich in akute Frühreaktionen und chronische Spätreaktionen einteilen. Den Frühreaktionen werden Nebenwirkungen, welche in den ersten 90 Tagen nach Therapiebeginn auftreten, zugerechnet. Im Umkehrschluss sind Nebenwirkungen die ab dem 91. Tag auftreten unter den Spätreaktionen zusammengefasst. Zum Teil resultieren Spätreaktionen aus Frühreaktionen (Perez et al. 2013, S. 51–55). Darüber hinaus spielen individuelle Faktoren des Patienten wie Alter, Allgemeinzustand und weitere Erkrankungen eine Rolle. Insgesamt sind die Nebenwirkungen der Strahlentherapie von der Dosis der Anwendung, von der Eindringtiefe und von der Häufigkeit der Strahlenexposition abhängig (Michalowski

1986). Bei Chemotherapien sind unter anderem die Art der Substanz, die Dosis sowie die Pharmakokinetik ausschlaggebend für das Ausbilden von Nebenwirkungen. Unter den Frühreaktionen finden sich gastrointestinale Symptome wie Mukositis, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoen sowie myelosuppressive Symptome wie Leukopenie bzw. Anämie. Eine Mukositis geht mit Schluck- sowie Geschmacksstörungen einher (Honecker et al. 2018). Vor allem die Bestrahlung begünstigt Veränderungen an Haut bzw. Schleimhäuten. Im Gegensatz dazu zeigen sich die Nebenwirkungen einer systemischen Chemotherapie in Organen, welche sich außerhalb des Strahlenfeldes befinden. Dieser Umstand, dass sich die Nebenwirkungen an unterschiedlichen Lokalisationen im Organismus manifestieren, erlaubt den simultanen Einsatz zweier effizienter Therapien. Dadurch ergeben sich jedoch Nebenwirkungen, die sich gegenseitig verstärken können. So begünstigt eine chemotherapieinduzierte Neutropenie eine Superinfektion von Schleimhäuten, die bereits durch eine Radiotherapie vorgeschädigt sind. Eine nebenwirkungsbedingte Therapiepause reduziert die Wirksamkeit der Radiochemotherapie und folglich die Prognose des Patienten. Um eine Unterbrechung der Therapie zu vermeiden, ist eine supportive Behandlung der Nebenwirkungen von enormer Bedeutung. Die Ernährung des Patienten mit ausreichend Kalorien sollte bei Bedarf durch die Anlage einer perkutanen endoskopischen Gastrostomie oder eines Portsystems zur parenteralen Ernährung gewährleistet werden. Darüber hinaus ist eine Kombination aus lokalen sowie systemischen Analgetika unerlässlich. Um Infektionen zu verhindern, werden Antimykotika sowie Antibiotika lokal und systemisch appliziert (Dt. Ärztebl 1997 94: A-3277-3280 [Heft 48]; Honecker et al. 2018; Wendt et al. 1998; Fietkau 2012).

Die Spätreaktionen ergeben sich bei der Strahlentherapie aus dem fibrotischen Umbau sowie Gefäßverengungen des bestrahlten Areal. Daraus resultieren im Kopf- und Hals-Bereich die Xerostomie, Indurationen im subkutanen Fettgewebe, Geschmacksstörungen bis hin zum vollständigen Verlust des Geschmackssinnes, aber auch Schäden an Knochen und Zähnen (Skiba-Tatarska et al. 2016; Álvarez-Camacho et al. 2017). Bei den Chemotherapien führen bestimmte Substanzen zu teilweise irreversiblen Schädigungen an den Myokard- und Keimzellen (McGowan et al. 2017; Kourie und Klastersky 2017). Darunter finden sich Anthrazykline, aber auch die bei der Therapie des Plattenepithelkarzinoms im Kopf- und Hals-Bereich gängigen Chemotherapeutika wie Mitomycin C und 5-FU. Für die platinhaltigen Chemotherapeutika sind als Langzeitfolgen v.a. die Nephrotoxizität sowie Schäden am

peripheren und zentralen Nervensystem relevant (Koenig und Patel 1970b, 1970a; Filipski et al. 2009; Waissbluth und Daniel 2013). Zusätzlich zu den Frühreaktionen und den Spätreaktionen spielen Nebenwirkungen stochastischer Natur eine Rolle. Diese ergeben sich aus der erbgutschädigenden Wirkung von ionisierender Strahlung (Bordini und Taino 2017). Darunter fallen die Neubildung von Karzinomen, aber auch das Risiko für Missbildungen der Nachkommen auf Grund von Keimbahnschädigungen. Dabei ist zu beachten, dass kein Zusammenhang zwischen der angewandten Dosis und dem resultierenden Schaden besteht, sondern dass die Anwendung von ionisierender Strahlung unabhängig von der Dosis bereits erbgutschädigend ist (Perez et al. 2013).

Durch die unterschiedlichen Ansatzpunkte der Radio- sowie der Chemotherapie ergeben sich Vorteile gegenüber einer Monotherapie. So können strahlenresistente Zellen durch die Chemotherapie und umgekehrt chemoresistente Zellen durch die Radiotherapie erfasst werden. Ein weiterer Effekt ist, dass Chemotherapien wie Cisplatin und 5-FU die Zellen für eine Radiotherapie sensitivieren könnten (Begg et al. 1986; Kanotra et al. 2011; Lawrence et al. 1997). Daraus ergibt sich die Frage, ob weitere Agenzien existieren, die die Zellen für eine Strahlentherapie sensitivieren. Um Nebenwirkungen im Sinne des Patienten zu vermeiden, könnte die prospektive Bestimmung von Markern in der histologischen Untersuchung schon im Vorfeld die Therapieoptionen spezifizieren. Bei einer hohen Strahlensensitivität würde primär eine Radiatio zum Einsatz kommen. Bei fehlender Strahlensensitivität der Zellen wäre eine chirurgische Resektion die Therapie der Wahl. Da eine veränderte Expression von microRNAs bereits in einer Vielzahl von Tumoren festgestellt wurden, könnten diese einen Ansatzpunkt für die Bestimmung der Strahlensensitivität darstellen und demnach das weitere Therapieregime festlegen.

2.2. microRNA und ihre Bedeutung

2.2.1. Allgemeine biochemische Grundlagen

Jeder höhere Organismus zeichnet sich durch stetige Zellteilung und Differenzierung in unterschiedlichste Arten von Zellen aus. Dieser komplexe Vorgang erfordert ein hohes Maß an chronologischer als auch örtlicher Koordination sowie Regulation einer großen Anzahl von Molekülen und Proteinen (Filipowicz et al. 2008; Jevnaker et al. 2011; Harfe et al. 2005; Braun und Gautel 2011; O'Donnell et al. 2005).

Seit Watson und Crick ist bekannt, dass die Informationen zur Synthese von Proteinen in der Basenabfolge der DNA gespeichert sind (Watson und Crick 1953). Eben jene Proteine bilden in aller Regel die von der Zelle benötigten Moleküle. Dies bedeutet wiederum, dass die ordnungsgemäße Synthese und Faltung der Proteine für die oben genannte zeitliche und örtliche Koordination und Regulation der Differenzierung von immenser Bedeutung für die Zelle sind (Reinhart et al. 2000; Bernstein et al. 2003; Buchner 2002). Dieser Prozess nimmt mit der sogenannten Transkription im Zellkern seinen Anfang. Dabei wird die DNA in eine komplementäre mRNA umgeschrieben, welche die Information, bestehend aus einer Abfolge der Nukleinbasen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin bzw. Uracil in mRNA Molekülen, aus dem Nucleus in das Zytoplasma transportiert. Hier sind die Ribosomen lokalisiert, welche den zweiten Schritt, die Translation, vollziehen. Sie schreiben die Basenabfolge der mRNA in eine Aminosäuresequenz um, aus der sich entweder die Proteine spontan in ihre native Konfiguration begeben oder sie, ab einer entsprechenden Größe, durch spezielle Faltproteine, Chaperone genannt, in ihre richtige räumliche Struktur überführt werden (Buchner 2002) .

Darüber hinaus kann diese Koordination des Zellstoffwechsels auf unterschiedlichen Ebenen modifiziert werden. Dazu zählt die Transkription, hier wird mittels diverser Transkriptionsfaktoren der Stoffwechsel der Zelle über die Genregulation beeinflusst (Wittenberg und Reed 2005; Bose und Ain 2018). Des Weiteren ist das Transkriptionsprodukt, also die mRNA als Ziel der posttranskriptionellen Regulation, z.B. durch microRNAs, zu benennen (Siomi und Siomi 2010; Lewin 1998; Urbánek und Klotz 2017; Schaefer et al. 2018). Die Translation wird auf ribosomaler Ebene gesteuert (Yan et al. 2016; Kapur et al. 2017) während Proteine posttranslational modifiziert werden (Lewin 1998; Xu et al. 2016; Shipston und Tian 2016).

2.2.2. Der Weg zur Entdeckung der microRNA

In den vergangenen 15 Jahren haben sich die Kenntnisse über die konventionellen RNAs mRNA, ribosomale RNA und transfer RNA hinaus stetig erweitert. So verwundert es nicht, dass bis heute eine beachtliche Anzahl RNA-abhängiger genregulatorischer Vorgänge wie Splicing, RNA Editing, Gene Silencing über Heterochromatinbildung und RNA Interferenz durch siRNA (short interfering RNA) und microRNA entdeckt wurden (Wightman et al. 1993; Bernstein und Allis 2005; Laible et al. 1997; Allshire 2002). Neben ribosomaler RNA und transfer RNA zählt man auch regulatorische RNA zu den nicht-kodierenden RNAs. Diese machen ungefähr die

Hälfte aller Transkriptionsprodukte aus und setzen sich aus den small RNAs, microRNA und siRNA sowie small nuclear RNAs und small modulating RNAs zusammen (Ota et al. 2004).

Erstmalig berichtete Rosalind C. Lee et al. und Wightman et al. 1993 von small RNAs im Zusammenhang mit dem lin-4 Gen in *C. elegans* (Lee und Ambros 2001; Lee et al. 1993). Der Begriff microRNA wurde allerdings erst 2001 geprägt (Lee et al. 1993; Lee et al. 2004a). Als Genprodukt von lin-4 wurde eine 22 nt und eine 61 nt lange Nukleotidsequenz nachgewiesen, welche komplementäre Basenabfolgen zu der 3'-UTR von lin-14 mRNA aufweist. Diese Tatsache ließ den Schluss zu, dass lin-4 die Translation der lin-14 mRNA über eine antisense RNA-RNA Interaktion reguliert und somit die Aktivität des LIN-14 Proteins posttranskriptionell negativ beeinflusst (Wightman et al. 1993; Lee et al. 2004a; Lee et al. 1993). Zum damaligen Zeitpunkt war jedoch noch nicht bekannt, dass es sich bei dem 61 nt langen Molekül um die precursor microRNA (pre-microRNA) und bei dem 22 nt langen Molekül um die microRNA handelte, welche mit der lin-14 mRNA interagiert (Lee et al. 2004a; Lagos-Quintana et al. 2001).

2.2.3. RNA-Interferenz und die ersten microRNAs

Ein weiterer Meilenstein in der Geschichte der small RNAs war 1998, als der Mechanismus der RNA-Interferenz, auch RNA-Silencing genannt, entdeckt wurde. Fire und Mello beschrieben die Interferenz zwischen siRNA und proteinkodierender mRNA anhand des unc-22 Gens, welches die Muskelstruktur und Funktion in *C. elegans* beeinflusst (Fire et al. 1998). Dabei werden aus einer doppelsträngigen RNA kleinere siRNA Fragmente geschnitten. Durch die Interaktion zwischen absolut komplementärer siRNA und mRNA wird die selbige gespalten und somit die Genaktivität posttranskriptionell reguliert. Acht Jahre später, 2006, erhielten die beiden Wissenschaftler für diese Entdeckung den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin (Timmons et al. 2003; Montgomery et al. 1998; http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/).

Im Jahr 2000 wurde eine weitere small RNA in *C. elegans* identifiziert: let-7, wie lin-4 eine microRNA. Diese RNA koordiniert das zeitliche Zusammenspiel verschiedener mRNAs in der Entwicklung des oben genannten Nematoden (Reinhart et al. 2000). Das let-7 Gen kodiert für eine 21 nt lange RNA, welche komplementär zu den 3' UTR Bindungsstellen der heterochronischen mRNAs von lin-14, lin-28, lin-41, lin-42 und daf-12 ist. Das besondere an let-7 und lin-41 ist, dass diese beiden Gene evolutionär

konserviert sind, das heißt, sie treten in einer großen Bandbreite auch in anderen multizellulären Organismen auf (Wienholds und Plasterk 2005). Dies wurde mittlerweile für nahezu alle microRNAs bei verwandten Spezies nachgewiesen. Und selbst bei weiter entfernten Spezies, zum Beispiel dem oben genannten *C. elegans* sind mindestens ein Drittel aller microRNAs homolog zu derer des *H. sapiens* (Kim und Nam 2006; Xie et al. 2005). Somit kristallisierte sich heraus, dass das Phänomen der small RNAs nicht nur auf *C. elegans* beschränkt war. In den folgenden Jahren wurden schließlich mehr und mehr microRNAs und deren Wirkungsweise in verschiedensten Organismen und auch dem Menschen beschrieben (Wienholds und Plasterk 2005). Heute wird angenommen, dass ca. 30 % der menschlichen Gene durch microRNAs reguliert werden (Lewis et al. 2003).

2.2.4. microRNA Biogenese

Die Biogenese der microRNAs erfolgt in mehreren unterschiedlichen Teilprozessen, die zu Beginn der Synthese im Nukleus lokalisiert sind und später im Zytoplasma ausreifen (Lynam-Lennon et al. 2009).

2.2.4.1. Transkription der DNA der microRNA

Circa 40 % der microRNAs werden aus Exons langer nicht-proteinkodierender Transkripten oder Introns von kodierenden und nicht-kodierenden Genen prozessiert. Die Informationen über deren Basenabfolge können prinzipiell aber auf allen Gentranskripten vorliegen (Rodriguez et al. 2004). Die Mehrzahl der microRNA Transkriptionen werden durch die RNA-Polymerase II katalysiert, jedoch wurde nachgewiesen, dass auch die RNA-Polymerase III in die Transkription einiger microRNAs involviert ist (Ozsolak et al. 2008; Lee et al. 2004b).

Als Produkt der RNA-Polymerase II bzw. RNA-Polymerase III entsteht ein DNA Transkript, die sogenannte primary microRNA (pri-microRNA). Strukturell imponiert vor allem die Schleife (stem-loop), welche sich an einer Seite beim Zusammenlagern des Einzelstranges zu einem Doppelstrang ausbildet und somit zu der charakteristischen Haarnadelstruktur führt. Die pri-microRNAs, welche durch die RNA-Polymerase II katalysiert worden sind, besitzen am 5'-Ende eine Struktur, die sich 7-Methylguanosin-Kappe nennt. Am 3'-Ende befindet sich ein Poly-A-Schwanz; diese beiden Strukturen dienen normalerweise der mRNA die Degradierung durch Exonukleasen im Zytoplasma zu verhindern, der Effekt dieser untranslatierten Regionen (UTR) bei microRNAs ist bisher noch nicht abschließend geklärt worden (Lee et al. 2004b).

2.2.4.2. Cleavage der pri-microRNA

Der nächste Schritt wird durch ein doppelsträngiges, RNA bindendes Protein namens DiGeorge critical region 8 (DGCR8) und Drosha, die aus zwei Endonukleasen RNAsen III (RRIIDa und RRIIDb) besteht, eingeleitet. Die Anwesenheit von DGCR8 ist obligat, da durch selbiges Drosha an die richtige Nukleotidsequenz der pri-microRNA geleitet wird und ohne DGCR8 deren Aktivität kaum noch nachzuweisen ist (Han et al. 2004). Zusammen mit der pri-microRNA bilden diese beiden Proteine den Mikroprozessorkomplex, welcher aus der pri-microRNA die ungefähr 70 nt lange pre-microRNA schneidet, indem das 3'-Ende (RRIIDa) und das 5'-Ende (RRIIDb) abgetrennt werden. Bei diesem Vorgang, Cleavage genannt, bindet Drosha bevorzugt an RNA Sequenzen, die sich am Ende des Moleküls befinden (Zeng et al. 2005).

2.2.4.3. Verlassen der pre-microRNA des Nukleus

Die pre-microRNA verlässt den Nukleus unter Zuhilfenahme eines Proteins namens Exportin-5 (Exp5), das die pre-microRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert (Yi et al. 2003; Poon und Jans 2005). Dabei wurde gezeigt, dass Exp5 auf die pre-microRNA protektiv wirkt, indem es die Degradation von pre-microRNA vor und möglicherweise auch während des Transports aus dem Nukleus verhindert (Zeng und Cullen 2004).

Im Zytoplasma angekommen induziert das Ran-GTPase aktivierende Protein (GTP: Guansointriphosphat) die GTPase Aktivität von Ran-GTP, wodurch eine Hydrolyse in Ran-GDP und einen Phosphatrest katalysiert wird. Dieser Vorgang bewirkt, dass sich die pre-microRNA von Exp5 löst (Lynam-Lennon et al. 2009; Banerjee et al. 2011).

2.2.4.4. Die zytoplasmatische Reifung der microRNA durch Dicer

Die zytoplasmatische Reifung der microRNAs wird durch das RNase-III-Enzym Dicer komplettiert (Song et al. 2003). Aus der gebundenen pre-microRNA wird nun durch Dicer ein oder mehrere 22 nt lange doppelsträngige RNA Fragmente geschnitten. Das doppelsträngige RNA Molekül besitzt einen 2 nt langen 3'-Überhang und muss sich, um an den RNA induced silencing complex (RISC) zu binden, in eine einzelsträngige microRNA und eine komplementäre microRNA* trennen. Dies funktioniert aber nur unter Zuhilfenahme des Argonate 2 (Ago2) Proteins. Ago2 bindet an Dicer über dessen TRBP (human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein) Domäne die entsprechende microRNA. Dabei wird nach der thermodynamischen Stabilität der beiden Stränge entschieden, welcher in den RISC

aufgenommen wird. Die übrigbleibende microRNA* wird daraufhin durch RISC degradiert (Chendrimada et al. 2005).

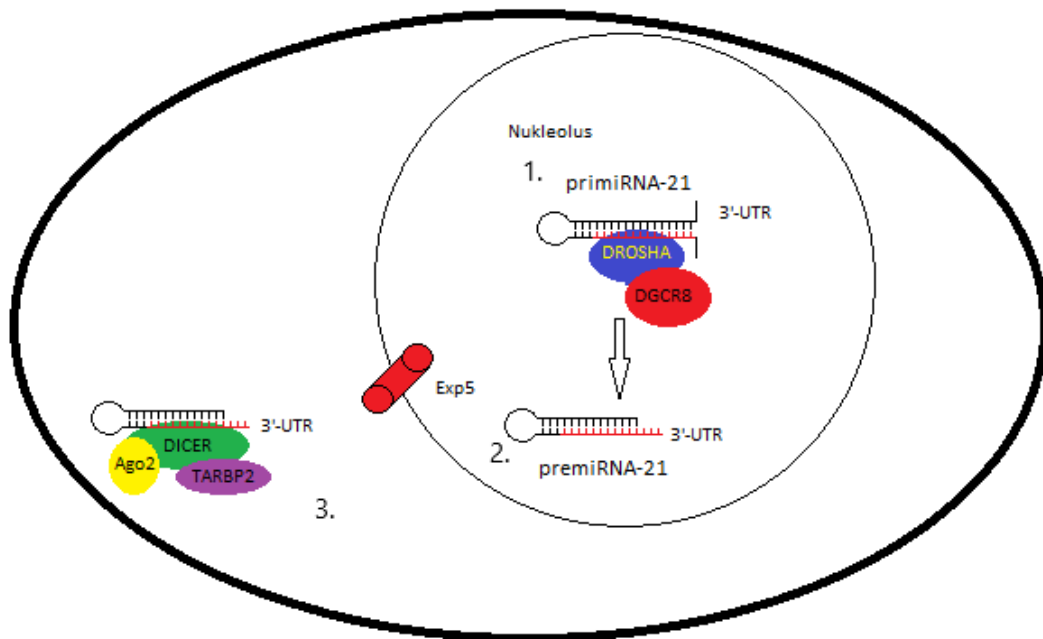


Abbildung 1 Reifung der microRNA-21

modifiziert nach Gregory et al. sowie Olena et al. (Gregory et al. 2005; Olena und Patton 2010)

1. Zunächst als pri-microRNA (primiRNA-21) vorliegend, 2. Processing der pre-microRNA (premiRNA-21) im Nukleolus, 3. Verlassen des Zellkerns und Bilden des RNA induced silencing complex

2.2.5. Funktion der microRNA

2.2.5.1. microRNA im RNA induced silencing complex

Beim Processing der microRNA werden Dicer und TARBP2 von Argonaute Endonukleasen (Agos), wie z.B. EIFC/Ago1 und EIFC2/Ago2, unterstützt. Diese binden an Dicer und TARBP2 und verstärken die Processing-Effizienz und das Schneiden der microRNAs. Wenn eine völlige Übereinstimmung zwischen microRNA und mRNA Sequenz besteht, führt Ago1/2 zur Zerstörung der mRNA. Wenn die Übereinstimmung nur teilweise besteht wird die Translation inhibiert (Boominathan 2010b). Die Proteine Dicer, Ago2 und TRBP in Zusammenspiel mit der jeweiligen microRNA bilden den RISC. Dieser Multienzymkomplex kann nun verschiedensten

Funktionen in der Zelle nachgehen (Chendrimada et al. 2005; Gregory et al. 2005; Gregory et al. 2004).

2.2.5.2. mRNA Degradation oder mRNA Speicherung in P-Bodies

Die mRNA Degradation bedeutet zunächst das Blockieren durch Abbauen eines Informationsträgers. Dabei bindet die microRNA an das komplementäre mRNA-Molekül, welche dann durch Ago2 fragmentiert wird. Dabei benötigt der komplementäre Teil keine vollkommene Übereinstimmung der Basenpaare. Dieser Prozess spielt sich in den P-Bodies der Zelle ab (Lynam-Lennon et al. 2009; Sen und Blau 2005).

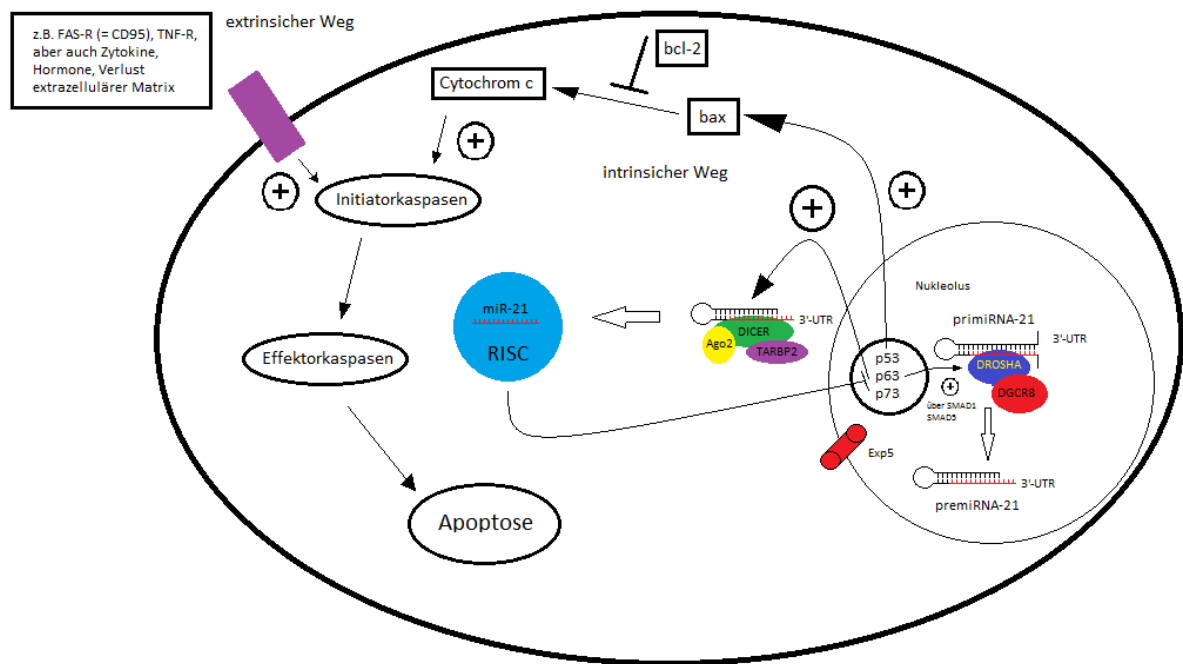


Abbildung 2 Einfluss von microRNA auf das Apoptosesystem

modifiziert nach Lodish sowie Boominathan (Lodish 2004, S. 973; Boominathan 2010b)

Besitzt die microRNA zu wenig komplementäre Stellen, speichert der RISC Komplex die Ziel microRNA in P-Bodies, unter Stress können die gespeicherten microRNAs wieder in den Translationszyklus eingeschleust werden. Es ist dabei nicht notwendig, dass die microRNA perfekt komplementär zur Ziel microRNA ist. Es wird vermutet, dass hierdurch eine einzige microRNA mehrere Zielgene regulieren kann (Lynam-Lennon et al. 2009; Breving und Esquela-Kerscher 2010; Cannell et al. 2008; Fabian et al. 2010; Sen und Blau 2005; Pratt und MacRae 2009).

2.2.5.3. Inhibition der ribosomalen Translation

Zum anderen unterdrückt RISC die ribosomale Translation der mRNA. Dies geschieht auf zwei unterschiedlichen Wegen.

Die Initiation der Translation kann einmal durch komplementäre microRNA, welche sich am Ansatzpunkt des Initiationsfaktors anlagert, blockiert werden (Filipowicz et al. 2008; Wakiyama et al. 2007). Zum zweiten kann die komplementäre microRNA die Bindungsstelle der ribosomalen 60 S Untereinheit inhibieren (Chendrimada et al. 2007; Maroney et al. 2006). Beide Wege führen zu einer unterdrückten ribosomalen Proteinsynthese (Maroney et al. 2006).

2.2.5.4. Gene Silencing durch RISC

Einige RISCs besitzen die Fähigkeit Gene auszuschalten, indem sie Histon-Methyltransferasen dazu bringen Heterochromatin an dem markierten Genlokus anzubauen. So gesehen greifen diese RISCs in die Transkription ein und werden deshalb auch RNA-induced transcriptional silencing complex genannt (Pratt und MacRae 2009; Verdell et al. 2004; Noma et al. 2004).

2.2.5.5. Regulatorische Eigenschaften

Die Vielfalt der microRNAs wird deutlich, wenn man deren Expressionsmuster näher betrachtet. Dieses ist abhängig von Gewebe- und Zelltypus sowie dem Entwicklungsstand der Zelle (Cao et al. 2006; Heindl et al. 2014; Bernstein et al. 2003; Harfe et al. 2005). Bisher wurden im Menschen unterschiedlichste regulatorische Eigenschaften der microRNAs beschrieben. So koordinieren sie in der Embryogenese wichtige Schritte, wie die Ausdifferenzierung von Stammzellen sowie die Ausbildung von Extremitäten, Muskeln und Organen (Cao et al. 2006; Heindl et al. 2014; Braun und Gautel 2011; Harfe et al. 2005; Bernstein et al. 2003; Boominathan 2010b). Darüber hinaus steuert eine ganze Reihe von microRNAs auch im adulten Organismus den Zellzyklus mit (Mizoguchi et al. 2012; O'Donnell et al. 2005; Lynam-Lennon et al. 2009; Wan et al. 2011; Ory und Ellisen 2011). Im Immunsystem und bei der Entstehung von Entzündungen sowie bei der Entwicklung von T-Zellen spielen sie eine entscheidende Rolle (Bi et al. 2009; Ochs et al. 2011). Auch die Apoptose, das heißt sowohl extrinsischer Weg (Typ I) als auch intrinsischer Weg (Typ II) werden durch microRNAs moduliert. Zum Beispiel wird eines der zentralen Proteine des intrinsischen Weges Bcl-2 (b-cell lymphoma 2) durch microRNA-15 und microRNA-16 reguliert. Für

den extrinsischen Weg wurde gezeigt, dass microRNAs die Sensitivität der Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand Kaskade regulieren (Lynam-Lennon et al. 2009). Hierdurch wird deutlich, dass veränderte, unphysiologische Expressionsmuster und Konzentrationen dieser steuernden microRNAs eine geregelte Apoptose unterbinden können und aus diesen Zellen demnach entartete Zellklone entstehen können. Manche microRNAs werden daher auch als Onkogene bezeichnet. Andere wiederum unterdrücken explizit die Tumorentstehung und werden als Tumorsuppressoren bezeichnet (Jung et al. 2012). Diese Beobachtung eröffnet große Möglichkeiten für die Zukunft. So ist es denkbar, dass Krebsarten nach ihren microRNA Expressionsmustern eingeteilt werden und auf dieser Basis als Tumormarker Verwendung finden (Yang et al. 2011; He et al. 2016b; Arantes et al. 2017; Hedbäck et al. 2014; Chen et al. 2017; Ren et al. 2014). Auch als Therapiemöglichkeit bei anderen pathologischen Zuständen wie Herzinfarkt und neurodegenerative Erkrankungen werden microRNAs diskutiert (Sun et al. 2017; Fiedler et al. 2011; Ridolfi und Abdel-Haq 2017; Saraiva et al. 2017). Komplementäre microRNAs, auch si-microRNAs genannt, blockieren spezifisch die entgleiste microRNA, senken ihre zytoplasmatische Aktivität wieder auf ein physiologisches Niveau und könnten somit deren regulatorische Aufgabe wieder gewährleisten (Wang et al. 2015; Li und Li 2013; Boominathan 2010b).

2.2.5.6. microRNA und DNA – Gegenseitige Steuerung

Epigenetik ist eine vererbare Veränderung der Genexpression ohne Veränderung der Gensequenz. Die beiden wichtigsten Merkmale sind: 1. DNA Methylierung und 2. Histon Modifizierung (Gomes und Gomez 2008; Wan et al. 2011; Kozaki et al. 2008; Jackson et al. 2002). MicroRNAs beeinflussen die epigenetischen Mechanismen, werden aber selbst wiederum durch epigenetische Mechanismen gesteuert. Dabei wird das Schlüsselenzym der DNA Methylierung, die DNA Methyltransferase, als potenzielles Ziel von microRNAs angenommen (Gomes und Gomez 2008; Kozaki et al. 2008). DNA Methylierung-Inhibitoren regulieren die Expression mancher microRNAs hoch. So lässt sich der antikanzerogene Effekt von epigenetischen Medikamenten erklären, indem epigenetisch stillgelegte Gene sowie tumorsuppressive microRNAs, die onkogene mRNAs runterregulieren, die Apoptosekaskade wieder aktivieren (Gomes und Gomez 2008; Kozaki et al. 2008).

2.2.5.7. Einfluss von microRNAs auf die Apoptoseproteine p53, p63 und p73

Die p53 Genfamilie und microRNAs bilden ein komplexes funktionales Netzwerk, in denen p53 Proteine und microRNAs sich gegenseitig regulieren (Blandino und Moll 2014; Christoffersen et al. 2010; Boominathan 2010b).

Es wurde gezeigt, dass eine Reihe von microRNAs transkriptionelle Ziele von p53 sind. Sie helfen p53 das Zellwachstum zu arretieren und die Apoptose einzuleiten. Die Tumorsuppressoren p53, p63 und p73 wirken sowohl als positive als auch als negative Regulatoren der microRNA Processing Komponenten. Die meisten der microRNAs werden von p53 über ihr 3'-UTR kontrolliert. p53, p63 und p73 regulieren die größten Komponenten wie Drosha-DGCR8, Dicer-TRBP2 und Argonaute Proteine. Insbesondere steuern p53, p63 und p73 das Processing von microRNAs, darunter auch microRNA-21. Es gibt Hinweise darauf, dass p63 und Dicer in reziproker Beziehung zu einander stehen (Boominathan 2010b).

2.2.5.8. Die p53 Familie: Zusammenarbeit und Konkurrenz in epithelalem Krebs

In den meisten Krebsarten ist eine Mutation oder Deletion von p53 zu beobachten. Im Gegensatz dazu spielen p63 und p73 individuelle Rollen in tumorspezifischem, aber auch physiologischem Kontext: p73 führt zu genomischer Stabilität und vermittelt Chemosensitivität, während p63 diese p53 ähnlichen Eigenschaften fehlen und anstatt dessen Proliferation und Zellüberleben fördert (Ory und Ellisen 2011; Ragos et al. 2018; Moses et al. 2019; Liu et al. 2016; Irwin et al. 2003; Strano und Blandino 2003; Kajiwara et al. 2018; Soares und Zhou 2018).

Beide Apoptoseproteine, p63 und p73, werden in zwei vorherrschenden Isoformen exprimiert, welche sich aus einer unterschiedlichen Promotornutzung ergeben. Die TAp63/TAp73 Isoformen beinhalten eine N-terminale Domäne und ähneln am stärksten p53, während die Δ Np63/ Δ Np73 Isoformen eine verkürzte N-Endung besitzen. Andere Isoformen von p63 und p73 werden durch alternatives, C-terminales mRNA Spleißen gebildet (Ory und Ellisen 2011; Soares und Zhou 2018; Vikhрева et al. 2018).

TAp63/TAp73 Isoformen vermitteln überwiegend transkriptionelle Aktivierung, während Δ Np63/ Δ Np73 Isoformen als transkriptionelle Aktivatoren und Repressoren von verschiedenen transkriptionellen Zielgenen wirken. Unterschiedliche Studien konnten p53 ähnliche Funktionen von p73 nachweisen, hauptsächlich in Bezug auf die genomische Stabilität sowie die Regulation der Apoptose. Im Gegensatz dazu hält p63

hauptsächlich die regenerative Proliferation und das Überleben des Epithels aufrecht (Strano et al. 2001; Stiewe und Pützer 2001; He et al. 2016a; Su et al. 2012; Le Li et al. 2018; Ory und Ellisen 2011). Die Apoptoseproteine p63 und p73 zeigen eine isoformspezifische Expression und Funktion in Karzinomen. In Plattenepithelkarzinomen und bestimmten Brustkrebsarten ist die vorherrschende p63 Isoform $\Delta Np63\alpha$, welche sehr eng mit dem Zellüberleben und dem Adhäsionssignalweg verbunden ist, während in demselben Tumor proapoptotische TAp73 Isoformen überwiegen (Rocco et al. 2006; Nekulova et al. 2016; Ory und Ellisen 2011). Es erscheinen multiple funktionelle Interaktionen zwischen diesen beiden Isoformen, die für das Fortbestehen des Tumors wichtig sind. Das beinhaltet auch direkte Interaktionen zwischen p63 und p73 durch ihre homologen Domänen und Regulation von gemeinsamen transkriptionellen Zielgenen durch direktes Binden an den Promotor, was über stark homologe DNA Bindungsdomänen vermittelt wird (Blandino und Dobbstein 2004). TAp63 und $\Delta Np63$ sind beides Isoformen des TP63 Gens. TAp63 spielt vor allem in der Apoptoskaskade eine entscheidende Rolle. Außerdem wurde gezeigt, dass es einen Einfluss auf die weibliche Keimzellbildung besitzt. $\Delta Np63$ wirkt an der Entwicklung der Haut mit und steuert Prozesse in der adulten Stammzellentwicklung. Das TP63 Gen ist eng mit den anderen Apoptosegenen TP53 und TP73 verwandt. Es gibt Hinweis, dass sich TP53 und TP73 aus TP63 im Laufe der Evolution entwickelten und dass durch γ -Strahlung in der Meiose arretierte Oozyten eine TAp63 abhängige Apoptose durchlaufen (Blandino und Moll 2014; Skipper 2007).

In Plattenepithelkarzinomen und dreifach negativem Brustkrebs (triple-negative breast cancer: fehlende Expression von Östrogenrezeptoren, Progesteronrezeptoren und verstärkendem human epidermal growth factor HER2) hängt das Tumorzellüberleben von der Fähigkeit von $\Delta Np63\alpha$ mit TAp73 zu interagieren und somit die p73 abhängige Apoptose außer Kraft zu setzen ab. $\Delta Np63\alpha$ bindet auch an einen repressiven Komplex von p73 regulierten apoptotischen Genpromotoren, die eine zusätzliche Möglichkeit der funktionellen p73 Suppression bieten (Rocco et al. 2006; Lu et al. 2011; Nekulova et al. 2016; Si et al. 2016).

2.2.5.9. microRNA abhängige Regulation in Karzinomen und die p53 Familie

Verschiedene microRNAs wurden bis jetzt mit der p53 Familie in Verbindung gebracht. Vor allem microRNA-34a ist ein direktes transkriptionelles Ziel von p53, welches zu den p53 abhängigen Funktionen durch Interaktion mit p53 regulierten mRNAs beiträgt

(Rokhlin et al. 2008; Luan et al. 2010; Hermeking 2010; Kasinski und Slack 2010; Ory und Ellisen 2011; Christoffersen et al. 2010). Zusätzlich wurde gezeigt, dass mehrere microRNAs p53 inhibieren, was darauf schließen lässt, dass diese microRNAs als tumorproliferative Onkogene wirken (Kumar et al. 2011; Liu et al. 2019; Hermeking 2010; Ory und Ellisen 2011).

TAp63 Isoformen funktionieren in bestimmten Karzinomarten durch Regulation eines microRNA abhängigen Signalwegs als Metastasensuppressoren. Es wurde aber mindestens eine microRNA identifiziert, die p63 selbst kontrolliert und die seine Rolle in der Zellentwicklung moduliert (Lin et al. 2014; Ng et al. 2014; Ory und Ellisen 2011). Es wurde an einem Profil von Plattenepithelkarzinomen, die ein hohes Maß an $\Delta Np63\alpha$ exprimieren, gezeigt, dass drei der 10 höchstregulierten microRNAs, microRNA-193a-5p, -602 und -765 an der p73 3'-UTR angreifen. Jede dieser microRNAs wurde durch einen p63 Knockdown induziert, was vermuten lässt, dass es einen microRNA abhängigen p63 Mechanismus gibt um p73 zu aktivieren (Ory et al. 2011; Mamoori et al. 2018; Ory und Ellisen 2011). Die p73 3'-UTR wird direkt durch microRNA-193a reguliert. Um microRNA-193a zu supprimieren wird p63 und seine Bindesequenz benötigt (Ory und Ellisen 2011). Diese Beobachtungen lassen auf eine Signalschleife schließen, in der $\Delta Np63\alpha$ microRNA-193a supprimiert und somit die TAp73 Konzentration erhöht, während TAp73 durch seine 3'-UTR und microRNA-193a supprimiert wird (Ory und Ellisen 2011).

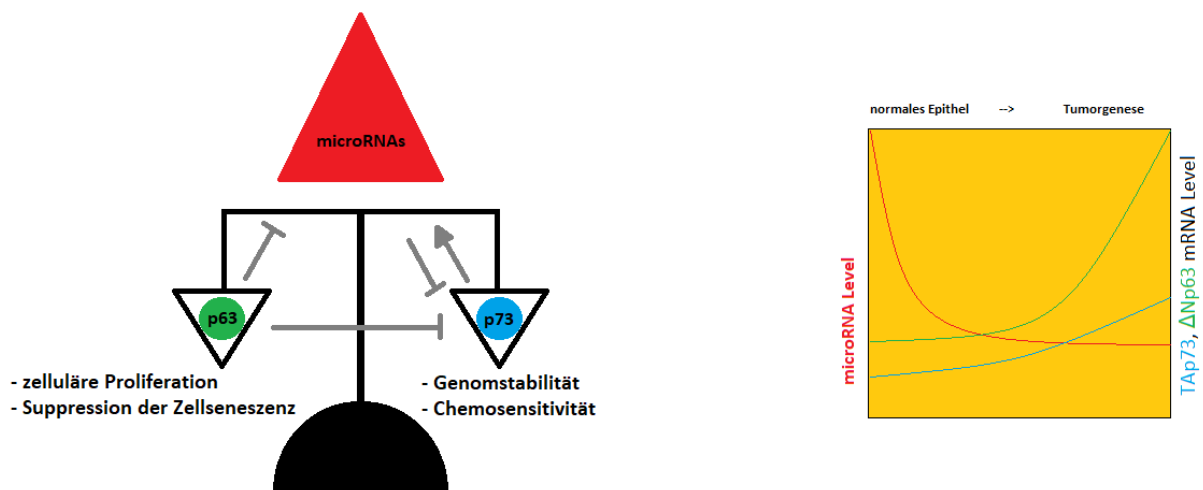


Abbildung 3 Interaktion und Abhängigkeit zwischen microRNA und den Apoptoseproteinen p63 und p73

modifiziert nach Ory und Ellisen (Ory und Ellisen 2011)

2.2.5.9.1. p53 ist ein Regulator des microRNA Processing Komplexes

Unter physiologischen Bedingungen liegt p53 in seiner inaktiven Form vor, somit sind seine transkriptionellen Ziel mRNAs kaum exprimiert. Daraus resultiert wiederum die Stabilisierung von Dicer, was zum Processing der microRNAs führt. Als Antwort auf eine Stresssituation wird p53 aktiviert und somit unterdrücken die Ziel microRNAs die Funktion von Dicer (Goeman et al. 2017; Boominathan 2010b). Es gibt Hinweise darauf, dass Dicer ein transkriptionelles Ziel von p53/p63/p73 ist. Ein bevorzugtes Ziel ist p63, genauer genommen dessen Sequenz „CGTG“. Die Bindungssequenz von p53 ist „CATG“, allerdings weit weniger präferiert als bei p63 (Boominathan 2010b). p53 reguliert die Expression von Dicer in Karzinomen des Kopf- und Hals-Bereiches durch seine transkriptionellen Ziel microRNAs: microRNA-192, -215, -29a/b/c, -148, -15/16a, -206 und -103. Das lässt darauf schließen, dass p53/p63/p73 sowohl die transkriptionelle als auch die post-transkriptionelle Ebene reguliert. Es wurde gezeigt, dass diese p53 assoziierten microRNAs Wachstumsarretierung und Apoptose induzieren (Braun et al. 2008; Boominathan 2010b; Lezina et al. 2013; Ma et al. 2013; Hong et al. 2014). Da der Tumorsuppressor p53 ein negativer Regulator von Stammzellproliferation und neuprogrammierenden Faktoren (z.B. Nanog, Oct-4, Klf4, Sox-2, lin-28 und c-Myc) ist, verwundert es nicht, dass er auch als negativer Regulator von Dicer funktionieren könnte (Lin et al. 2005; Ng et al. 2014; Boominathan 2010b; Mojsin et al. 2015; Sachdeva et al. 2009). Es wurde gezeigt, dass microRNAs die Expression der Tumorsuppressoren p53 (microRNA-125a/b) und p63 (microRNA-92, -21, -302 und -203) inhibieren. Darüber hinaus kann p53 aber auch die Expression von microRNA-125b und -22 unterdrücken und somit seine eigenen negativen Regulatoren inhibieren (Zhang et al. 2009a; Le et al. 2009; Okumura et al. 2014; Boominathan 2010b).

2.2.5.9.2. p63 ist ein Regulator des microRNA Processing Komplexes

Zwischen der WW Domäne von DGCR8 und der PY Domäne von p63 gibt es eine Sequenzübereinstimmung, die eine Interaktion möglich macht. Außerdem wurde noch gezeigt, dass Drosha durch seine PY Domäne mit der WW Domäne von DGCR8 interagiert. Zusammengenommen lassen diese Daten auf folgende Aussagen schließen, zum einen, dass p63 und DGCR8 eine gemeinsame Interaktionsdomäne besitzen, zum anderen, dass p63 ein Teil des Microprocessor Komplexes im Nukleus sein könnte und dass p63 die Processing Möglichkeit von microRNAs durch DGCR8 beeinflussen könnte (Zhang et al. 2007; Cimmino et al. 2005).

2.2.5.9.3. p73 ist ein Regulator des microRNA Processing Komplexes

Das Apoptoseprotein p73 erhöht die Expression von Ago-1/2 und somit auch das Processing von microRNAs wie let-7 (HMGA2, lin-28, EGFR, Kras, c-myc, Bcl-xL), microRNA-134 (Nanog, LRH1, Oct-4, Collagenase-3, Stromelysin), -130b (ERK2, Fosl 1, TGF β R1, E α , Tcf-4, Collagenase-3, Ago4, Dicer, p63), -214 (EZH2, CTNNB1), -449a (CDK6, SirT1, HDAC1, E2F-1), -503 (CCND1, Fosl 1), -181d (ERK2, TGF β R1, Tcl-1, E α , AID, Bcl-2) und -379 (lin-28) (Schwamborn et al. 2009; Boominathan 2010b, 2010a; Gonzalez-Cano et al. 2013). Eine Erhöhung der Expression dieser eben genannten microRNAs aktiviert Tumor-suppressormechanismen und unterdrückt somit die epitheliale mesenchymale Transition (EMT epithelial to mesenchymal transition), die Metastasierung sowie die Krebsstammzellproliferation (Boominathan 2010b). Let-7 und lin-28 (RNA Bindungsprotein) inhibieren gegenseitig ihre Expression. TAp73/p63/p53 inhibieren über let-7 die Expression von lin-28, dadurch können sie die microRNA Processing Effizienz regulieren (Boominathan 2010b). TAp73/p63 erhöht die E-cadherin (negativer Regulator der EMT) Expression, durch seine Ziel microRNAs (microRNA-192, -215, -145, -203, -200b, -200c, -183, -92a/b, -132 und -30a-e) supprimiert es ZEB1/2. Dies weist darauf hin, dass TAp73/p63 als Suppressor von Metastasenbildung wirkt (Schwamborn et al. 2009; Boominathan 2010b; Lu et al. 2015; Ory und Ellisen 2011; Zhang et al. 2012).

2.2.5.9.4. Interaktion von p63/ Δ Np63 mit microRNA-21

p63/ Δ Np63 bindet an Smad5 (intrazelluläres Signalprotein von Wachstumsfaktoren) und reguliert so womöglich die von Smad5 kontrollierte Signalkaskade. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Smad5/1 mit Drosha/p68 interagiert und somit das Processing der pri-microRNA-21 steuert. Das könnte darauf schließen lassen, dass Δ Np63 durch Bindung an Smad5 die Verbindung zwischen Drosha und pri-microRNAs fördert (Boominathan 2010b).

Des Weiteren wurde belegt, dass Foxo3a, ein Transkriptionsfaktor, welcher die Zellteilung sowie das Zellwachstum bremst, die Expression von microRNA-21 inhibiert und dass p53 die Expression von Foxo3a durch sein transkriptionelles Ziel HDM2 unterdrückt. Darüber hinaus wurde noch gezeigt, dass microRNAs die Foxo Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Li et al. 2017a; Boominathan 2010b). Eine Schlussfolgerung daraus ist, dass p53/TAp73 die Expression von microRNA-21 induzieren könnte. microRNA-21 supprimiert die Expression von TAp63/p53, was ein

Indiz dafür ist, dass es eine Feedback Schleife zwischen Δ Np63/p53/TAp63/p73 und microRNA-21 gibt. Somit kann Δ Np63 durch Erhöhen der microRNA-21 Expression die Expression der Tumorsuppressorgene, inklusive TAp63 und p53 unterdrücken (Boominathan 2010b).

2.2.5.9.5. Induzierte Chemoresistenz durch p63/p73 Feed-Forward Regulierung

Cisplatin ist ein Inhibitor von Δ Np63 α und gleichzeitig ein spezifischer Aktivator für TAp73 abhängige Transkription und Zelltod. Als Antwort auf Cisplatin induziert TAp73 microRNA-193a (Ory und Ellisen 2011). Das führt dazu, dass die Zelle mit microRNA-193a si-microRNA eine erhöhte Chemosensitivität aufweist, indem TAp73 abhängige, apoptotische Gene induziert werden. Dieser Effekt bleibt bei einem TAp73 Knockdown aus (Ory und Ellisen 2011). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Induktion von microRNA-193a durch p63- und p73-abhängige Effekte von Cisplatin die p73-abhängige Chemosensitivität durch direkte Feedback Inhibition limitieren (Ory und Ellisen 2011).

2.2.6. microRNA und orale Plattenepithelkarzinome

2.2.6.1. Gründe für veränderte microRNA Expressionsmuster

Die Gene, welche für microRNAs kodieren sind häufig auf instabilen Regionen, die im Zusammenhang mit oralen Plattenepithelkarzinomen stehen, lokalisiert (Wu et al. 2011; Henson et al. 2009). Sie weisen häufig ein verändertes microRNA Expressionsmuster auf (Chang et al. 2008). Zum Beispiel liegen microRNA-100 und -125b auf dem Chromosom 11q und sind durch den Verlust von Chromosomenmaterial signifikant erniedrigt (Wu et al. 2011; Henson et al. 2009).

Eine verminderte Expression, der für die microRNA-Genese essentiellen Enzyme Dicer und RNase III Endonuclease, führt zu einer Runterregulierung von microRNA in bestimmten menschlichen Krebszelllinien. Dicer ist ein direktes Ziel der let-7 Familie, es wurde gezeigt, dass als Folge von reduzierter let-7b überexprimierter Dicer die Zellproliferation in oralen Plattenepithelkarzinomen ermöglichte (Wu et al. 2011; Bernstein et al. 2003).

2.2.6.2. Die Auswirkung einer erhöhten intrazellulären microRNA Expression

Eine erhöhte Konzentration von microRNA-184 wurde in Zungenkarzinomen gezeigt (Wong et al. 2008). Diese microRNA wirkt sich anti-apoptotisch und daher proliferativ aus. Die Inhibition von microRNA-184 führt dazu, dass die intrazelluläre c-Myc-Konzentration fällt. c-Myc ist das Protein des Myc-Gens, welches die Expression von

Genen durch Bindung an Enhancer Box Sequenzen (E-boxes) und die Aktivierung von Histon-Acetyltransferasen reguliert (Wu et al. 2011; O'Donnell et al. 2005).

Ebenso zeigt microRNA-24 in oralen Plattenepithelkarzinomen eine erhöhte Expression. Sie bindet direkt an das RNA-bindende Protein DND1 (dead end 1), welches für die Apoptoseresistenz und die Proliferation durch Herunterregulieren von CDKN1B (cyclin-dependent kinaseinhibitor 1B, downstream Gen von DND1) verantwortlich ist (Wu et al. 2011). Auch für microRNA-375 wurde gezeigt, dass diese überexprimiert wird. Dies ist im Zusammenhang mit Alkoholkonsum zu beobachten. Normalerweise unterdrückt microRNA-375 die Zellproliferation und akkumuliert die Zellen in der sub-G1-Phase der Interphase im Zellzyklus (Wu et al. 2011).

2.2.6.3. Die Auswirkung einer verminderten intrazellulären microRNA Expression

Die microRNAs -133a, -133b, -137, -193a, -125b und -100 sind in oralen Plattenepithelkarzinomen runterreguliert. Die Transduktion von pre-microRNA-133a und -133b in Zellen des Zungenkarzinoms führt zu verminderter Zellproliferation und vermehrter Apoptose. Mit der Runterregulierung von microRNA-133a und -133b ist eine erhöhte Konzentration der onkogenen PKM2 (pyruvate kinase type M2) vergesellschaftet. Dies ist ein Hinweis auf Inhibition der PKM2 durch microRNA-133a und -133b. Ähnlich verhält es sich mit microRNA-137 und -193a, diese regulieren die Expression der CDK6 und des E2F6 (E2F transcription factor 6) runter. Als Konsequenz resultiert ein vermindertes Zellwachstum in oralen Plattenepithelkarzinomen. Darüber hinaus sind microRNA-125b und -100 als Tumorsuppressoren beschrieben, welche die Zellproliferation inhibieren. Ebenso sind microRNA-503 und microRNA-15a im Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Hals-Bereiches herunterreguliert. Physiologisch unterdrücken sie Cyclin D1 und Cyclin E, was zu einer Inhibition der DNA-Synthese führt (Wu et al. 2011).

2.2.6.4. microRNAs und Metastasierung im Karzinom des Kopf- und Hals-Bereiches

Eine verminderte Expression von microRNA-138 und -222 in oralen Plattenepithelkarzinomen zeigt verstärktes Potenzial zur Metastasierung. MicroRNA-138 spielt eine Rolle durch Inhibition von RhoC und ROCK2 (Rho associated coiled-coil containing protein kinase), zwei Schlüsselgene des RhoGTPase Signalweges. Rho Proteine organisieren das Aktin Zytoskelett und regulieren die Zellform und die Motilität der Zelle. Die Wiederherstellung eines physiologischen microRNA-138

Spiegels inhibiert die Expression von RhoC und ROCK2, was dazu führt, dass das Zytoskelett reorganisiert wird. Die Zellmorphologie normalisiert sich wieder und die Metastasierung wird unterdrückt (Wu et al. 2011; Jiang et al. 2010).

Die Matrix Metalloproteinase 1 (MMP1) ist in den Umbau der Extrazellulärmatrix involviert, was zu Tumorzellinvasion und -migration führt. MicroRNA-222 verhindert die Expression von MMP1 direkt, durch Binden an die 3'-UTR der MMP1 mRNA und indirekt, durch Inhibition durch Binden an die 3'-UTR der SOD2 mRNA (Manganese Superoxide Dismutase 2). Als Folge dessen zeigt sich die Unterdrückung von Metastasierung in Zungenkarzinomen (Wu et al. 2011). In oralen Plattenepithelkarzinomen ist die microRNA-21 Expression erhöht und mit den am weitesten fortgeschrittenen nodalen Metastasen sowie vaskulärer Invasion assoziiert (Wu et al. 2011). In vitro führt das erhöhte Expressionsmuster zu verstärkter Zellproliferation, Migration und gleichzeitige verankerungsunabhängige Bildung von Zellkolonien (Wu et al. 2011). HIFs (Hypoxie induzierender Faktor) regulieren viele Gene, die in die Tumorangio-genese und -metastasierung involviert sind (Kowshik et al. 2017). In Zellen des Plattenepithelkarzinoms des Kopf- und Hals-Bereiches wurde gezeigt, dass überexprimierte microRNA-31 direkt die Expression von FIH (factor-inhibiting hypoxia-inducible factor), einem Inhibitor von HIF unterdrückt und die HIF Kaskade aktiviert (Wu et al. 2011).

2.2.6.5. microRNA-21 und ihre Bedeutung für die Apoptose

Über microRNA-21 wurden in den letzten Jahren immer mehr Erkenntnisse gewonnen. So wurde gezeigt, dass eine Überexpression von microRNA-21 den PDCD4-Rezeptor, ein Tumorsuppressorprotein (programmed cell death 4) blockiert und somit die Apoptose behindert (Reis et al. 2010; Shen et al. 2014; Alder et al. 2012). Dieser Rezeptor liegt normalerweise während des Apoptosevorgangs überexprimiert in der Zelle vor. Wird nun microRNA-21 inhibiert, so wurde gezeigt, dass die Apoptose daraufhin wieder regelrecht stattfinden kann (Lynam-Lennon et al. 2009). Als weiteres Ziel von microRNA-21 wurde der Tumorsuppressor Tropomyosin 1 (TPM1) identifiziert, eine Überexpression von microRNA-21 blockiert selbigen. Hier wirkt microRNA-21 als Onkogen (Lynam-Lennon et al. 2009).

2.2.6.6. Alteriertes Expressionsniveau von microRNA-21 in unterschiedlichen malignen Karzinomen

2.2.6.6.1. Mammakarzinom

In unterschiedlichsten Karzinomtypen konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von microRNA-21 verändert ist, z.B. wurde für das Mammakarzinom eine reduzierte Expression gezeigt (Zhang et al. 2007).

2.2.6.6.2. Glioblastoma multiforme

Auch in Glioblastomen (Glioblastoma multiforme) fällt die starke Überexpression von microRNA-21 (im Gegensatz zum Mammakarzinom) auf. Es gibt Hinweise, dass der Knockdown von microRNA-21 in kultivierten Glioblastomzellen zur Aktivierung von Caspasen und somit zum Zelltod führt. Interessanterweise spielt microRNA-21 eine Rolle in der Chemotherapie. Die Inhibition zeigte eine Sensitivierung für Chemotherapeutika bei Gliomen auf (Li et al. 2011).

In einem Vergleich der unterschiedlichen microRNA Expressionsmuster der Cisplatin-sensitiven TSCC (squamosa cell carcinoma) Zelllinie (Tca8113) und seiner Cisplatin-resistenten Sublinie (Tca/cisplatin) wurde gezeigt, dass 19 von 480 microRNA Expressionsmuster zwischen den beiden Zelllinien unterschiedlich waren. Dabei fiel auf, dass das Expressionsmuster von microRNA-21 in den Tca/cisplatin Zellen erniedrigt war. Es stellte sich heraus, dass durch Transfektion eines pre-microRNA-21 Plasmids die Resistenz gegenüber Cisplatin abgeschwächt wird. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass microRNA-21 die Zelle chemosensitiviert (Wu et al. 2011; Yu et al. 2010).

2.2.6.6.3. Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Hals-Bereiches

Die microRNA-21 Expression in Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf- und Hals-Bereiches fällt im Vergleich zu physiologischen Plattenepithelzellen zu hoch aus, das heißt, das entsprechende Gen wird überexprimiert (Wu et al. 2011; Boldrup et al. 2012; Tseng et al. 2017). Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms weisen oftmals eine microRNA-21 Überexpression auf. In Zungenkarzinomen zum Beispiel ist die hohe Expressionsrate von microRNA-21 mit einer niedrigen Konzentration des Tumorsuppressors TPM1 und der Phosphatase PTEN (phosphatase tensin homologue) assoziiert, was zu einer verminderten Apoptoserate führt (Wu et al. 2011; Ren et al. 2014; Pan et al. 2017). Außerdem wurde gezeigt, dass es durch die Inaktivierung von microRNA-21 durch si-microRNA-21 zur Induktion der Apoptose

kommt und das Wachstum unabhängig von der Verankerung unterdrückt wird. Der gleiche Effekt wurde durch Unterdrücken von TPM1 durch siRNA erzeugt (Wu et al. 2011).

2.3. Fragestellung

Vor dem Hintergrund der gemachten Ausführungen wird die Bedeutung der microRNAs für Zellproliferation, Apoptose und darüber hinaus für die Karzinogenese deutlich. Durch die unterschiedlichen Ansatzpunkte der Radio- sowie der Chemotherapie ergeben sich Vorteile gegenüber einer Monotherapie. So können strahlenresistente Zellen durch die Chemotherapie und umgekehrt chemoresistente Zellen durch die Radiotherapie erfasst werden. Ein weiterer Effekt ist, dass Chemotherapien wie Cisplatin und 5-FU die Zellen für eine Radiotherapie sensitivieren können (Begg et al. 1986; Kanotra et al. 2011; Lawrence et al. 1997). Daraus ergibt sich die Frage, ob weitere Agenzien existieren, die die Zellen für eine Strahlentherapie sensitivieren. Um Nebenwirkungen im Sinne des Patienten zu vermeiden, könnte die prospektive Bestimmung von Markern in der histologischen Untersuchung schon im Vorfeld die Therapieoptionen spezifizieren. Bei einer hohen Strahlensensitivität würde primär eine Radiatio zum Einsatz kommen. Bei fehlender Strahlensensitivität der Zellen wäre eine chirurgische Resektion die Therapie der Wahl. Da eine veränderte Expression von microRNAs bereits in einer Vielzahl von Tumoren festgestellt wurde, könnte diese einen Ansatzpunkt für die Bestimmung der Strahlensensitivität darstellen und demnach die Optionen für zukünftige Therapieregime charakterisieren. Insbesondere microRNA-21 fällt durch ein verändertes Expressionsprofil in einer Vielzahl von Malignomen sowie einem strahlentherapeutischen Effekt bei anderen Karzinomen auf (Li et al. 2017b; Zhu et al. 2015; He et al. 2017; Gwak et al. 2012; Li et al. 2011).

In Hinblick auf einen möglichen Einfluss von microRNA-21 auf die Strahlensensibilität bei Karzinomen der Kopf-Hals-Region soll daher im in vitro Ansatz überprüft werden, ob γ -Strahlen einen Einfluss auf die Expression von microRNA-21 auf Karzinomzellen der Reihen PCI-1,-13 und -52 sowie SCC-68 hat und das Expressionsprofil mit Effekten auf Zellviabilität und Apoptose unter Bestrahlung einhergeht.

3. Materialien und Methodik

3.1. Materialien

3.1.1. Laborgeräte

| | |
|---|-------------------------------------|
| Brutschrank, Function Line, Thermo Scientific | Waltham, USA |
| Gefrierschrank Forma 900 Series, Thermo Scientific | Waltham, USA |
| Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer | Waltham, USA |
| Klickzähler, IVO | Villingen-Schwenningen, Deutschland |
| Kühl- und Gefrierschrank bis -20°C, Premium NoFrost, Liebherr | Ochsenhausen, Deutschland |
| Mikroplattenleser, Versa Max microplate reader tunable, Molecular Devices | Sunnyvale, USA |
| Mikroskop, Leica DM IL, Leica | Wetzlar, Deutschland |
| Mikroskop, Leica DM LB, Leica | Wetzlar, Deutschland |
| Neubauerkammer, Kammerhöhe 0,1 mm, Neubauer improved, Marienfeld | Lauda Königshofen, Deutschland |
| Personal Computer, IBM | |
| Pipette, Accu jet pro, Brand | Wertheim, Deutschland |
| Pipette 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl, Gilson | Middleton, USA |
| Real Time PCR Gerät, BioRad iCycler iQ5 Multicolor, BioRad | Hercules, USA |
| Spektrophotometer, Nano Drop ND-1000, Peqlab | Erlangen, Deutschland |
| Stoppuhr, VWR | Darmstadt, Deutschland |
| Taschenrechner TI-34, Texas Instruments | Dallas, USA |
| Vortex Mischer, IKA ms 3 basic | Staufen, Deutschland |
| Werkbank HERAsafe, Heraeus | Waltham, USA |
| Zellbestrahlungsgerät Gammacell GC-2000 mit ¹³⁷ Cs, Nukleus | Frankfurt, Deutschland |
| Zentrifuge, Fresco 21; Heraeus | Waltham, USA |

| | |
|-------------------------------------|--------------|
| Zentrifuge, Labofuge 400 e, Heraeus | Waltham, USA |
|-------------------------------------|--------------|

3.1.2. Software

| | |
|--|-----------------------|
| Bio-Rad iQ5 Optical System Software v2.1 | Hercules, USA |
| BioTEK Gen5 1.09 | Winooski, USA |
| Nano Drop 1000 Operating Software v3.8.1 | Erlangen, Deutschland |
| IBM SPSS-Software, Version 23 | Armonk, USA |

3.1.3. Chemikalien

| | |
|--|------------------------|
| Aqua ad injectabilia, Braun | Melsungen, Deutschland |
| DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco | Karlsruhe, Deutschland |
| DPBS, Dulbecco's Phosphate buffered Saline, Gibco | Karlsruhe, Deutschland |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol 70% und 80%, hergestellt aus Ethanol absolut, AppliChem, und Aqua ad injectabilia, Braun | |
| Ethanol absolut 100% (EtOH), AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| FBS, fetales bovines Serum, Gibco | Karlsruhe, Deutschland |
| L/G, L-Glutamin, Gibco | Karlsruhe, Deutschland |
| Lipofectamin 2000, Invitrogen | Karlsruhe, Deutschland |
| Opti-MEM serumfreies Medium, Gibco | Karlsruhe, Deutschland |
| PSN, Penicillin, Streptomycin, Neomycin, Gibco | Karlsruhe, Deutschland |
| Qiazol Lysis Reagens, Qiagen | Hilden, Deutschland |
| RNase freies Wasser, peqlab | Erlangen, Deutschland |
| Serumfreies Medium, Opti-Mem, Gibco | Karlsruhe, Deutschland |
| Trichlormethan $\geq 99\%$, Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Tris-HCL, Roth | Karlsruhe, Deutschland |

| | |
|------------------------------|------------------------|
| Trypanblau 0,4% 1:5, Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Trypsin-EDTA, PAA | Basel, Schweiz |
| Qiazol Lysis Reagens, Qiagen | Hilden, Deutschland |

3.1.4. Verbrauchsmaterial

| | |
|--|----------------------------|
| Einmalschutzhandschuh, Sempercare premium, Semperit | Wien, Österreich |
| Eppendorfröhrchen, 1,5 ml, Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Eppendorfröhrchen und zugehörige Deckel, 2 ml, Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Kulturflasche 250 ml, Cellstar, Greiner bio one | Frickenhausen, Deutschland |
| Labortücher Kimtech Science, Kimberley Clark | Neenah, USA |
| Petrischale ø 3,5 cm, Nuncatom γ -Radiation, nunc | Langenselbold, Deutschland |
| PCR 8er Strips und zugehörige Deckel, Brand | Wertheim, Deutschland |
| Pipettenspitze Glas, 5 und 10 ml, Greiner bio one | Frickenhausen, Deutschland |
| Pipettenspitze, 1, 2, 10, 20, 100, 200, 1000 μ l, Gilson | Middleton, USA |
| Transferpipette 3 ml, PAS3-00, Gosselin | Borre, Frankreich |
| Zentrifugenröhrchen, 15, 50 ml, Greiner bio one | Frickenhausen, Deutschland |

3.1.5. Zelllinien

| Name | Gewebe | Herkunft |
|-------|--|---|
| PCI-1 | Plattenepithelkarzinom der Schleimhäute des Kopf- und Halsbereichs | Pittsburgh Cancer Institute; Theresa L. Whiteside, PhD; Pittsburgh, USA |

| | | |
|--------|--|---|
| PCI-13 | Plattenepithelkarzinom der Schleimhäute des Kopf- und Halsbereichs | Pittsburgh Cancer Institute; Theresa L. Whiteside, PhD; Pittsburgh, USA |
| PCI-52 | Plattenepithelkarzinom der Schleimhäute des Kopf- und Halsbereichs | Pittsburgh Cancer Institute; Theresa L. Whiteside, PhD; Pittsburgh, USA |
| SCC-68 | Plattenepithelkarzinom der Schleimhäute des Kopf- und Halsbereichs | Dana Faber/Harvard Cancer Center; James G. Rheinwald, PhD; Boston, USA |

3.1.6. Oligonukleotide

3.1.6.1. Primer für microRNA real-time PCR

| | |
|---------------|---|
| Hs_miR-21_2 | 5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3' |
| Hs_RNU6-2_1 | miScript Primer Assay von Qiagen (exakte Basenabfolge nur dem Hersteller bekannt) |
| Hs_Scarna17_1 | miScript Primer Assay von Qiagen (exakte Basenabfolge nur dem Hersteller bekannt) |

3.1.6.2. Oligosequenzen der siRNA für microRNA-21 Transfektion der Zelllinien

| | |
|----------------------------|-----------------------------|
| Hs_MIR21_1 FlexiTube siRNA | 5'-TTGAATCTCATGGCAACACCA-3' |
| Hs_MIR21_2 FlexiTube siRNA | 5'-GTCGGGTAGCTTATCAGACTG-3' |

3.1.7. Fertigsätze (Kits)

| | |
|---|----------------------|
| Casapase-Glo® 3/7 Assay, Promega | Fitchburg, USA |
| iTaq™ Universal One-Step RT-qPCR Kit, Bio-Rad | Berkeley, California |
| miRNeasy Mini Kit, Qiagen | Hilden, Deutschland |
| miScript SYBR Green PCR Kit, Qiagen | Hilden, Deutschland |

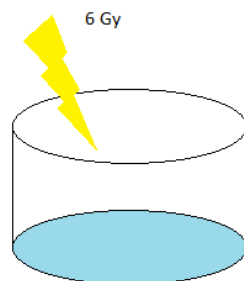
| | |
|------------------------------------|-----------------------|
| miScript II RT Kit, Qiagen | Hilden, Deutschland |
| RNeasy Mini Kit, Qiagen | Hilden, Deutschland |
| WST-1 Assay, Roche Applied Science | Penzberg, Deutschland |

3.2. Methodik

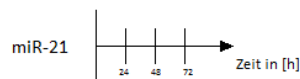
Die microRNA-21 Expression der vier Zelllinien PCI-1, PCI-13, PCI-52 und SCC-68 wurde sowohl ohne als auch nach singularer „γ-Strahlung“ mit 6 Gy verglichen. Meßzeitpunkte waren Beginn (Stunde Null), sowie 24, 48 und 72 Stunden nach der Bestrahlung. Hiernach wurde jeweils microRNA-21 isoliert und mittels real time Polymerasekettenreaktion (qPCR) die Expression ermittelt. Als Referenzgruppe dienten humane orale Keratinozyten (HOK) mit welchen identisch verfahren wurde.

Parallel zur qPCR wurde die Aktivität der Apoptose in den Zellen im Caspaseassay gemessen. Für PCI-1 und PCI-52 lief zusätzlich als Viabilitätstest ein WST-Assay mit, der die Aktivität des Umsatzes von wasserlöslichem Tetrazolium in Formazan durch die Superoxidismutase maß (Peskin und Winterbourn 2000).

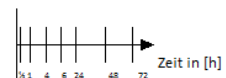
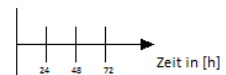
1. Bestimmung der Ruheexpression von miR-21
2. Bestimmung der Expression nach Radiatio mit 6 Gy



Bestimmung der Expression mittels qPCR zu Beginn, nach 24 h, nach 48 h und 72 h



Bestimmung der Apoptose im Caspaseassay



PCI-1
PCI-13
PCI-52
SCC-68

Bestimmung der Zellviabilität mittels WST-Assay (Substratumsatz)

Abbildung 4 Versuchsaufbau zur Bestimmung der microRNA-21 Expression unter Bestrahlung

3.2.1. Zellkultur

In eine 250 ml fassende Kulturflasche wurde jeweils die gewünschte Konzentration an Tumorzellen der Linien PCI-1, PCI-13, PCI-52 oder SCC-68 eingesetzt. Das in der Flasche befindliche Volumen wurde mit Tumormedium (DMEM 1 g Glucose supplementiert und mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin und 1 % PSN) auf 10 ml aufgefüllt.

Die Flasche wurde in einen Inkubator gegeben, in dem folgende Bedingungen herrschten: 37 °C, 5 % CO₂ Fraktion in der mit Wasserdampf gesättigten Inkubatorluft. Nach 3-4 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel bis die Zellen in der Flasche zu ca. 80 % konfluent waren.

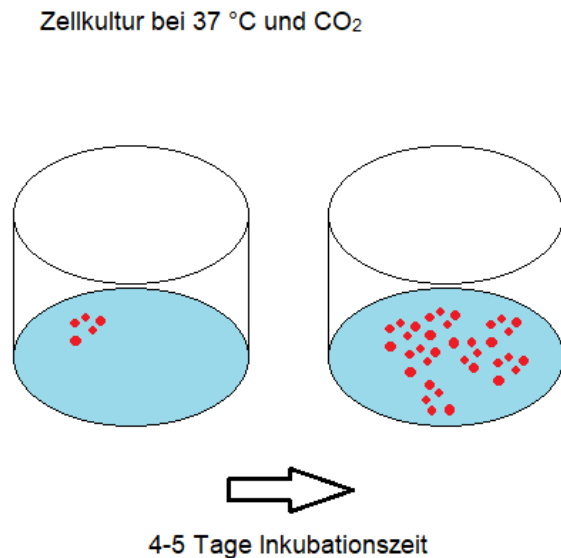


Abbildung 5 Anzüchten der Zellen über 5 Tage

3.2.2. Zellkultur aufteilen

Die adhärenenten Zellen befanden sich in einer 250 ml fassenden Kulturflasche, welche mit 10 ml Tumormedium gefüllt war. Das Tumormedium wurde verworfen und die Flasche mit 10 ml DPBS frei von jeglichem Medium gespült. Im Anschluss wurde das DPBS ebenso verworfen und 5 ml Trypsin-EDTA auf die Zellkultur gegeben, um die Adhärenz der Zellen aufzulösen. Trypsin denaturiert die Proteine, welche an der äußeren Zellmembran sitzen, EDTA fängt als Chelatkomplex freie Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen ein, die aus dem FBS stammen und Trypsin inhibieren würden (Dominguez und Ward 2009). Nach ca. 5 min erfolgte die Kontrolle unter dem Lichtmikroskop, ob alle Zellen abgelöst waren. Die Zugabe von 10 ml Tumormedium stoppte die Trypsinreaktion. Die 15 ml Suspension wurde abpipettiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 10 ml Tumormedium aufgefüllt und mit Medium resuspendiert.

3.2.3. Zellen zählen und auf Petrischalen verteilen

In einem 1,5 ml Eppendorfer Röhrchen wurde 50 μ l Trypanblau mit 50 μ l Zellsuspension gemischt. Davon wurde 20 μ l in eine Neubauerkammer pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Ausgewertet wurden vier große Eckquadrate, die sich aus jeweils 16 kleinen Quadraten zusammensetzen. Die Zellzahl wird wie folgt berechnet:

Gezählte Zellen x Verdünnung (Trypanblau) = Zellzahl/ μ l x 1000 = Zellzahl/ml

Nach Multiplikation der Zellzahl/ml mit der definierten Menge an verwendetem Medium kann die Gesamtzellzahl ermittelt werden. Die Zellzahl wurde für die Zeitwerte t_0 , t_{24} , t_{48} sowie t_{72} ermittelt und in die entsprechenden Petrischalen überführt. Für t_0 sollten 1×10^6 , für t_{24} $0,5 \times 10^6$, für t_{48} $0,3 \times 10^6$ und für t_{72} $0,2 \times 10^6$ Zellen eingesetzt werden. Daraufhin wurde jede Petrischale mit Nährmedium auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt.

3.2.4. Bestrahlung

Die zu bestrahlenden Zellgruppen wurden entweder in 50 ml Falconröhrchen oder in 3,5 cm Petrischalen in die Zellbestrahlungsanlage gesetzt und mit 6 Gy bestrahlt.

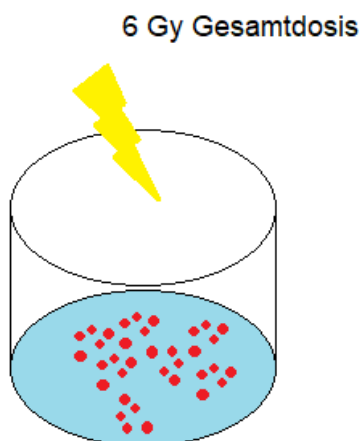


Abbildung 6 Bestrahlung der Zellen mit 6 Gy γ -Strahlung

3.2.5. microRNA Isolation

Die microRNA Isolation erfolgte analog zu den oben genannten Zeitwerten, d.h. am selben Tag der Zellablösung (so unmittelbar wie möglich) wurde für t_0 die microRNA-21 isoliert. Für die anderen Zeitwerte wurde die microRNA nach 24, nach 48 sowie nach 72 Stunden isoliert und entweder eingefroren oder gleich in cDNA

(complementary DNA) umgeschrieben. Das Protokoll der microRNA Isolation wird in Folgendem beschrieben (Qiagen 2012; Chatterjea 2013). Zu Beginn wurde das Nährmedium verworfen. Es erfolgte die Zugabe von 700 µl Qiazol Lysis Reagens, welches Guanidiniumthiocyanat enthält und Durchmischung der Lösung per Pipette. Ziel war der Zerfall der fluiden Zellmembranen, so dass das Zytosol frei vorliegt, und die Inaktivierung von RNasen (Chomczynski und Sacchi 1987; Qiagen 2012; Chatterjea 2013). Anschließend erfolgte die Überführung der Zellbestandteile in ein 1,5 ml Eppendorfer Röhrchen und vortexen desselbigen.

Darauf folgend überführte man die Lösung in einen QIAShredder, welcher der Homogenisierung des Lysats diene, und zentrifugierte dieses für 2 min bei 13.000 min^{-1} . Die nächsten 5 min ruhte der QIAShredder bei Raumtemperatur, der Filter wurde entfernt. Nach Ablauf der Zeit gab man 140 µl Chloroform hinzu und schüttelte das Röhrchen. Daraufhin ruhte das Röhrchen weitere 2,5 min bei Raumtemperatur, so dass sich eine Emulsion ergab. Im darauffolgenden Schritt wurde der Inhalt des Röhrchens in der zuvor auf 4 °C heruntergekühlten Zentrifuge für 15 min bei 12.000 g in drei Phasen unterteilt. In der obersten, farblos wässrigen Phase war die RNA enthalten, aus welcher nun 350 µl mit einer Pipette entnommen wurden. Dazu wurden ebenfalls 350 µl 70 % Ethanol gegeben und gevortext (Qiagen 2012; Chatterjea 2013). Durch das Ethanol wurden die Wasserstoffbrückenbindungen der Proteine und Nukleinsäuren gespalten und hydrophobe Wechselwirkungen aufgehoben (Lottspeich und Engels 2006; Rehm und Letzel 2010; Yuan et al. 2015). Unmittelbar im Anschluss wurde die Lösung in eine RNeasy mini spin column pipettiert und für 15 s bei 10.000 min^{-1} sowie Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss, in dem sich die microRNA befand, wurde in ein neues Eppendorfer 1,5 ml Röhrchen umpipettiert. In dem Säulenfilter lag die restliche RNA an eine Silikamembran gebunden vor. In das Röhrchen mit microRNA fügte man 450 µl 100 % Ethanol hinzu und mischte dieses. Nun wurde eine RNeasy MinElute spin column mit maximal 700 µl befüllt und wiederum für 15 s bei 10.000 min^{-1} zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit der restlichen Lösung nochmals befüllt und erneut in die Zentrifuge gegeben. Daraufhin wurden 500 µl RPE Puffer auf die Säule pipettiert und diese für 15 s bei 10.000 min^{-1} zentrifugiert. Nach Entfernung des Durchflusses aus dem Röhrchen wurden 500 µl 80 % Ethanol der Säule hinzugesetzt und in der Folge für 2 min bei 10.000 min^{-1} zentrifugiert. Das Röhrchen wurde samt Durchfluss verworfen und die Säule der RNeasy MinElute spin column in ein neues 2 ml Röhrchen gesteckt.

Dieses wurde für die nächsten 5 min bei 10.000 min^{-1} zentrifugiert, um die Säule vollständig zu trocknen. Nun wurde die getrocknete Säule in ein neues 1,5 ml Röhrchen überführt und direkt auf die Membran wurden $14 \mu\text{l}$ RNase freies Wasser gegeben. Im Anschluss zentrifugierte man das Röhrchen für 1 min bei 10.000 min^{-1} und hatte jetzt in den $14 \mu\text{l}$ die microRNA vorliegen. Zur Lagerung wurde diese bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ tiefgefroren (Chatterjea 2013; Qiagen 2012).

3.2.6. Isolieren von mRNA

Die ersten Verfahrensschritte zur Isolation von mRNA und microRNA waren, da es sich bei beiden Molekülen um RNA handelt, identisch. Unter dem Punkt „microRNA Isolation“ sind die wesentlichen Arbeitsschritte aufgelistet. Sobald die RNA an der Silikamembran der RNeasy mini spin column gebunden war, wurde der Filter in ein neues 1,5 ml fassendes Röhrchen gesetzt und es wurden $700 \mu\text{l}$ des Puffers RWT auf die Membran pipettiert. Daraufhin zentrifugierte man das Röhrchen samt Filter für 15 s bei 10.000 min^{-1} . Der Durchfluss wurde verworfen, ohne dass er die Silikamembran nochmals berührte. Im nächsten Schritt wurden $500 \mu\text{l}$ RPE Puffer auf den Filter gegeben. Das Röhrchen wurde wiederum für 15 s bei 10.000 min^{-1} zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt und daraufhin wurden das Eluat und das Röhrchen verworfen. Nun wurde zum letzten Mal $500 \mu\text{l}$ RPE Puffer auf den Filter in einem neuen 2 ml Röhrchen pipettiert und selbiges für 1 min bei 13.000 min^{-1} und offenem Deckel zentrifugiert. Der Durchfluss wurde abermals verworfen. Dieses dreimalige Waschen und Zentrifugieren diente dazu, die RNA von Salzen und Proteinen zu reinigen. Im letzten Schritt setzte man die RNeasy mini spin column in ein neues 1,5 ml Röhrchen, gab $40 \mu\text{l}$ RNase freies Wasser auf die Silikamembran und zentrifugierte für 1 min bei 10.000 min^{-1} . Im Eluat befand sich die aufgereinigte RNA (Chatterjea 2013; Qiagen 2012).

3.2.7. Konzentrationsbestimmung Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von mRNA und microRNA wurde mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer bestimmt. Ribonukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm. Eine zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm (Detektion von Proteinen) und bei 230 nm (Detektion organischer Substanzen) ermöglichte eine Aussage über die Reinheit der Probe. Die Quantifizierung von mRNA und microRNA wurde mittels qPCR durchgeführt.

3.2.8. Reverse Transkription

3.2.8.1. Reverse Transkription der microRNA

Die reverse Transkription der zuvor isolierten microRNA erfolgte mit dem miScript Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen. Der Ansatz für ein Röhrchen umfasste 20 µl und setzte sich wie folgt zusammen: 4 µl miScript RT Puffer, in dem sich Mg²⁺, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) und Primer (die Sequenz der Primer ist auf Grund von Patentrechten nur der Firma Qiagen bekannt) befanden, 1 µl miScript Reverse Transkriptase Mix, 11 µl RNase freies Wasser und 4 µl microRNA. Zu Beginn wurde ein 1,5 ml Röhrchen auf Eis mit Puffer und RNase freiem Wasser befüllt. Die microRNA, die ebenfalls auf Eis gelagert war, wurde in ein 200 µl fassendes Röhrchen pipettiert. Zuletzt fügte man dem 1,5 ml Röhrchen die Transkriptase hinzu und durchmischte diese Lösung. Da Transkriptase bei Raumtemperatur instabil ist, musste dieser Schritt unbedingt zuletzt vorgenommen werden. Dies ergab einen Mastermix, welcher der microRNA hinzu pipettiert wurde, so dass sich insgesamt in dem Röhrchen 20 µl Volumen befanden. Dabei wurde der Ansatz im ersten Schritt für 60 min bei 37 °C inkubiert. Der zweite Schritt, in dem für 5 weitere Minuten bei 95 °C inkubiert wurde, diente dazu die Transkriptase zu inaktivieren. Die auf diesem Wege synthetisierte cDNA wurde entweder bei -20 °C eingefroren oder aber unverzüglich für die PCR aufbereitet (Qiagen 2011a).

3.2.8.2. Reverse Transkription der mRNA

Für das Umschreiben der mRNA in cDNA wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit der Firma Bio-Rad verwendet. Um den Mastermix anzusetzen wurden 4 µl des iScript reaction mix, 1 µl iScript reverse transcriptase, RNase freies Wasser und 50 ng isolierte RNA benötigt. Die Menge an RNase freiem Wasser war durch die Menge an eingesetzter RNA determiniert. Das Endvolumen pro 200 µl Röhrchen betrug 20 µl RNase freies Wasser. Die reverse Transkriptase wurde zuletzt hinzugegeben, da sie thermolabil ist. Der Algorithmus für das Gerät Gene Amp PCR System 2400 wurde folgendermaßen programmiert: 5 min Inkubation bei 25°C, 30 min bei 42°C und zuletzt 5 min bei 85°C. Die so gewonnene cDNA wurde bei -20°C eingefroren (Bio-Rad Laboratories Inc.).

3.2.9. Quantitative real-time PCR von microRNA und mRNA

3.2.9.1. PCR der microRNA

Um die qPCR durchzuführen, wurden folgende Produkte der Firma Qiagen verwendet:

1. miScript SYBR® Green PCR Kit, bestehend aus:

- HotStarTaq® DNA Polymerase
- QuantiTect SYBR Green PCR Puffer
- dNTP Mix, beinhaltet dUTP
- SYBR Green I, zur Detektion von microRNA; SYBR Green I ist ein Cyaninfarbstoff, der an doppelsträngige DNA, aber auch an einzelsträngige DNA sowie RNA binden kann. Er emittiert grünes und absorbiert blaues Licht (Zipper et al. 2004; Mackay 2002)
- ROX, 6-Carboxyl-X-Rhodamin, ein fluoriszierender Farbstoff, welcher der PCR als Referenz dient
- 5 mM MgCl₂
- 10x miScript Universal Primer; auf Grund von Patentrechten ist die Sequenz des Universal Primers nur der Firma Qiagen bekannt
- RNase freies Wasser

2. 3 verschiedene miScript Primer Assays, die Sequenzen sind im Materialenteil aufgelistet

- Hs_miR-21_2 miScript Primer Assay
- Hs_RNU6-2_1 miScript Primer Assay
- Hs_SCARNA17_1 miScript Primer Assay

Zu Beginn mussten die Primer Hs_miR-21_2, Hs_RNU6-2_1 und Hs_SCARNA17_1 mit Tris-EDTA, pH 8,0, angesetzt und auf Eis gelegt werden. Für die PCR wurde eine 96-well Platte verwendet. Pro well mischte man 12,5 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 2,5 µl 10x miScript Universal Primer, 2,5 µl 10x miScript Primer Assay (entweder miScript Primer Assay Hs_miR-21_2, miScript Primer Assay Hs_RNU6-2_1 oder miScript Primer Assay Hs_SCARNA17_1) und 6,5 µl RNase freies Wasser. Daraufhin pipettierte man 63 wells (7 verschiedene Zeitwerte x 3 x 3 unterschiedliche Primer) mit jeweils 1 µl der entsprechenden cDNA in Triplets in die 96 well Platte. Im Anschluss wurde jedes well mit 24 µl des oben aufgelisteten Reaktionsgemisches befüllt. Diese Arbeit wurde durchgehend auf einer Kühlung durch Eis durchgeführt.

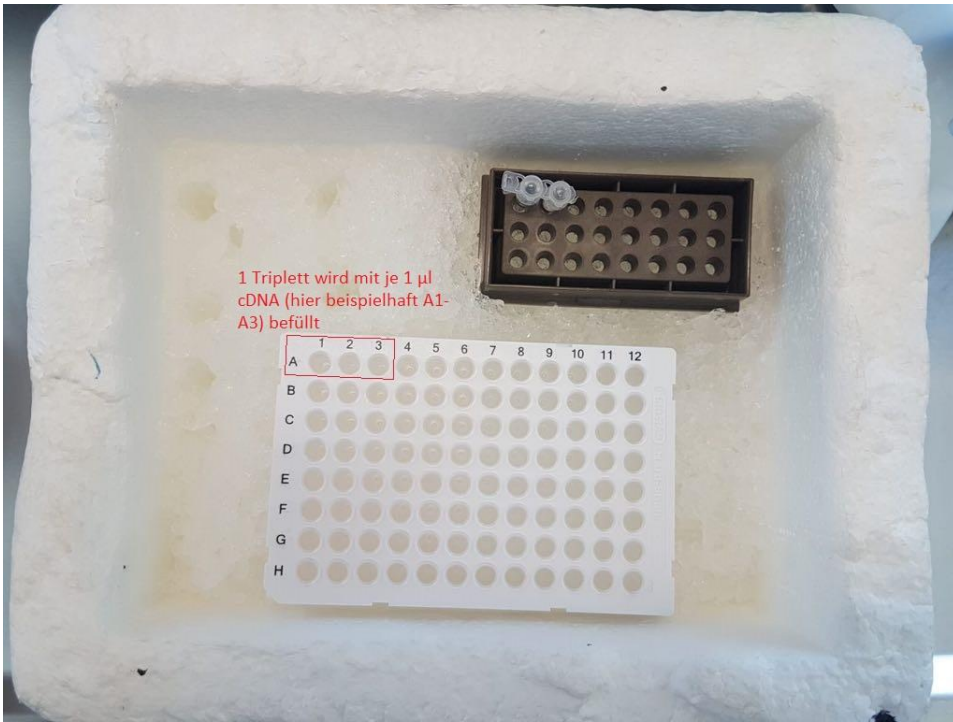


Abbildung 7 96 well plate mit cDNA

| | miR -21 | miR -21 | miR -21 | RN U6B | RN U6B | RN U6B | SCAR NA17 | SCAR NA17 | SCAR NA17 | 10 | 11 | 12 |
|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|--------------|--------------|--------------|----|----|----|
| t0 | | | | | | | | | | | | |
| t24 ub | | | | | | | | | | | | |
| t48 ub | | | | | | | | | | | | |
| t72 ub | | | | | | | | | | | | |
| t24 bes | | | | | | | | | | | | |
| t48 bes | | | | | | | | | | | | |
| t72 bes | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Abbildung 8 Schematische Darstellung der 96 well plate für eine qPCR der microRNA-21 Expression

Der real-time Cyclor wurde nach dem im Handbuch vorgegebenen Schema programmiert. Zuerst steigt die Temperatur für 15 min auf 95°C. Dieser Zyklus 1 dient dazu die HotStarTaq DNA Polymerase zu aktivieren. Diesem initialen Prozedere folgt Zyklus 2 mit 3 Schritten, die 40x wiederholt werden. Der erste Schritt dient der Denaturierung der cDNA Stränge, dafür wird die Temperatur für 15 s bei 94°C gehalten. An die einzelsträngige cDNA können nun als nächstes die Primer binden. Dieser Vorgang, Annealing genannt, findet für 30 s bei 55°C statt. Im letzten Schritt, der Elongation, erfolgt die Anlagerung der komplementären Basen an die Primer. An die entstandene doppelsträngige DNA können nun die Fluoreszenzfarbstoffe (SYBR Green) binden und gemessen werden. Dazu verbleibt die Temperatur für 30 s bei 70°C (Qiagen 2014, 2011b). Zuletzt wird eine Schmelzkurvenanalyse zum Spezifitätsnachweis der Primer durchgeführt.

3.2.9.2. PCR der mRNA

Folgende Materialien wurden für die qPCR verwendet:

1. iQ™ SYBR Green Supermix
2. forward Primer (die jeweiligen Sequenzen finden sich im Materialenteil wieder)
3. reverse Primer (die jeweiligen Sequenzen finden sich im Materialenteil wieder)
4. RNase freies Wasser
5. cDNA des zu untersuchenden Gens

In dem iQ™ SYBR Green Supermix waren eine iTaq DNA Polymerase, dNTP, MgCl₂, SYBR® Green I Farbstoff und Fluoreszin enthalten.

Zu Beginn setzte man eine 96-well Platte auf Eis um eine durchgehende Kühlung zu gewährleisten. Die Beladung der PCR-Platte erfolgte in Triplets. Die Expression der Gene wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten t₀, t₂₄, t₄₈ sowie t₇₂, bestrahlt und unbestrahlt, untersucht. Als interne Kontrolle war Aktin vorgesehen.

Der Cyclor wurde so programmiert, dass im ersten Zyklus die Temperatur auf 95°C für 5 min anstieg. In Zyklus 2 wurde die Temperatur für 40 s bei 95°C gehalten, daraufhin sank die Temperatur weitere 40 s auf 58°C, um daraufhin für 20 s bei 72°C den komplementären Strang zu synthetisieren. Zyklus 2 wurde 40 mal wiederholt, danach begann der dritte und letzte Zyklus. Hierbei wurde die DNA durch stete Temperaturerhöhung denaturiert. Daraus resultierte eine Änderung in der

Fluoreszenzaktivität. Diese wurde detektiert und daraus die Schmelzkurve abgeleitet. Längere, spezifische doppelsträngige DNA Fragmente besitzen einen höheren Schmelzpunkt als kurze, unspezifische Primerdimere. Die Schmelzkurve stellt die Spezifität der PCR-Reaktion dar (Wienken et al. 2011; Ririe et al. 1997; Ansevin et al. 1976).

3.2.10. Caspase 3/7 Assay

Der Caspase Assay ist ein Zellviabilitätsverfahren und dient dazu die Aktivität der Caspasen 3 und 7 luminometrisch zu bestimmen. Dies wird dadurch erreicht, dass man die Zellen vor der Messung mit DEVD behandelt. DEVD steht im Einbuchstabencode für die Aminosäuresequenz Asp-Glu-Val-Asp. Diese Abfolge findet sich auch in der Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 und ist Angriffspunkt für Caspase 3 und 7. An DEVD ist ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden, der durch die Spaltung freigesetzt wird. Dabei verhält sich die Lumineszenz proportional zu der Caspaseaktivität (Poreba et al. 2013; Garcia-Calvo et al. 1999).

Die Durchführung erfolgte weitestgehend nach dem Protokoll des Herstellers Promega. Die Zellen der Linien PCI-1, PCI-13, PCI-52 und SCC-68 wurden auf eine 96-well Platte verteilt. Für die Messpunkte 0, 24, 48 und 72 Stunden wurde jeweils eine 96-well Platte vorbereitet. Darauf befanden sich, je nach Versuchsaufbau, sowohl unbestrahlte als auch bestrahlte Zellen oder transfizierte, bestrahlte und nur bestrahlte Zellen. Für jede Gruppe wurden 6 zentrale wells befüllt, die äußeren wells wurden auf Grund der Verdunstung mit PBS, die restlichen ungenutzten wells mit Nährmedium befüllt. Zu Beginn wurde die Caspaselösung angesetzt, dazu überführte man den Inhalt des Caspase-Glo® 3/7 Puffers in die Flasche mit dem Caspase-Glo® 3/7 Substrat. Daraufhin ließ man eine 96-well Platte und die angesetzte Lösung auf Raumtemperatur erwärmen. Mit einer Multipipette füllte man 75 µl/well der Caspaselösung ein, so dass sich ein Volumenverhältnis von 1:1 einstellte. Der Platteninhalt wurde für 30 s bei 500 min⁻¹ durchmischt und dann für 30 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Nach der Ruhephase wurde die Platte in das Luminometer Synergy HT eingesetzt und ausgelesen (Promega Caspase-Glo 3/7 Assay Technical Bulletin #TB323).

3.2.11. WST-1 Assay

Der WST-1 Assay (water soluble tetrazolium) ist wie der Caspase Assay ein Zellviabilitätsverfahren. Im Gegensatz dazu wird allerdings nicht die Apoptoserate erfasst, sondern die Aktivität der intrazellulären Atmungskette. Gesunde Zellen setzen

über die, in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte, Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase (besser bekannt als Komplex II der Atmungskette) das Salz von Tetrazoliumchlorid (=WST) um. Durch den Elektronenübertrag der Redoxreaktion entsteht Formazan und die Farbe schlägt von schwach rot nach dunkelrot um. Ein Spektralphotometer detektiert diesen Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 420 nm - 480 nm (Peskin und Winterbourn 2000).

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers Roche. Eine 96-well Platte wurde mit 100 µl Zellsuspension à 20.000 Zellen und 10 µl WST-1 pro well befüllt, so dass sich ein 10:1 Verhältnis einstellte. Auf einer Platte befanden sich transfizierte bestrahlte und nur bestrahlte Zellen, welche für den angestrebten Zeitraum bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden. Die Absorption wurde nach 1, 6, 24 und zuletzt nach 48 Stunden gemessen. Nach der gewünschten Zeit mischte man die Zellsuspension gründlich für 1 min und maß die Absorption gegen einen Kontrollversuch, der als Referenz diente (Roche Cell Proliferation Reagent WST-1 2011).

3.2.12. Transfektion

Ziel der Transfektion war in diesem Fall, microRNA-21 zu inhibieren und die Auswirkung auf bestimmte intramembranäre, zytosolische und mitochondriale Proteine zu untersuchen. Dazu wurden 2 unterschiedliche siRNAs, HS_MIR21_1 FlexiTube siRNA und HS_MIR21_2 FlexiTube siRNA, der Firma Qiagen verwendet. Die Sequenzen sind im Materialenteil aufgelistet. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher siRNAs sollte die Erfolgswahrscheinlichkeit der Transfektion erhöht werden. Zusätzlich benötigte man eine Substanz, welche die antagonistische RNA in die Zelle schleuste. Dazu wurde in diesem Fall Lipofectamin® 2000 verwendet. Lipofectamin besteht aus positiv geladenen Lipiden, die mit negativ geladenen Nukleinsäuren eine Bindung eingehen. In hydrophiler Umgebung bildet Lipofectamin Liposomen aus, die mit ihrer positiv geladenen Oberflächenmembran an die negativ geladene Plasmamembran von Zellen binden kann. Dadurch gelangen die gebundenen Nukleinsäuren in das Zytoplasma und den Nucleus.

Zu Beginn des Transfektionsversuch mussten die beiden siRNAs mit serumfreiem Medium, hier Opti-Mem®, angesetzt werden. 10 pmol siRNA entsprachen 1 µl, für einen Transfektionsdurchgang benötigte man 3 µl der jeweiligen siRNA. Es wurden zwei Ansätze vorbereitet, der erste beinhaltete die siRNAs und setzte sich wie folgt zusammen: 3 µl von HS_MIR21_1, 3 µl von HS_MIR21_2 sowie 244 µl serumfreies

Medium. In dem zweiten Ansatz befanden sich 5 µl Lipofectamin und 245 µl serumfreies Medium, dieser benötigte 5 min Einwirkzeit. Daraufhin gab man den ersten und den zweiten Ansatz zusammen und ließ den neuen Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur ruhen. Pro Petrischale erhielt man also 500 µl Transfektionsansatz, die unmittelbar auf diese verteilt wurden (Invitrogen 2013).

Fünf Tage vor dem gewünschten Transfektionsversuch verteilte man die Zellen nach dem in 3.2.3. aufgeführten Schema auf Petrischalen. Pro Petrischale wurden 12.000 (PCI-1, PCI-13) oder 18.000 (PCI-52, SCC-68) Zellen eingesetzt. Das Gesamtvolumen an Nährmedium betrug 2 ml. Für den Kontrolllauf und die transfizierte Gruppe wurden jeweils 2 nicht zu bestrahlende Petrischalen, sowie für die Zeitwerte 24, 48 und 72 Stunden jeweils 2 zu bestrahlende Petrischalen angesetzt. Hatten die Zellen nach 5 Tagen die gewünschte Konfluenz erreicht, wurden die zu bestrahlenden Zellen in den γ -Strahler gesetzt und mit 6 Gy bestrahlt. Das Nährmedium wurde verworfen und die Petrischalen wurden mit 1,5 ml Nährmedium für die Kontrolllinie sowie mit 1 ml Nährmedium für die zu transfizierenden Zellen wieder aufgefüllt. In die Petrischalen der zu transfizierenden Zellen gab man die, wie oben beschrieben, angesetzten 500 µl Transfektionsgemisch, so dass auch hier das Gesamtvolumen 1,5 ml betrug. Bis auf die Kontrollen, mit denen unmittelbar weitergearbeitet wurde, stellte man die restlichen Petrischalen bis zu ihrem Bestimmungszeitpunkt (24, 48, und 72 Stunden) in den Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die PCR Läufe der transfizierten Zellen bestanden aus folgendem Beladungsmuster: short interference vor Bestrahlung (kurz sivB), si24hnB (=24 Stunden nach Bestrahlung), si48hnB, si72hnB; KvB (K=Kontrolle), K24hnB, K48hnB, K72hnB. Als interne Kontrolle wurde wiederum Aktin und zusätzlich RLP5 verwendet (Bio-Rad Laboratories Inc.).

Für den Caspaseassay mussten die Zellen nach der Bestrahlung abgelöst und auf eine 96 well Platte verteilt werden.

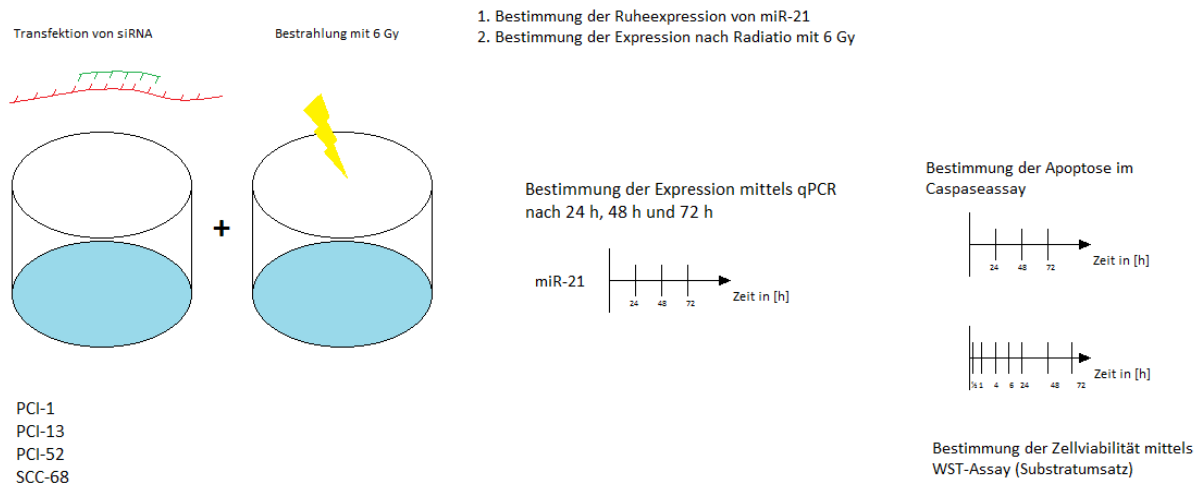


Abbildung 9 Transfektion von siRNA, Bestimmung der Caspaseaktivität der transfizierten Zellen

3.2.13. Statistische Analyse

Zur Durchführung des statistischen Verfahrens wurde die Software SPSS Version 23 verwendet. Zur Überprüfung eines möglichen Einflusses von microRNA-21 auf die Zellviabilität und die Caspaseexpression unter singulärer Bestrahlung wurde eine lineare Regressionsanalyse sowie eine unifaktorielle ANOVA durchgeführt. Zur Ermittlung der Residuen wurden Quantil-Quantil-Diagramme erstellt. In der deskriptiven Analyse wurde das Programm BioRad 5.0 zur Erstellung von Balkendiagrammen verwendet. Für stetige Variablen wurden Minimum, Maximum, der Median sowie die Standardabweichung bestimmt. Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte in Betreuung des Institutes für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik Klinik der Gutenberg-Universität Mainz unter Leitung von Frau Prof. Dr. M. Blettner.

4. Ergebnisse

4.1. Expression von microRNA-21 in den Zellreihen PCI-1, -13, -52, SCC-68 ohne Bestrahlung

Mittels qPCR der Zellreihen PCI-1, -13, -52 und SCC-68 wurde zunächst die Expression von microRNA-21 ohne Inhibition analysiert. In den folgenden Balkendiagrammen ist daher die Expression von microRNA-21 über 72 Stunden dargestellt. Als Vergleich dient die Expression in humanen oralen Keratinozyten (HOK). Es fällt auf, dass die verschiedenen Karzinomzellen keiner eindeutigen Tendenz folgen und auch die beiden Ansätze der gleichen Zelllinie eine unterschiedliche Expression aufweisen. Es kann weder ein Anstieg noch ein Abfall der Expression innerhalb des Beobachtungszeitraums festgestellt werden (Abb. 12-15). Im Unterschied zu den Karzinomzellen PCI-1, -13, -52 und SCC-68 fällt dagegen in der HOK Zelllinie das microRNA-21 Expressionsniveau über 72 Stunden deutlich ab (HOK ub, Abb. 20).

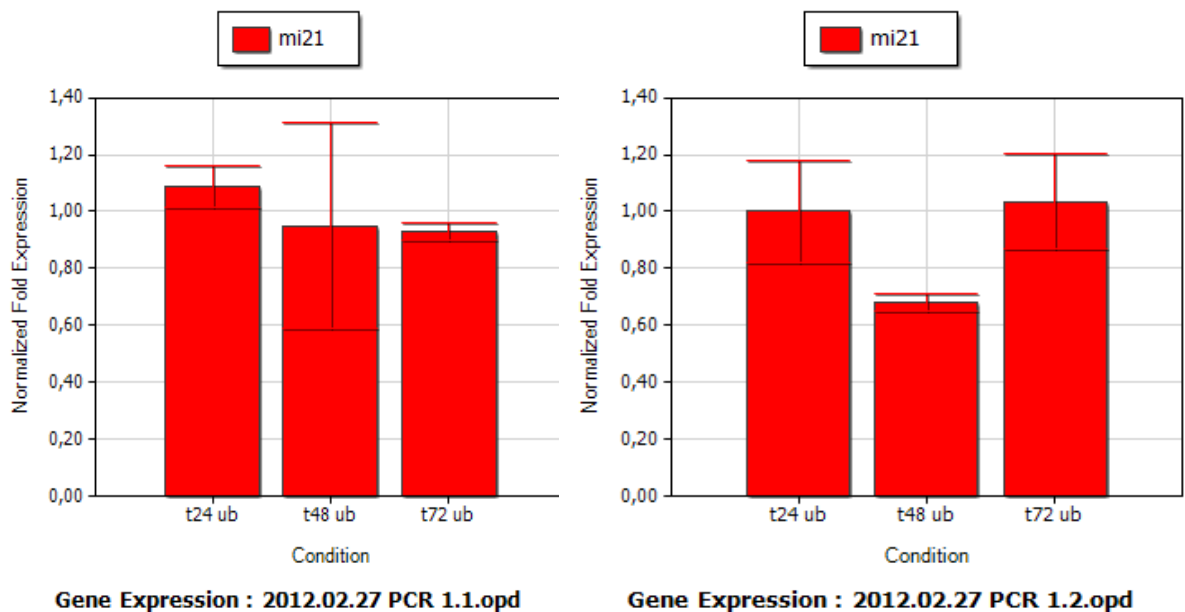
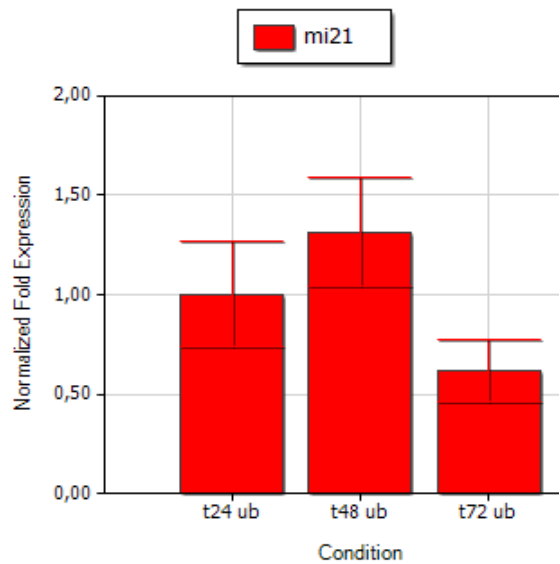
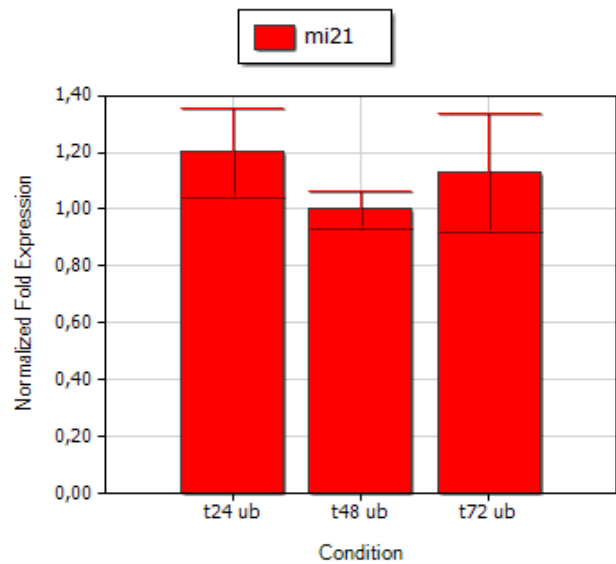


Abbildung 10 Expression von microRNA-21 in PCI-1

ub: unbestrahlt



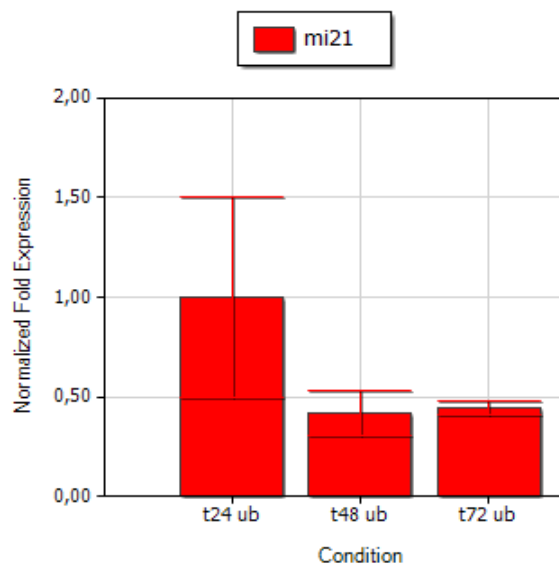
Gene Expression : 2012.03.03 PCR 13.1.op



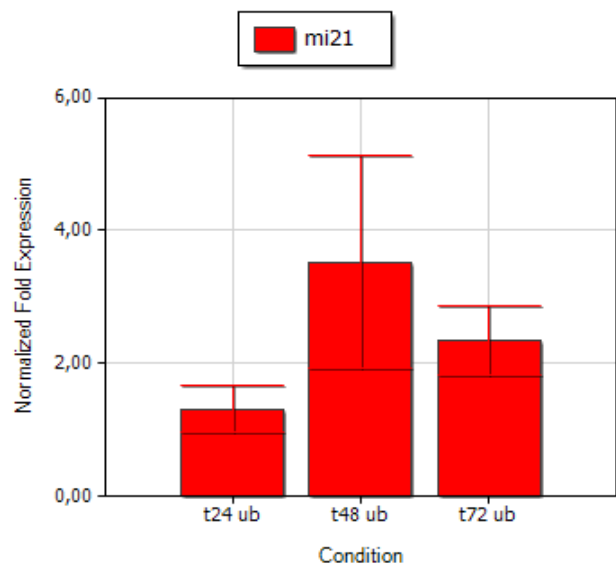
Gene Expression : 12.04.14 PCR 13.2.pts.opd

Abbildung 11 Expression von microRNA-21 in PCI-13

ub: unbestrahlt



Gene Expression : 12.06.19 PCR 52.1.pts.oj



Gene Expression : 12.06.19 PCR 52.2.pts.opd

Abbildung 12 Expression von microRNA-21 in PCI-52

ub: unbestrahlt

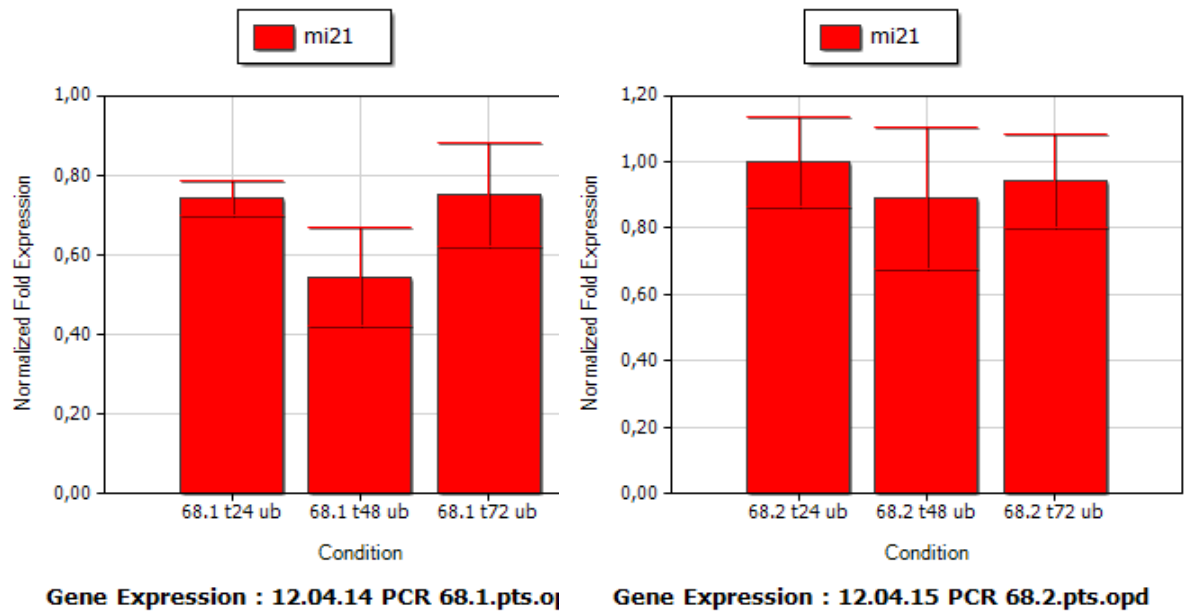
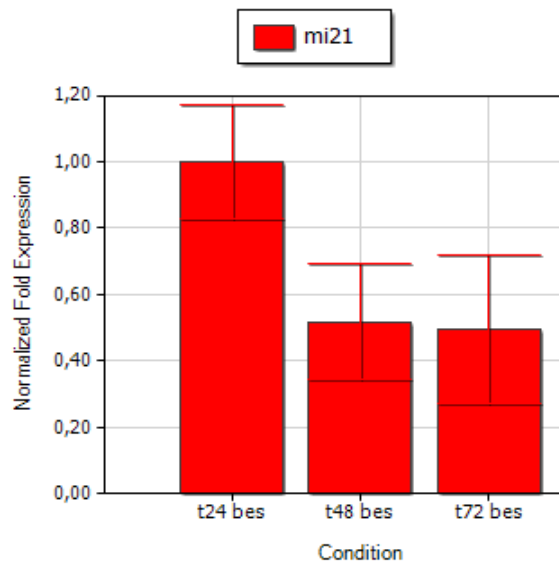


Abbildung 13 Expression von microRNA-21 in SCC-68

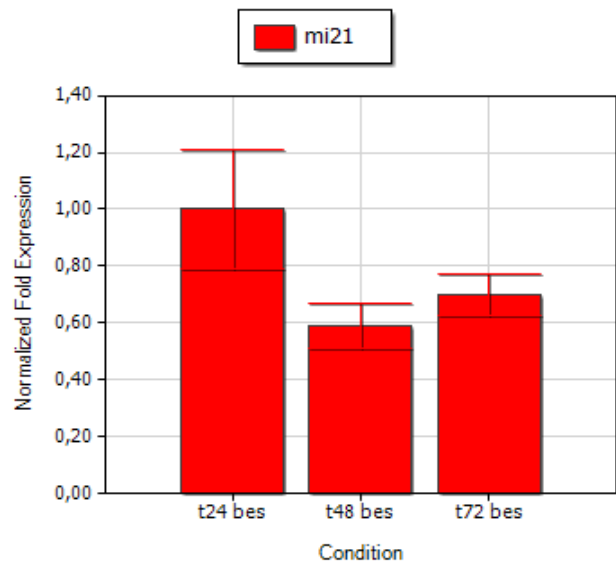
ub: unbestrahlt

4.2. Expression von microRNA-21 in den Zellreihen PCI-1, -13, -52, SCC-68 unter Bestrahlung

Die zeitgleiche Durchführung der qPCR der Expression von microRNA-21 in den Zellreihen PCI-1, -13, -52, SCC-68 sowie HOK nach singulärer γ -Strahlung mit 6 Gy zeigte dagegen in allen Zelllinien einen Abfall der Expression nach 72 Stunden. Lediglich die Expression der Zellreihe PCI-52 zeigte nach 48h ein inhomogenes Ergebnis. Während im ersten Ansatz Gruppe PCI-52.1 zunächst ein Anstieg nach 48 Stunden und dann wiederum ein Abfall nach 72 Stunden der Expression zu verzeichnen ist, zeigte sich in der zweiten Gruppe PCI-52.2 ein kontinuierlicher Abfall der Expression über 72 Stunden.



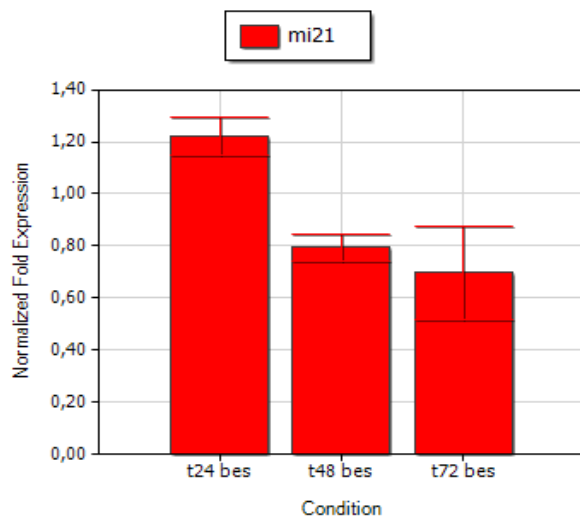
Gene Expression : 2012.02.27 PCR 1.1.opd



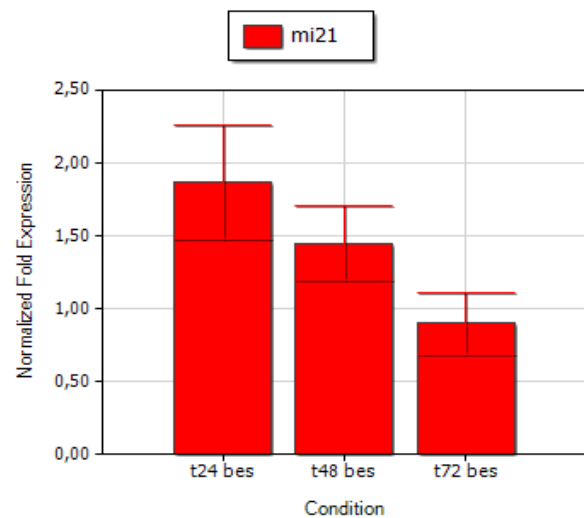
Gene Expression : 2012.02.27 PCR 1.2.opd

Abbildung 14 Expression von microRNA-21 in PCI-1 mit Applikation von ionisierender Strahlung

bes: bestrahlt



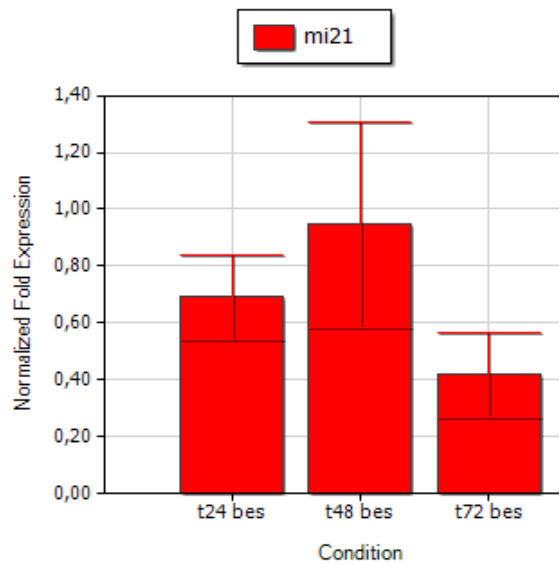
Gene Expression : 2012.03.03 PCR 13.1.opd



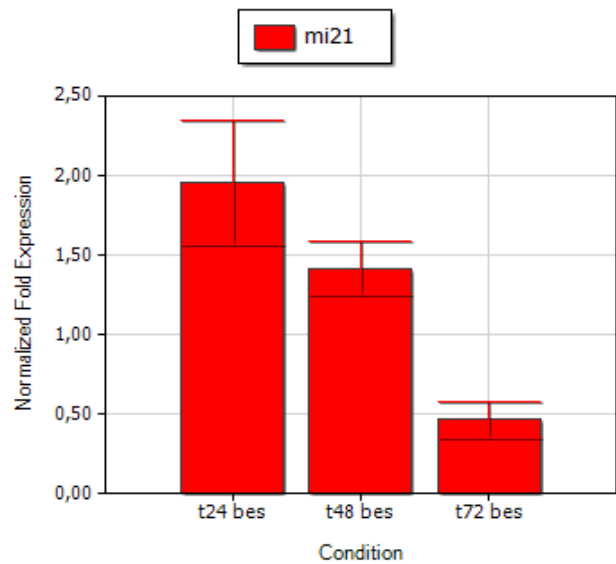
Gene Expression : 12.04.14 PCR 13.2.pts.opd

Abbildung 15 Expression von microRNA-21 in PCI-13 mit Applikation von ionisierender Strahlung

bes: bestrahlt



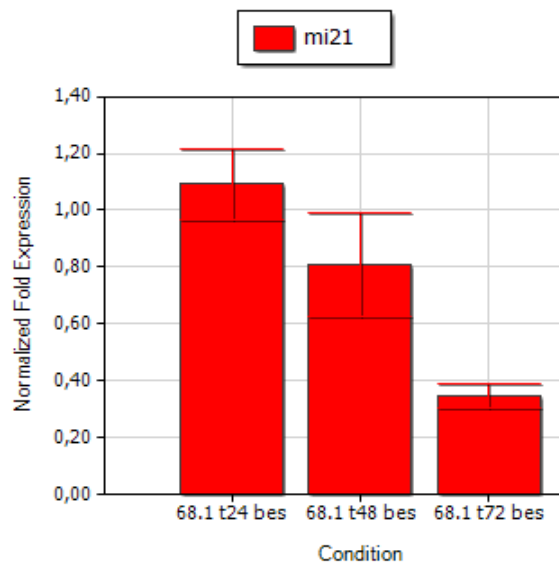
Gene Expression : 12.06.19 PCR 52.1.pts.oj



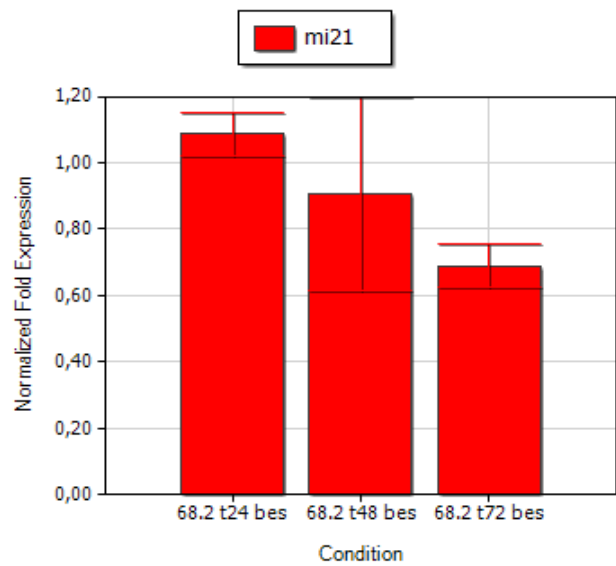
Gene Expression : 12.06.19 PCR 52.2.pts.opd

Abbildung 16 Expression von microRNA-21 in PCI-52 mit Applikation von ionisierender Strahlung

bes: bestrahlt



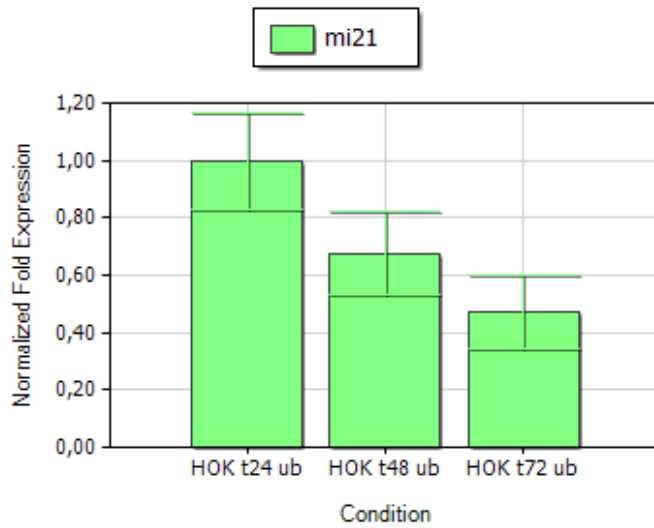
Gene Expression : 12.04.14 PCR 68.1.pts.oj



Gene Expression : 12.04.15 PCR 68.2.pts.opd

Abbildung 17 Expression von microRNA-21 in SCC-68 mit Applikation von ionisierender Strahlung

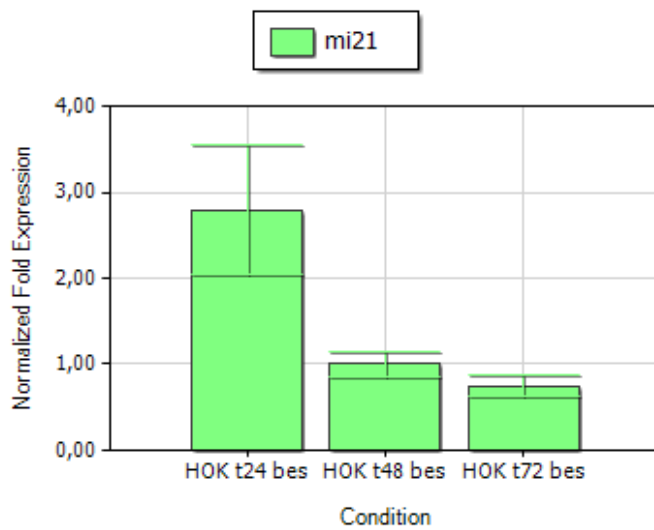
bes: bestrahlt



Gene Expression : 15.02.03 HOK mi 21 ub + bes.pts.opd

Abbildung 18 Expression von microRNA-21 in HOK ohne Applikation von ionisierender Strahlung

ub: unbestrahlt



Gene Expression : 15.02.03 HOK mi 21 ub + bes.pts.opd

Abbildung 19 Expression von microRNA-21 in HOK mit Applikation von ionisierender Strahlung

bes: bestrahlt

4.3. Caspaseaktivität mit und ohne Bestrahlung

Im Folgeansatz wurde der Frage nachgegangen, ob die microRNA-21 Expression mit der Bestrahlungssensitivität der Karzinomzellen korreliert. Hierzu wurde in einem ersten Schritt das Expressionsprofil der beiden zentralen Apoptosemarker Caspase 3 und Caspase 7 untersucht und in einem Parallelansatz die Zellviabilität per WST-1 Test überprüft.

Es wurde daher die Caspase 3 und 7 Aktivität sowohl der unbestrahlten als auch der bestrahlten Zellen der Reihen PCI-1, PCI-13, PCI-52 und SCC-68 über 72 Stunden untersucht. Als Kontrollgruppe wurde derselbe Ansatz für HOK gewählt.

Im folgenden Boxplot zeigt sich, dass die Caspaseaktivität in der bestrahlten Zellgruppe durchweg höher ist als in der unbestrahlten Gruppe. Lediglich die humanen oralen Keratinozyten zeigen keinen großen Effekt durch die Bestrahlung.

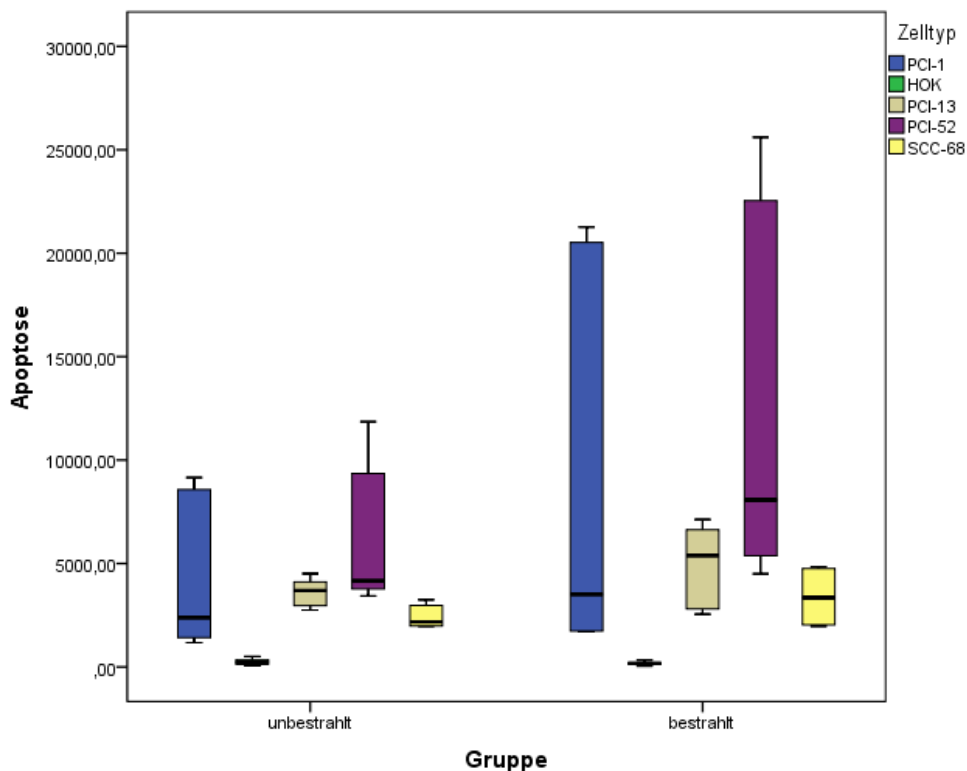


Abbildung 20 Caspaseaktivität der Karzinomzellen PCI-1, -13, -52 und SCC-68 mit/ohne Applikation von ionisierender Strahlung

4.3.1. Caspaseaktivität der Zellreihe PCI-1 mit und ohne Bestrahlung

Betrachtet man nun die zugehörigen Caspaseassays von PCI-1, so zeigt sich, dass in PCI-1 die Aktivität der Caspasen über 72 Stunden ansteigt. Dies gilt für die unbestrahlte sowie die bestrahlte Zellgruppe. Vergleicht man nun die unbestrahlten mit den bestrahlten Zellen, weisen letztere eine deutlich höhere Caspaseaktivität über den Beobachtungszeitraum auf.

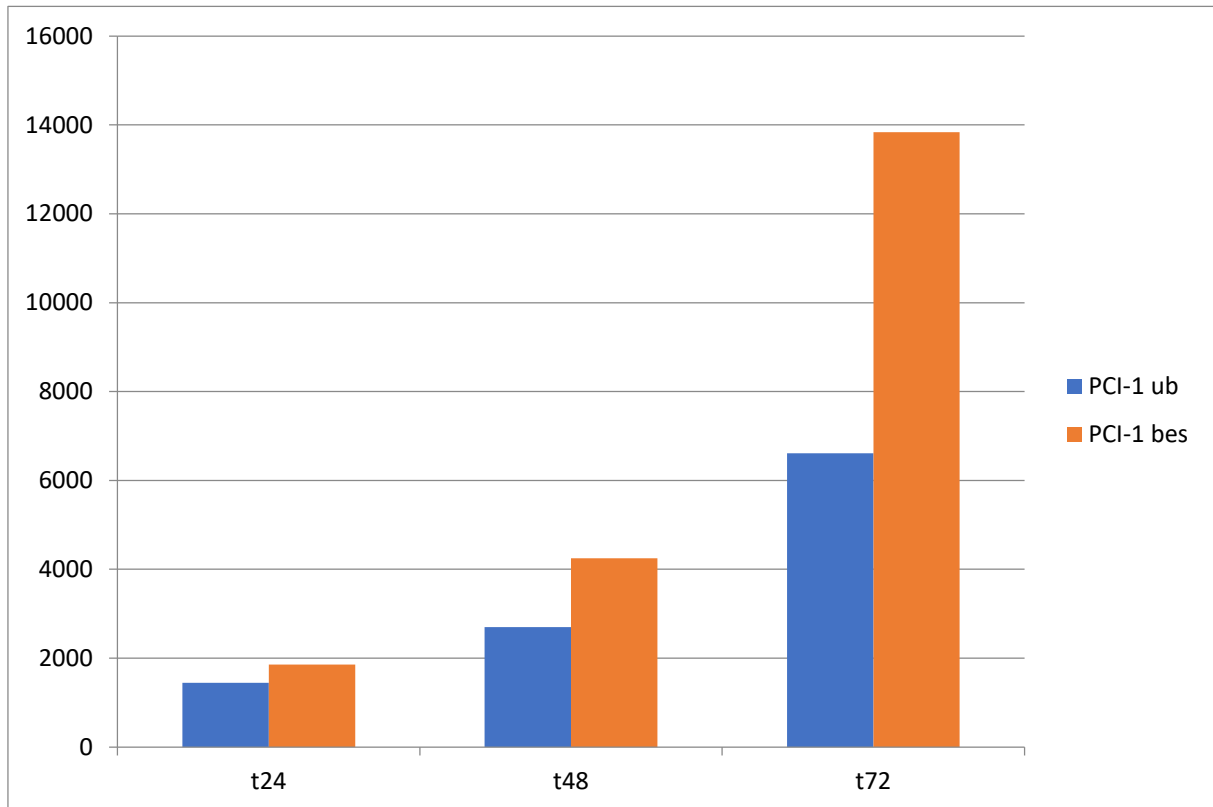


Abbildung 21 Caspaseaktivität in PCI-1 mit/ohne Applikation ionisierender Strahlung

ub: unbestrahlt; bes: bestrahlt

4.3.2. Caspaseaktivität der Zellreihe PCI-13 mit und ohne Bestrahlung

Auch in den Zellen der PCI-13 Reihe zeigt sich ein Anstieg der Caspaseaktivität über 72 Stunden in der unbestrahlten sowie der bestrahlten Gruppe. Zunächst lässt sich nach 24 Stunden für die unbestrahlten sowie die bestrahlten Zellen eine nahezu gleichbleibende Aktivität feststellen. Dies ändert sich nach 48 Stunden, die Caspaseaktivität steigt an. Nach weiteren 25 Stunden zeigt sich dieser Effekt in verstärktem Maße, mit einer ca. doppelt so hohen Caspaseexpression im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen.

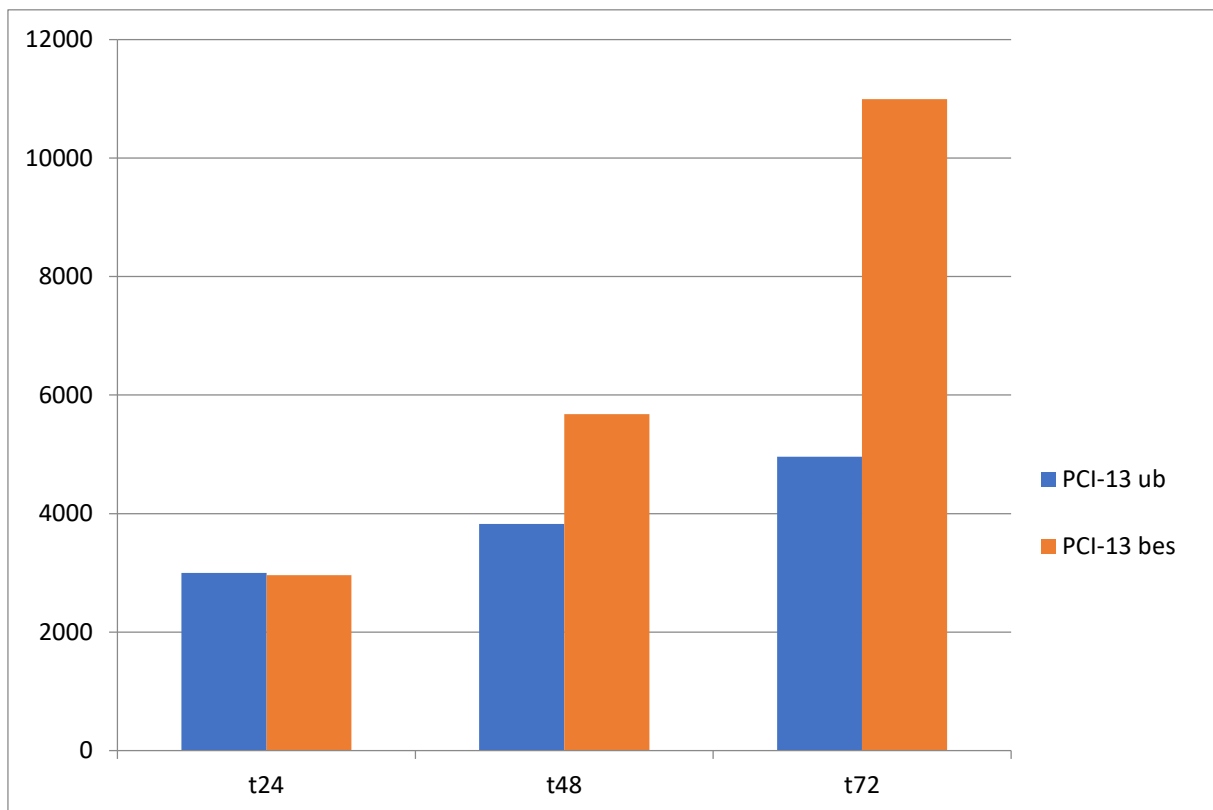


Abbildung 22 Caspaseaktivität in PCI-13 mit/ohne Applikation ionisierender Strahlung

ub: unbestrahlt; bes: bestrahlt

4.3.3. Caspaseaktivität der Zellreihe PCI-52 mit und ohne Bestrahlung

Betrachtet man die Caspaseaktivität der Zellreihe PCI-52, steigen die unbestrahlten sowie die bestrahlten Werte über 72 Stunden an. Auch hier fällt auf, dass die bestrahlten Zellen eine deutlich erhöhte Caspaseaktivität im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen aufweisen.

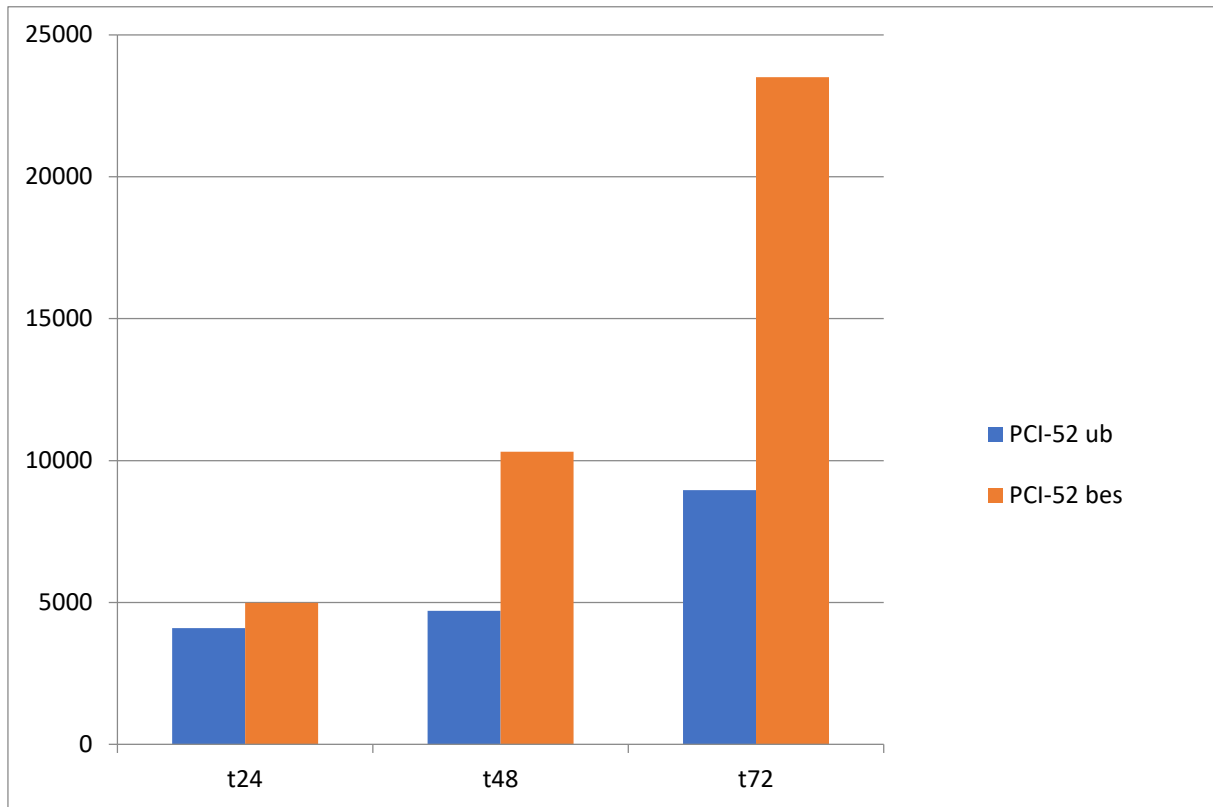


Abbildung 23 Caspaseaktivität in PCI-52 mit/ohne Applikation ionisierender Strahlung

ub: unbestrahlt; bes: bestrahlt

4.3.4. Caspaseaktivität der Zellreihe SCC-68 mit und ohne Bestrahlung

Wie in allen zuvor gezeigten Caspaseaktivitäten zeigt auch die Zellreihe SCC-68 ein entsprechendes Muster. Die Caspaseaktivität steigt in beiden Gruppen, bestrahlt und unbestrahlt, über 72 Stunden deutlich an. Vergleicht man nun die beiden Gruppen, bestrahlt und unbestrahlt, wird erneut gezeigt, dass die bestrahlte Gruppe einen stärkeren Anstieg der Caspaseaktivität verzeichnet.

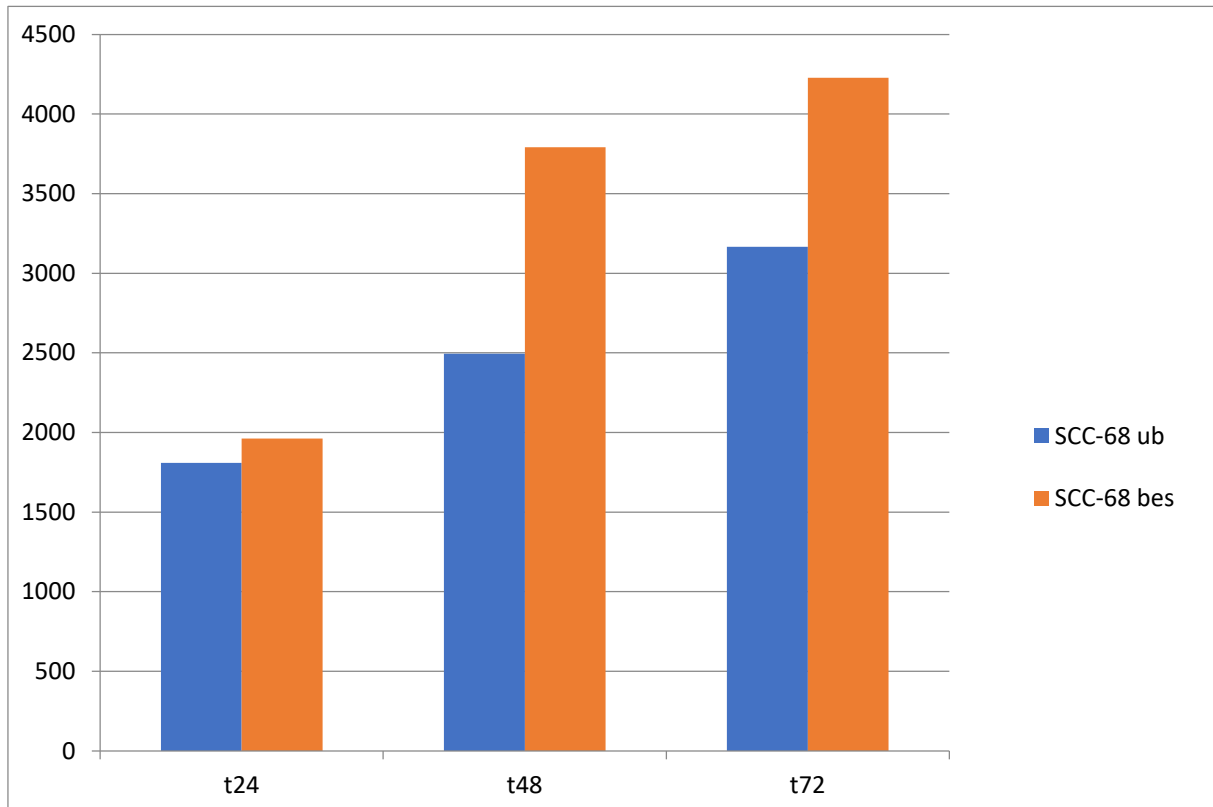


Abbildung 24 Caspaseaktivität in SCC-68 mit/ohne Applikation ionisierender Strahlung

ub: unbestrahlt; bes: bestrahlt

4.3.5. Caspaseaktivität der humanen oralen Keratinozyten mit und ohne Bestrahlung

In den humanen oralen Keratinozyten lässt sich bezüglich der Caspaseaktivität im Vergleich zu den Karzinomzellen grundsätzlich eine deutlich verminderte Aktivität feststellen. Auffällig ist der deutliche Unterschied zwischen den unbestrahlten und den bestrahlten Keratinozyten nach 24 Stunden. Hier lagen deutlich höhere Werte in der unbestrahlten Gruppe vor, deren Aktivität nach 72 Stunden abfiel, während nach 48 Stunden bis 72 Stunden die bestrahlte Gruppe in der Caspaseaktivität jeweils über der unbestrahlten Gruppe lag. Unter der Annahme, dass microRNA-21 einen Apoptoseschutz insbesondere unter Bestrahlung vermittelt, müsste es nach Transfektion mit inhibierender si-microRNA-21 wiederum zu einem Anstieg der Caspasen kommen. Daher erfolgte der zuvor durchgeführte Ansatz in den Zelllinien PCI-1 und PCI-52 jeweils mit einem Normalansatz und einem Transfektionsansatz.

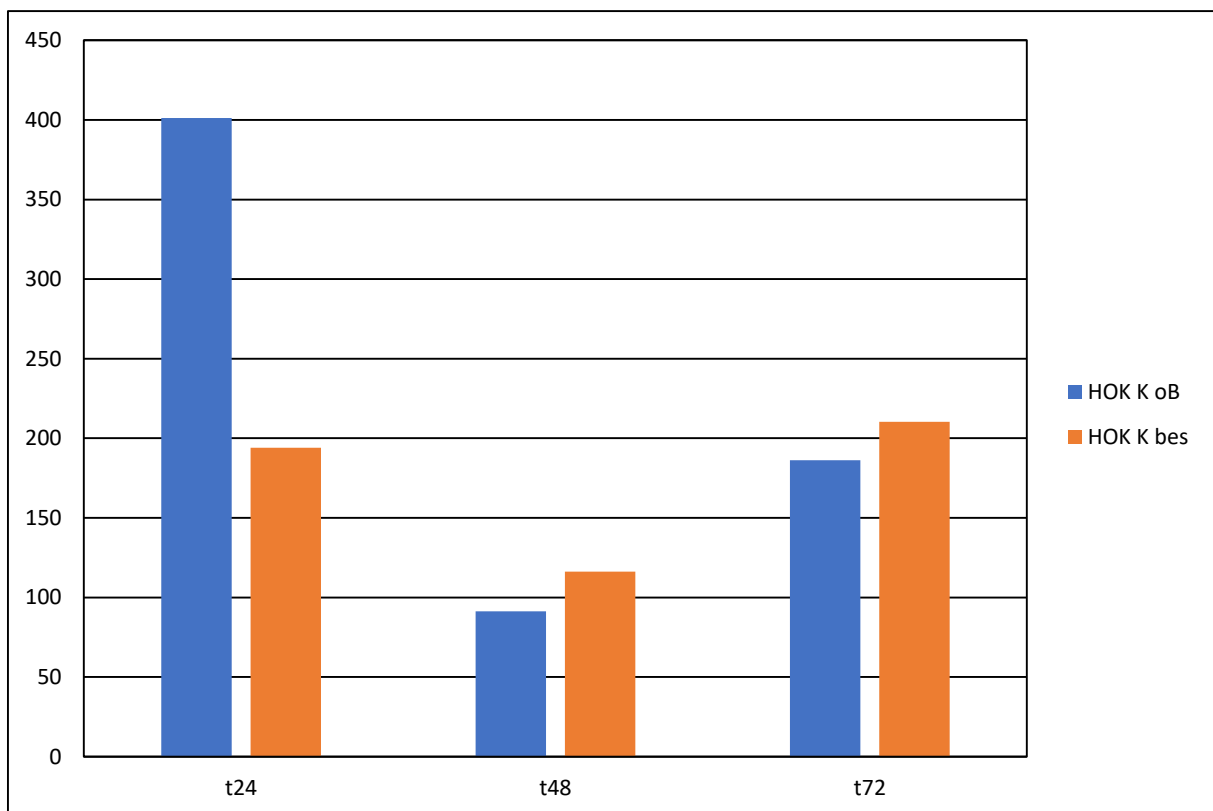


Abbildung 25 Caspaseaktivität in HOK mit/ohne Applikation ionisierender Strahlung

ub: unbestrahlt; bes: bestrahlt

4.4. Caspaseaktivität mit und ohne Bestrahlung in transfizierten Zellen

4.4.1. Caspaseaktivität der Zellreihe PCI-1 mit und ohne Bestrahlung in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen

Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 steigt über den Zeitraum von 72 Stunden in allen Gruppen an. Während nach 72 Stunden der Caspasewert der bestrahlten nicht-transfizierten Kontrolle nur wenig über dem 24 Stunden Wert liegt, kommt es im Transfektionsansatz zu einem deutlichen Anstieg nach 72 Stunden. Hierdurch kann in PCI-1 der anti-apoptotische Einfluss von microRNA-21 unter Bestrahlung durch si-Transfektion antagonisiert werden. Der Einfluss wird insbesondere nach 72 Stunden an der Gruppe ohne Bestrahlung deutlich. Hier ist der Unterschied zwischen transfizierter und nicht-transfizierter Gruppe vernachlässigbar.

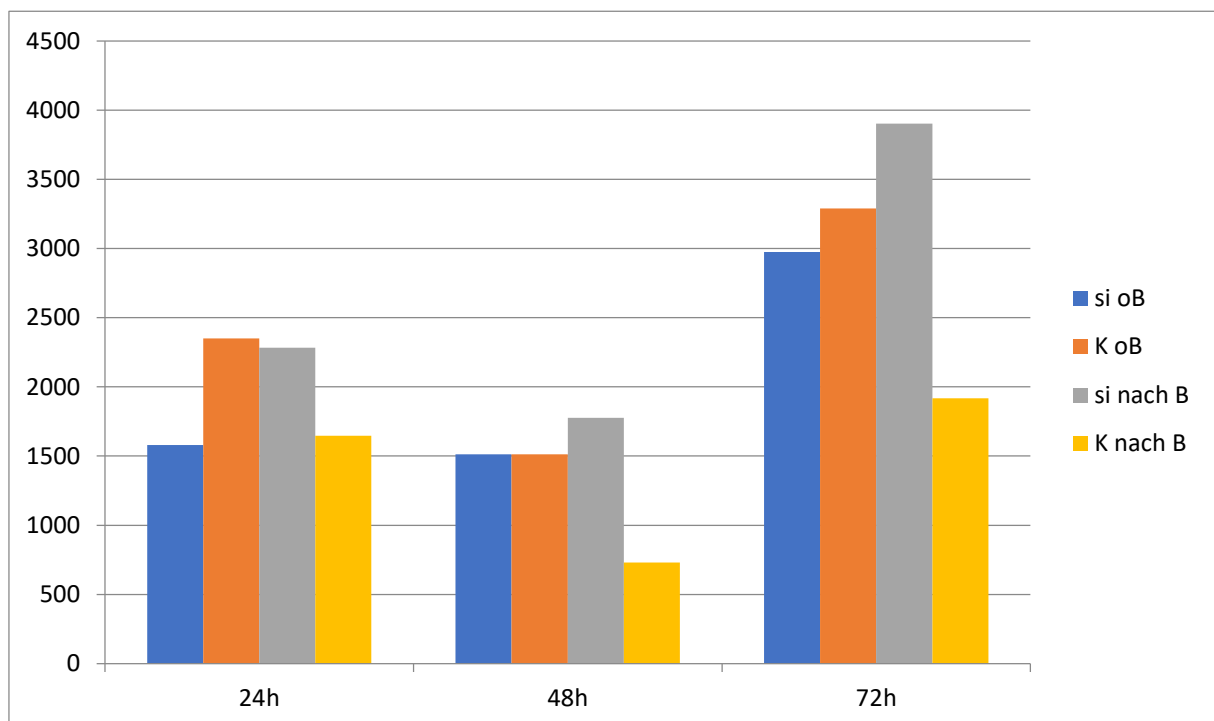


Abbildung 26 Caspaseaktivität in transfizierter PCI-1 mit/ohne Applikation von ionisierender Strahlung

si oB: transfizierte, unbestrahlte Zellen; K oB: nicht-transfizierte, unbestrahlte Zellen; si nach B: transfizierte, bestrahlte Zellen; K nach B: nicht-transfizierte, bestrahlte Zellen

4.4.2. Caspaseaktivität der Zellreihe PCI-52 mit und ohne Bestrahlung in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen

Ein gänzlich anderes Bild zeigt sich für die Zelllinie PCI-52. Hier unterscheidet sich in beiden Gruppen die Caspaseaktivität nach 24 Stunden nicht, liegt aber im Vergleich zu PCI-1 deutlich höher. Die Kontrollgruppe ohne Bestrahlung verändert sich nicht erheblich nach 72 Stunden gegenüber dem 24 Stunden und dem 48 Stunden Wert. Demgegenüber zeigt sich im Kontrollansatz nach 72 Stunden gegenüber dem 24 Stunden Wert mehr als eine Verdopplung. Eine Transfektion mit si-microRNA-21 führt sowohl mit und ohne Bestrahlung zu keinem Anstieg der Caspaseaktivität gegenüber der nicht-transfizierten Gruppe und erreicht das Aktivitätsniveau der Kontrolle ohne Bestrahlung in allen Zeitpunkten. Somit kann in der Zelllinie PCI-52 kein microRNA-21 vermittelter Apoptoseschutz durch si-microRNA-21 antagonisiert werden.

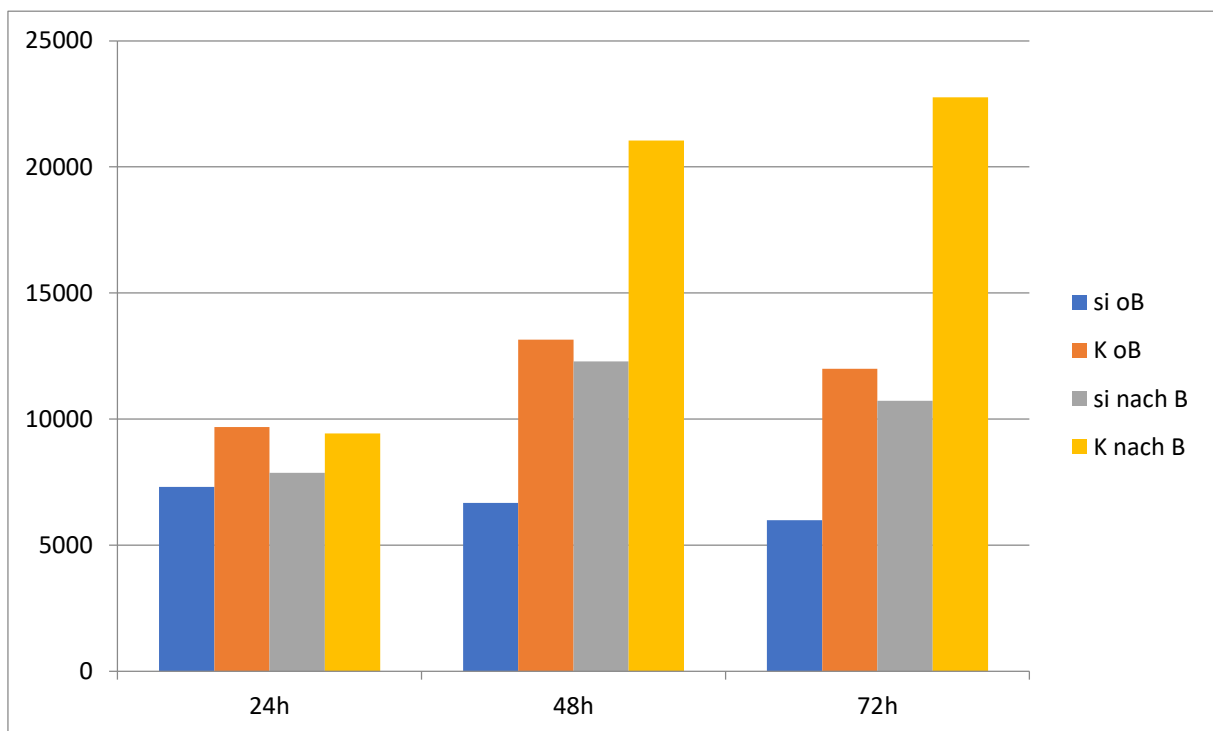


Abbildung 27 Caspaseaktivität in transfizierter PCI-52 mit/ohne Applikation von ionisierender Strahlung

si oB: transfizierte, unbestrahlte Zellen; K oB: nicht-transfizierte, unbestrahlte Zellen; si nach B: transfizierte, bestrahlte Zellen; K nach B: nicht-transfizierte, bestrahlte Zellen

Neben einer Apoptose-assoziierten Strahlentherapieresistenz interessierte zusätzlich auch der Einfluss auf die Zellviabilität. Hierdurch kann zum einen der Zusammenhang mit einem durch Apoptose vermittelten biologischen Schutz der Zelle überprüft, zum anderen jedoch auch Hinweise auf andere Resistenzmechanismen gegenüber der Strahlentherapie aufgedeckt werden. Die zuvor im Knockdown-Ansatz untersuchten Zelllinien PCI-1 und PCI-52 wurden daher auch für den Zellviabilitätstest mit und ohne Bestrahlung jeweils als Normal- und Transfektionsansatz (si-microRNA-21) überprüft.

4.5. Zellviabilität mit und ohne Bestrahlung in transfizierten Zellen

4.5.1. Zellviabilität der Zellreihe PCI-1 mit und ohne Bestrahlung in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen

Beobachtet man nun die Zellviabilität in PCI-1 mittels WST-1 Assay, so zeigt sich, dass die Aktivität der mitochondrialen Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase in der Kontrollgruppe ohne Bestrahlung, der Kontrollgruppe mit Bestrahlung, der transfizierten Gruppe ohne Bestrahlung sowie in der transfizierten Gruppe mit Bestrahlung annähernd identisch ist. Im Verlauf über 72 Stunden steigt die Aktivität in allen Gruppen an. In PCI-1 unterscheidet sich jedoch die transfizierte, unbestrahlte Gruppe von den anderen und der Anstieg liegt deutlich über dem der anderen Gruppen. Hieraus kann man ableiten, dass die Antagonisierung des microRNA-21 vermittelten Apoptoseschutzes durch si-microRNA-21 wie zuvor im Caspasemodell gezeigt, sich nicht signifikant auf die Zellviabilität unter Bestrahlung niederschlägt. Ein therapeutischer Effekt einer Antagonisierung wäre in dieser Zelllinie somit unter Bestrahlung nicht zu erwarten. Gleichzeitig scheint microRNA-21 in PCI-1 aber einen deutlichen Einfluss auf die Zellviabilität unter physiologischen Bedingungen zu haben, denn abseits einer Caspase vermittelten Apoptose kommt es nach Inhibition von microRNA-21 ohne Bestrahlung bereits nach 4 Stunden zu einer deutlich höheren Viabilität gegenüber allen anderen Gruppen. Ein Effekt, der in unserem Ansatz nach 48 Stunden sein Maximum erreichte und nach 72 Stunden noch nachweisbar war.

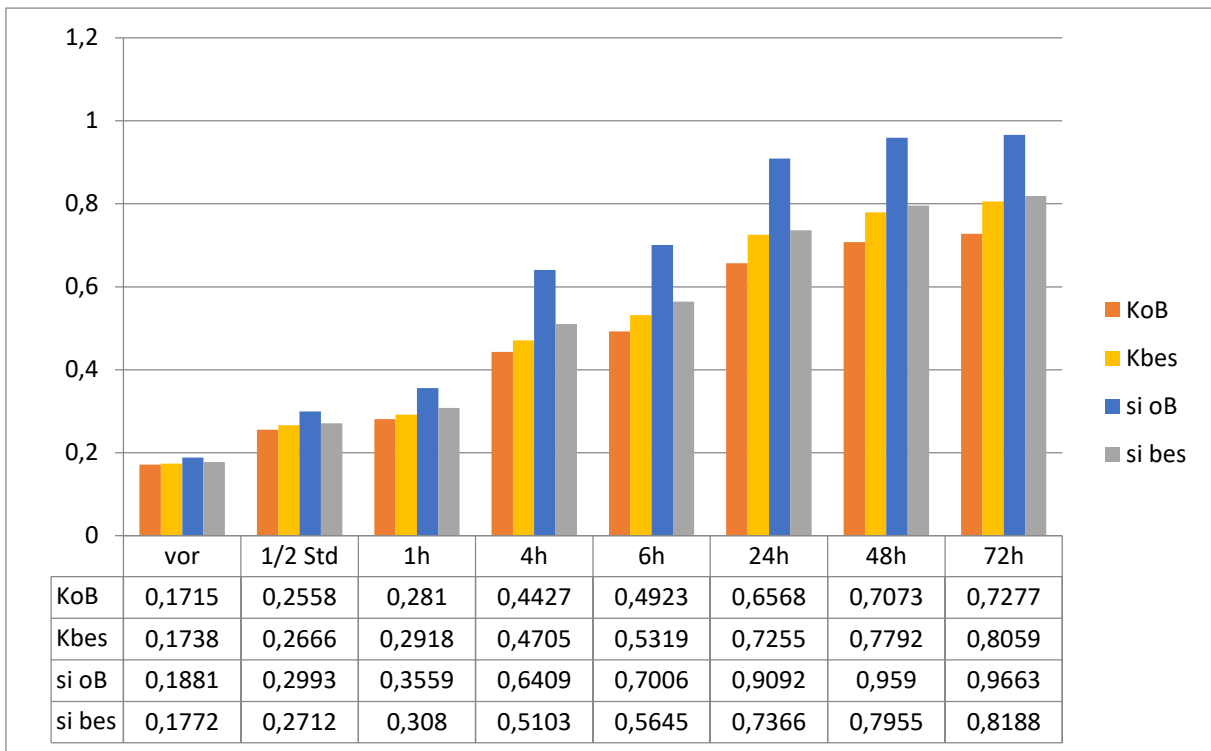


Abbildung 28 WST-1, Zellviabilität in transfizierter PCI-1

KoB: nicht-transfizierte, unbestrahlte Zellen; Kbes: nicht-transfizierte, bestrahlte Zellen; si oB: transfizierte, unbestrahlte Zellen; si bes: transfizierte, bestrahlte Zellen

4.5.2. Zellviabilität der Zellreihe PCI-52 mit und ohne Bestrahlung in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen

Die folgende Darstellung der WST-1 Aktivität transfizierter PCI-52 Zellen zeigt, wie sich die Zellviabilität innerhalb von 48 Stunden unter Bestrahlung sowie ohne Bestrahlung entwickelt. Im Verlauf über 48 Stunden kommt es zu keinen deutlichen Unterschieden in der Zellviabilität zwischen den transfizierten und den nicht-transfizierten Gruppen. Ein Einfluss der deutlich erhöhten Caspase-Aktivität nach 48 Stunden in der Kontrolle nach Bestrahlung wirkt sich auch in PCI-52 nicht gleichgerichtet auf die Zellviabilität aus. Der Einfluss auf die Zellviabilität durch si-microRNA-21 ist in PCI-52 in beiden Gruppen ähnlich.

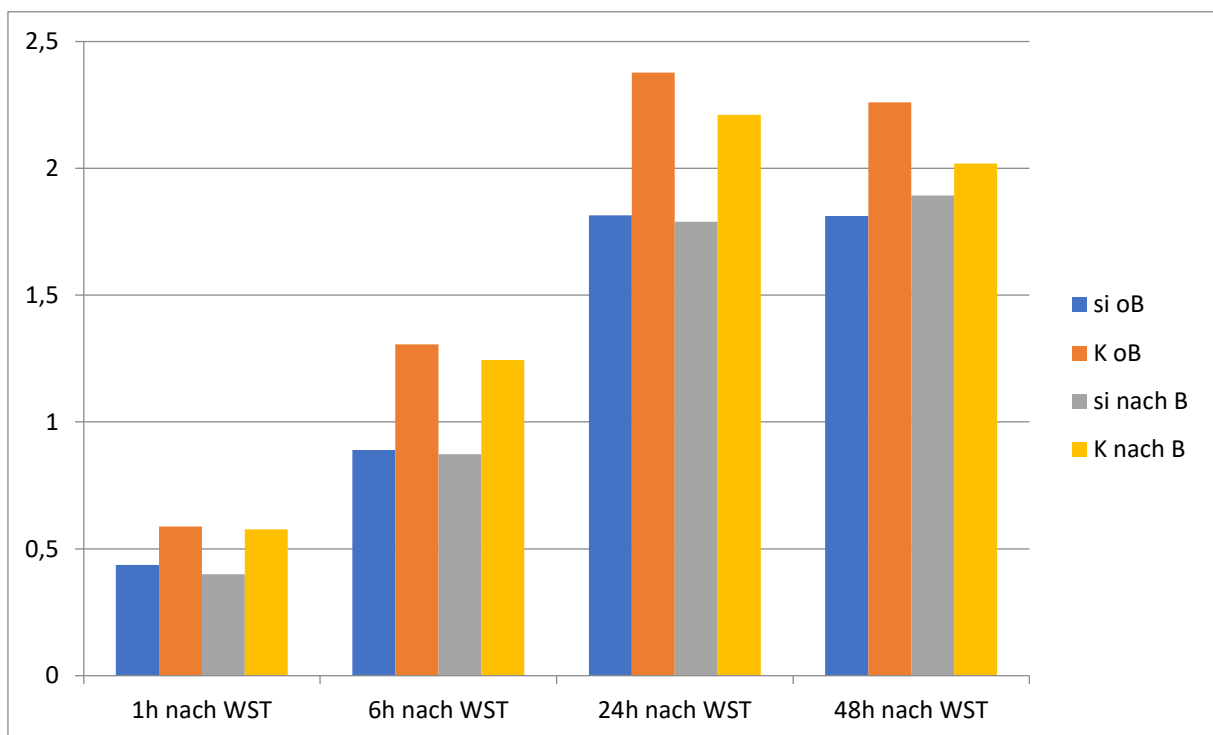


Abbildung 29 WST-1, Zellviabilität in transfizierter PCI-52

KoB: nicht-transfizierte, unbestrahlte Zellen; Kbes: nicht-transfizierte, bestrahlte Zellen; si oB: transfizierte, unbestrahlte Zellen; si bes: transfizierte, bestrahlte Zellen

4.6. Einflussfaktoren auf die Apoptose

In der Auswertung der Daten ergab sich eine Heteroskedastizität. Daher wurde zum Nachweis einer möglichen Abhängigkeit von microRNA-21 auf die Apoptoserate zunächst der Datensatz mittels Logarithmisierung transformiert (Angleichen der Varianz, Homoskedastizität, s.o.) und daraufhin eine lineare Regression der Daten durchgeführt. Von der linearen Regression wurde erneut eine unifaktorielle ANOVA erstellt. Betrachtet man jedoch die Signifikanz, dann zeigt sich, dass in der unifaktoriellen Varianzanalyse die Regression signifikant ist ($p=0,000$, $<0,05$).

Das heißt, die überprüften Variablen „Zeit“, „Bestrahlung“, „Zelllinie“ sowie „microRNA-21 Expression“ haben einen Einfluss auf die Apoptose. In der Folge sollte daher überprüft werden, ob microRNA-21 tatsächlich einen signifikanten Einfluss auf die Apoptose besitzt oder andere Einflussgrößen für die erhöhte Caspaseaktivität verantwortlich sind.

*Tabelle 11 Logarithmisierte Apoptose
Koeffizienten^a*

| Modell | | Nicht standardisierte Koeffizienten | | Standardisierte Koeffizienten | t | Sig. |
|--------|-------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|--------|------|
| | | B | Standardfehler | Beta | | |
| 1 | (Konstante) | 7,962 | ,825 | | 9,646 | ,000 |
| | Expression | -,774 | ,462 | -,195 | -1,677 | ,096 |
| | Gruppe | ,126 | ,274 | ,043 | ,459 | ,647 |
| | Zeit | ,009 | ,008 | ,127 | 1,147 | ,254 |

a. Abhängige Variable: Log_Apoptose

Tabelle 12 Unifaktorielle ANOVA der linearen Regression

ANOVA^a

| Modell | Quadratsumme | df | Mittel der Quadrate | F | Sig. | |
|--------|--------------|----------------|---------------------|---------------|--------|-------------------|
| 1 | Regression | 980523913,649 | 4 | 245130978,412 | 11,317 | ,000 ^b |
| | Residuum | 2490949611,942 | 115 | 21660431,408 | | |
| | Gesamtsumme | 3471473525,592 | 119 | | | |
| 2 | Regression | 979575324,134 | 3 | 326525108,045 | 15,200 | ,000 ^c |
| | Residuum | 2491898201,457 | 116 | 21481881,047 | | |
| | Gesamtsumme | 3471473525,592 | 119 | | | |

a. Abhängige Variable: Apoptose

b. Prädiktoren: (Konstante), Zelltyp, Zeit, Gruppe, Expression

c. Prädiktoren: (Konstante), Zelltyp, Zeit, Gruppe

4.6.1. Einflussfaktor Zeit auf die Apoptose

Es wurden daher Kofaktoren des Experiments untersucht. Von den einzelnen unabhängigen Variablen hat die Zeit über 72 Stunden gemessen die größte Signifikanz bezüglich des Einflusses auf die Apoptose ($p=0,000$, $p<0,05$).

4.6.2. Einflussfaktor Bestrahlung auf die Apoptose

An zweiter Stelle steht der erwartbare Einflussfaktor „Bestrahlung“, mit einem signifikanten Einfluss auf die Apoptose. Der p-Wert für die Signifikanz liegt bei 0,007 und damit deutlich unter der festgelegten Obergrenze von $p<0,05$.

4.6.3. Einflussfaktor Zelltyp auf die Apoptose

Im Gegensatz zu den vorbenannten Faktoren hatte der Zelltyp im vorliegenden Modell keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptose. Der p-Wert liegt mit 0,103 deutlich über der Grundbedingung $p<0,05$.

4.6.4. Einflussfaktor microRNA-21 Expression auf die Apoptose

Wie aus der deskriptiven Beschreibung von Caspase-Assay und Viabilitätstest abgeleitet, bestätigt sich für die microRNA-21 Expression die Vermutung, dass sie im vorliegenden in vitro Modell keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptose hat. Das Signifikanzniveau ist mit $p=0,835$ deutlich über $p<0,05$. Die Nullhypothese, dass die microRNA-21 Expression keinen Einfluss auf die Apoptose hat, kann nicht verworfen werden.

Tabelle 13 Signifikanz der Einflussgrößen auf die Caspaseaktivität
Koeffizienten^a

| Modell | | Nicht standardisierte Koeffizienten | | Standardisierte Koeffizienten | t | Sig. |
|--------|-------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|--------|------|
| | | B | Standardfehler | Beta | | |
| 1 | (Konstante) | -2800,566 | 3160,442 | | -,886 | ,377 |
| | Expression | -351,835 | 1681,255 | -,024 | -,209 | ,835 |
| | Gruppe | 2533,404 | 920,870 | ,236 | 2,751 | ,007 |
| | Zeit | 119,223 | 28,190 | ,434 | 4,229 | ,000 |
| | Zelltyp | 27,857 | 16,936 | ,143 | 1,645 | ,103 |
| 2 | (Konstante) | -3405,958 | 1267,385 | | -2,687 | ,008 |
| | Gruppe | 2607,683 | 846,205 | ,242 | 3,082 | ,003 |
| | Zeit | 122,993 | 21,591 | ,448 | 5,696 | ,000 |
| | Zelltyp | 29,329 | 15,342 | ,150 | 1,912 | ,058 |

a. Abhängige Variable: Apoptose

5. Diskussion

MicroRNAs zeigen je nach Gewebetyp und Entwicklungsstadium der Zelle unterschiedliche Expressionsmuster. Kommt es darüber hinaus zu einer Minder- oder Überexpression abseits der physiologischen Expression, kann dies ein Hinweis auf eine karzinogene Mutation der Zelle sein (Erson et al. 2011). Studien konnten belegen, dass ein verändertes microRNA Expressionsmuster in malignen Zellen die Fähigkeit zur Proliferation und Metastasierung erhöht. Im Fall von microRNA-21 konnte unter anderem das Tumorsuppressorgen Tropomyosin 1 (TPM1) als Ziel identifiziert werden, wobei eine Überexpression von microRNA-21 dieses blockiert und hierdurch als Onkogen in Erscheinung tritt (Lynam-Lennon et al. 2009). MicroRNA-21 wurde ebenfalls in einer Reihe von „medium-scale“ und „high-scale“ Experimenten, die die Dysregulation von verschiedenen microRNAs in Malignomen zum Ziel hatten, als bedeutender Treffer („best hit“) identifiziert und es wird vermutet, dass es daher frühzeitig als charakteristisches Merkmal einer malignen Zelle auftritt (Krichevsky und Gabriely 2009). Die Überexpression von microRNA-21 wurde zuerst am malignen Lymphom entdeckt, konnte inzwischen jedoch neben Larynxkarzinomen auch für eine Vielzahl von malignen Tumoren wie dem Glioblastoma multiforme, Brustkrebs, Kolonkarzinomen und dem Zervixkarzinom beschrieben werden (Calin und Croce 2006; Chan et al. 2005; O'Day und Lal 2010; Si et al. 2007; Lu et al. 2008; Yao und Lin 2012) und charakterisieren bei Überexpression oftmals ein Kollektiv mit schlechter Prognose, wie zum Beispiel bei Patienten mit Mammakarzinom (Anastasov et al. 2012) aber auch beim Kopf-Hals-Karzinom (Arantes et al. 2017).

Die Ursache liegt im veränderten microRNA-Expressionsmuster, welches insbesondere die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (z.B. Cisplatin) und ionisierender Strahlung beeinflusst (Vahabi et al. 2019; Henson et al. 2009; Jiang et al. 2010; Cannell et al. 2008; Cowland et al. 2007). Für microRNA-21 wurde z.B. gezeigt, dass eine Überexpression dieser microRNA zum einen den PDCD4-Rezeptor (programmed cell death 4), ein Tumorsuppressorprotein, blockiert und die Apoptose behindert (Reis et al. 2010; Shen et al. 2014; Alder et al. 2012). Der supprimierende Einfluss von microRNA-21 auf die Apoptose konnte darüber hinaus bei Inhibition von microRNA-21 wieder aufgehoben werden und die Apoptose fand physiologisch wieder statt (Lynam-Lennon et al. 2009).

Da Patienten mit fortgeschrittenen Mundhöhlenkarzinomen in der Regel durch einen multidisziplinären Ansatz therapiert werden und hierbei oftmals eine Strahlen-

beziehungsweise eine Radiochemotherapie angewandt wird, deren Hauptwirkung über die Apoptose erfolgt, ist der Einfluss von microRNA-21 auf die Apoptose unter klinischen Gesichtspunkten interessant. Insbesondere für das Glioblastoma multiforme konnte gezeigt werden, dass microRNA-21 auf eine Vielzahl von Apoptose-relevanten Signalwegen einen Einfluss ausübt (Papagiannakopoulos et al. 2008).

Vor dem Hintergrund der zuvor genannten Arbeiten und der Tatsache, dass der Therapieerfolg einer Radiochemotherapie unter anderem von der tumoralen Resistenz gegenüber der eingesetzten Substanzen und der Bestrahlung abhängt, könnte microRNA-21 auch für das Mundhöhlenkarzinom ein Patientenkollektiv charakterisieren, das weniger sensitiv für eine Radiochemotherapie ist (Paleri et al. 2005; Honecker et al. 2018). Ein Screening-Vorschlag im Sinne der Liquid-Biopsie zur Stratifizierung von Patienten wurde bereits für das Mammakarzinom formuliert (Anasasov 2012).

Die vorliegende Arbeit möchte daher einen Beitrag leisten, die Expression von microRNA-21 in Karzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereiches zu charakterisieren und hat in einem weiteren Schritt den Einfluss von microRNA-21 auf die Bestrahlungssensibilität im Knockdown-Ansatz untersucht. Die Wahl zur Untersuchung von microRNA-21 beim Mundhöhlenkarzinom wurde von Untersuchungen von Yu et al. und He et al. abgeleitet, die unabhängig voneinander bei Karzinomen des Kopf- und Hals-Bereiches eine Überexpression von microRNA-21 fanden (Yu et al. 2009; He et al. 2017). Hierdurch sind prospektiv zum einen in der Diagnostik Ansätze denkbar, die Patienten mit resistenten bzw. strahlensensiblen Tumoren detektieren (diagnostischer Wert), zum anderen kann im therapeutischen Ansatz durch Inhibition der microRNA-21 Expression eine Überwindung dieser Escape-Mechanismen versucht werden, wie es von Javanmardi et al. in einem Review als Therapieziel formuliert wurde (Javanmardi et al. 2017). Die klinische Wirksamkeit einer microRNA-21 Inhibition mit Erhöhung der Strahlensensibilität konnte zudem für das Nasopharynxkarzinom bereits aufgezeigt werden (Zhu et al. 2015).

Es wurde daher zunächst die Hypothese überprüft, ob microRNA-21 bei den untersuchten Zelllinien regelmäßig überexprimiert wird. Hierzu erfolgte die Bestimmung sowohl im unbestrahlten als auch bestrahlten Zustand gegenüber der humanen Keratinozytenzelllinie HOK. Bei den von uns untersuchten Zelllinien PCI-1, PCI-13, PCI-52 und SCC-68 konnte sowohl ohne als auch unter Bestrahlung gegenüber HOK keine signifikante Überexpression aufgezeigt werden. Dies steht im

deutlichen Gegensatz zu anderen Arbeiten von Yu et al, die eine regelmäßige Überexpression von microRNA-21 und microRNA-106 im Tumorgewebe gegenüber benachbartem gesunden Gewebe in Probebiopsien nachweisen konnten (Yu et al. 2014). Insbesondere mäßig und schlecht differenzierte Larynxkarzinome (G2 und G3) zeigten signifikant erhöhte Expressionslevel von microRNA-21 gegenüber gut differenzierten Karzinomen, Leukoplakien und laryngealem Normalgewebe (Yu et al. 2014). Eine Erklärung hierfür könnte in dem zur Untersuchung herangezogenen Untersuchungsmaterial liegen. In Studien mit deutlichem Nachweis einer Überexpression von microRNA-21 wurden insbesondere paraffinierte Tumorblöcke herangezogen (Yu et al. 2014; Gombos et al. 2013; Arantes et al. 2017; Hedbäck et al. 2014). In diesen Untersuchungen wurde neben einer Expression im Tumor selbst außerdem eine deutliche Erhöhung der microRNA-21 Expression im tumorösen Stroma und den Tumorgefäßen gefunden (Hedbäck et al. 2014). Der Einfluss einer Expression in Stroma und Blutgefäßen kann jedoch im Zellkulturversuch nicht repräsentativ abgebildet werden. Zukünftig sind 3D Zellkulturen anwendbar, um den in vivo Bedingungen einen Schritt näher zu kommen, diese stehen aber aktuell noch nicht als Basisprinzip zur Verfügung (Chaicharoenaudomrung et al. 2019; Zeilinger et al. 2016). Die Tatsache einer frühzeitigen Expression im tumoralen Gefäßsystem macht microRNA-21 jedoch auch für diagnostische Zwecke interessant, da es ebenfalls durch „high throughput highly sensitive arrays“ im Serum detektiert werden kann (Tachibana et al. 2016).

Da durch microRNA-21 beim Glioblastom der Einfluss auf verschiedene Pfade der Apoptose gezeigt werden konnte, interessierte in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss der Bestrahlung auf die microRNA-21 Expression in den verschiedenen Zelllinien. Unter Bestrahlung fiel die Expression von microRNA-21 in den Zellreihen PCI-1, -13 und SCC-68 unter Bestrahlung ab, während die Zelllinie PCI-52 sich inhomogen präsentierte. In vergleichbaren Arbeiten zur microRNA-21 Expression bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen wurde, neben grundsätzlich immer möglichen technischen Fehlern bei der Durchführung der PCR, ebenfalls die Inhomogenität von microRNA-Expressionsprofilen in der PCR und im Microarray aufgezeigt und deutet auf verschiedene Phänotypen des jeweiligen Tumors hin (Arantes et al. 2017). Dies kann wie beim Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region zur prätherapeutischen Charakterisierung von Patienten mit gutem Gesamtüberleben (geringe microRNA-21

Expression) und schlechtem Gesamtüberleben (hohe microRNA-21 Expression) führen (Arantes et al. 2017).

Gerade bei fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region stellt die Bestrahlung einen Hauptpfeiler der Therapie dar und ihre Wirkung wird durch Apoptoseinduktion vermittelt (Steel 1997; Hall 2000). Da die Caspasen 3 und 7 zentrale Vermittler der Apoptose in einer Zelle sind (Galluzzi et al. 2016; Kurokawa und Kornbluth 2009; Lamkanfi et al. 2007), steigt ihre Aktivität mit zunehmender Induktion der Apoptose an und kann per Caspaseassay detektiert werden. Der daher grundsätzlich erwartbare Anstieg der Caspaseaktivität der bestrahlten Zellreihen konnte für alle Karzinomzellreihen PCI-1, -13, -52 und SCC-68 im Ergebnisteil gezeigt werden. Es wurde daher im Folgeansatz der Einfluss von microRNA-21 auf die apoptoserelevanten Caspasen 3 und 7 sowie die Zellviabilität untersucht. Bei erhöhter Strahlensensibilität wäre der Anstieg von Caspase 3 und 7 erwartbar mit einer abnehmenden Zellviabilität vergesellschaftet. Bei erhöhter Strahlenresistenz einer Zelllinie müsste diese durch Inhibition von microRNA-21 wieder abnehmen, bei gleichzeitig ansteigenden Parametern von Caspase 3 und 7 sowie einer abnehmenden Zellviabilität. Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse der PCR-Analysen der microRNA-21 Expression in PCI-1, -13, -52 und SCC-68 unter γ -Strahlung (Abb. 12 – 19) sowie die Ergebnisse dieser Zellreihen im Caspaseassay (Abb. 21 - 25), so lässt sich zunächst ein grundsätzlich anti-apoptotischer Effekt einer erhöhten microRNA-21 Expression und konsekutiv verminderter Caspaseaktivität unter Bestrahlung vermuten. Zur Validierung wurde daher in den Zellreihen PCI-1 und PCI-52 die Caspaseaktivität erneut unter Blockade von microRNA-21 untersucht (Abb. 27, 28). Hier zeigte sich für PCI-1 durch Antagonisierung von microRNA-21 eine gesteigerte Caspaseaktivität und somit ein reversibler Effekt, wie er bereits durch Gwak et al. für Glioblastomzellen nachgewiesen werden konnte (Gwak et al. 2012). Im Gegensatz dazu war jedoch in PCI-52 unter Blockade von microRNA-21 und γ -Strahlung eine verminderte Caspaseaktivität zu beobachten. Grundsätzlich ist diese Beobachtung bei komplexen biologischen Systemen wie einem Tumor erwartbar. So zeigen auch andere Arbeiten inkongruente Ergebnisse zwischen einzelnen Zellreihen. So wurde für das Mammakarzinom gezeigt, dass unterschiedliche Genotypen zu verschiedenen Expressionsmustern von microRNA-21 als Antwort auf eine Bestrahlung führen können (Griñán-Lisón et al. 2020). Darüber hinaus deutet diese Beobachtung jedoch auch auf die komplexen Regelkreise, die der Zellantwort unter Bestrahlung zugrunde

liegen und auf einen Einfluss von microRNA-21 für die Resistenzbildung gegenüber Bestrahlung und Chemotherapeutika abseits der Apoptose. Wang und Scheiber et al. konnten zeigen, dass es durch Bestrahlung zu einem veränderten microRNA Expressionsprofil in Tumoren kommt: einige microRNAs wurden durch Bestrahlung hochreguliert, andere jedoch supprimiert (Wang et al. 2011). Durch einen biostatistischen Ansatz konnte Boominathan zeigen, dass p63 in der Lage ist, die RNase III Ribonuklease Dicer zu beeinflussen, die für die microRNA-21 Expression entscheidend ist. Das p63 tritt in zwei Formen auf, solche mit Transaktivator-domäne (TAp63) und solche, denen die Transaktivator-domäne fehlt (Δ Np63). TAp63 hat über eine Wechselwirkung mit Dicer direkten Einfluss auf die Umwandlung von pre-microRNA-21 zu microRNA-21. Andere Arbeitsgruppen konnten weiterhin zeigen, dass Δ Np63 an Smad5 bindet (Yang et al. 2006) und Smad5/1 mit Drosha/p68 interagiert, was das „pri-microRNA-21-Processing“ fördert. Interessanterweise fanden andere Arbeitsgruppen zusätzlich einen negativen Einfluss von microRNA-21 auf apoptoserelevante Komplexe wie TAp63/p53 mit einem Feedback-Regelkreis zu Δ Np63/p53/TAp63/p73 (Papagiannakopoulos et al. 2008). Dies deutet darauf hin, dass in Tumoren die frühe Überexpression von Δ Np63 durch gesteigerte Expression von maturaer microRNA-21 Tumorsuppressorgene wie TAp63 und p53 inhibiert, für die ebenfalls ein apoptoserelevanter Einfluss bestätigt ist (Boominathan 2010). Für orale Karzinome konnte der Einfluss einer Überexpression von Δ Np63 klinisch an einem Patientenkollektiv nachvollzogen werden, wobei die Überexpression von Δ Np63 ein Kollektiv mit schlechter Prognose charakterisierte und darüber hinaus auf eine erhöhte Strahlenresistenz der Tumoren hinwies (Moergel et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Einschränkungen eines in vitro Ansatzes mit vier Zelllinien gezeigt, dass unter γ -Strahlung die microRNA-21 Expression abfällt. Im Vergleich dazu zeigte Zhu et al. durch die Bestrahlung einen Anstieg der microRNA-21 Expression in einer zunehmend strahlenresistenten Zellreihe nach Anwendung von insgesamt 60 Gy (Zhu et al. 2015). Unterschiede zur vorliegenden Arbeit könnten zum einen an der Tumorentität liegen. Im Vergleich zu den Karzinomzellen des Mundhöhlenkarzinoms ist das nasopharyngeale Karzinom häufiger mit dem Epstein-Barr-Virus und auch humanen Papillomaviren assoziiert, die eine andere Sensibilität zur Bestrahlung aufweisen (Zhu et al. 2015; Lin 2012). Das Prinzip der Selektion einer strahlenresistenten Zelle durch die Anwendung von insgesamt 60 Gy stellt ebenfalls von methodischer Seite eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse dar (Zhu et al. 2015).

Weiterhin interessierte die Zellviabilität unter Bestrahlung und insbesondere der Einfluss einer Blockade von microRNA-21 auf die Zellviabilität unter Bestrahlung. Bei einem biologischen Vorteil für die Tumorzelle durch microRNA-21 unter Bestrahlung müsste die Zellviabilität nach Blockade abnehmen. Wie in Abbildung 30 dargestellt, führt tatsächlich die Blockade von microRNA-21 unter Bestrahlung zu einer verminderten Zellviabilität. Diese Beobachtung deutet auf einen strahlenprotektiven Effekt von microRNA-21 beziehungsweise auf einen strahlensensitivierenden Effekt durch die Antagonisierung von microRNA-21 hin. Für das kleinzellige Lungenkarzinom, das nasopharyngeale Karzinom sowie Gliomzellen wurde durch die Antagonisierung von microRNA-21 bereits ein strahlensensitivierender Effekt nachgewiesen (Zhu et al. 2015; Ma et al. 2014; Gwak et al. 2012). Da in unserem Versuchsansatz der Einfluss von microRNA-21 auf Caspase 3 und Caspase 7 uneinheitlich war und nicht statistisch signifikant ausfiel, darf vermutet werden, dass sich dieser strahlenprotektive Effekt nicht alleine durch Apoptoseregulation konstituiert. Zu einer ähnlichen Überlegung kommen die Autoren um die Arbeitsgruppe von Liu et al, die für das Larynxkarzinom einen Einfluss von microRNA-21 auf den pan-Zell-Zyklus-Regulator BTG2 fanden. Bei Expression von microRNA-21 kam es zu einer deutlichen Mindereexpression von BTG2 mit Einfluss auf den „G1-S-Arrest“ über den pRB-Stoffwechselweg. Die Autoren beurteilen diesen Einfluss als Erhalt der tumorösen Stammzellfähigkeit mit der Möglichkeit der Resistenzbildung gegenüber Chemotherapeutika (Liu et al. 2009). Diese Arbeit ist ebenfalls in Kongruenz mit Erkenntnissen aus Arbeiten mit dem Fokus auf gastrointestinale Tumoren. Für das Gallenblasenkarzinom und andere gastrointestinale Karzinome konnte gezeigt werden, dass microRNA-21 ein Ziel von GAS5 (growth arrest specific transcript 5) ist und beide negativ miteinander korrelieren. In gastrointestinalen Tumoren wurde ebenfalls regelmäßig eine frühe Suppression von GAS5 mit konsekutiver microRNA-21 Überexpression gefunden. Hierdurch wurde insbesondere die Proliferationsaktivität erhöht (Chen et al. 2020). Hierdurch könnte sich ein Überlebensvorteil von microRNA-21 überexprimierender Tumoren abseits einer reinen Apoptoseresistenz unter Bestrahlung ausbilden (Pan et al. 2010).

Ausblick

Auch wenn kein statistisch signifikanter Einfluss von microRNA-21 auf die Apoptose von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle im *in vitro* Modell dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, so zeigte diese Arbeit jedoch einen Effekt von γ -Strahlung auf das Expressionsprofil von microRNA-21. Da microRNA-21 in nahezu allen Tumoren gefunden wird und ein Einfluss auf multiple Stoffwechselwege und -kaskaden bereits beschrieben wurde, ist es sowohl als therapeutisches und diagnostisches Ziel interessant. Die Möglichkeit für die Nachsorge und Tumordetektierung per Liquid Biopsy erscheint auch im klinischen Alltag zukünftig realisierbar. Der Einfluss eines biologischen Faktors auf die verschiedenen Stoffwechselwege ist im Tumor komplex. Hier werden größere Mengen an Gewebe notwendig werden, um einen Einfluss, wie zum Beispiel auf die Apoptosekaskade, sichtbar und targetierbar zu machen. Für letzteren Ansatz wäre sicherlich ein Knockout-Modell zum Beispiel in der Maus interessant. Durch die komplexen Stoffwechselwege mit denen microRNAs interagieren, ergeben sich weitere interessante Aspekte der Interaktion mit intrazellulären Signalkaskaden. Im Rahmen dieser Dissertation wurden bereits eine Vielzahl weiterer Versuchsreihen zu Proteinen durchgeführt, welche in der Apoptose eine Rolle spielen. Unter anderem wurde der Einfluss von microRNA-21 auf die Expression der Proteine TAp63, Δ Np63, HIF und bcl-2 untersucht. Es zeigten sich hierbei explorativ Hinweise auf eine mögliche gegenseitige Regulation. Die hier aufgeführten Ansätze bieten daher eine interessante Grundlage für weitere Forschungsarbeiten hinsichtlich der Bedeutung von microRNA-21 z.B. im Bereich der Karzinogenese und Tumorthherapie beim Mundhöhlenkarzinom.

Zusammenfassung

Als Resultat der Karzinogenese zeigen Karzinomzellen häufig ein verändertes microRNA-21 Expressionsprofil gegenüber physiologischem Gewebe. MicroRNAs sind kleine Steuerelemente der Zelle. Sie sind unter anderem in die Zellteilung, die Zellentwicklung, aber auch in die Karzinogenese sowie in die Metastasierung von Karzinomen involviert. Für das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches wurde bereits eine Überexpression von microRNA-21 beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Expressionsprofil von microRNA-21 in Ruhe und unter singulärer γ -Strahlung bei vier Karzinomzelllinien der Kopf-Hals-Region untersucht. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung des Einflusses von microRNA-21 auf die Apoptose und die Zellviabilität unter Bestrahlung und die Beschreibung einer Inhibition von microRNA-21 im Knockdown-Modell. Ziel war es, herauszufinden, ob ein Überlebensvorteil der Karzinomzelle durch eine microRNA-21 Expression mit Einfluss auf die Apoptosekaskade definiert wird.

Dazu wurde microRNA-21 aus Karzinomzellen isoliert, die zuvor γ -Strahlung ausgesetzt waren, und das Expressionsprofil per qPCR bestimmt. Zeitgleich wurde in diesen Zellen die Caspaseaktivität und zusätzlich die WST-1 Aktivität beobachtet. Um einen möglichen Einfluss auf das apoptotische System zu detektieren wurde ein Knockdown von microRNA-21 mit einer si-microRNA durchgeführt und nochmals die Caspaseaktivität und Zellviabilität per WST-1 Test ermittelt.

Grundsätzlich fand sich eine verminderte microRNA-21 Expression unter γ -Strahlung. Ein dominanter Einfluss auf die Caspaseaktivität und ein gleichgerichteter Einfluss auf die Zellviabilität mit und ohne Inhibition konnte jedoch nicht gefunden werden. Ebenfalls blieb der Einfluss einer microRNA-21 Expression auf die Apoptosemarker Caspase 3 und 7 nach statistischer Adjustierung gegenüber den Einflussgrößen Zeit, Bestrahlung und Zelllinie nicht signifikant.

In der Zusammenschau präsentierten die untersuchten Zelllinien ein unterschiedliches microRNA-21 Expressionsprofil, das sich unter γ -Strahlung veränderte. Der Einfluss auf die Zellviabilität war aber unabhängig der Caspasen 3 und 7 und konnte nicht einheitlich im Knockdown-Ansatz inhibiert werden. Unsere Ergebnisse deuten daher auf eine Resistenzvermittlung von microRNA-21 unter Bestrahlung abseits der Apoptose hin.

Anhang

Anhang 1

Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen^a

Abhängige Variable: Apoptose

| F | df1 | df2 | Sig. |
|--------|-----|-----|------|
| 22,765 | 9 | 110 | ,000 |

Prüft die Nullhypothese, daß die Fehlervarianz der abhängigen Variablen über Gruppen hinweg gleich ist.^a

a. Design: Konstanter Term + Zeit + Expression + Gruppe + Zelltyp + Gruppe * Zelltyp

Anhang 2

ANOVA^a

| Modell | Quadratsumme | df | Mittel der Quadrate | F | Sig. |
|--------------|--------------|-----|---------------------|-------|-------------------|
| 1 Regression | 22,497 | 3 | 7,499 | 3,802 | ,012 ^b |
| Residuum | 228,817 | 116 | 1,973 | | |
| Gesamtsumme | 251,315 | 119 | | | |

a. Abhängige Variable: Log_Apoptose

b. Prädiktoren: (Konstante), Zeit, Gruppe, Expression

Literaturverzeichnis

Aghbari, Sana Maher Hasan; Abushouk, Abdelrahman Ibrahim; Attia, Attia; Elmaraezy, Ahmed; Menshawy, Amr; Ahmed, Mohamed Shehata et al. (2017): Malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions. A meta-analysis of 20095 patient data. In: *Oral oncology* 68, S. 92–102. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2017.03.012.

Akrish, Sharon; Eskander-Hashoul, Lana; Rachmiel, Adi; Ben-Izhak, Ofer (2019): Clinicopathologic analysis of verrucous hyperplasia, verrucous carcinoma and squamous cell carcinoma as part of the clinicopathologic spectrum of oral proliferative verrucous leukoplakia. A literature review and analysis. In: *Pathology, research and practice* 215 (12), S. 152670. DOI: 10.1016/j.prp.2019.152670.

Alder, Hansjuerg; Taccioli, Cristian; Chen, Hongping; Jiang, Yubao; Smalley, Karl J.; Fadda, Paolo et al. (2012): Dysregulation of miR-31 and miR-21 induced by zinc deficiency promotes esophageal cancer. In: *Carcinogenesis* 33 (9), S. 1736–1744. DOI: 10.1093/carcin/bgs204.

Allshire, Robin (2002): Molecular biology. RNAi and heterochromatin--a hushed-up affair. In: *Science (New York, N.Y.)* 297 (5588), S. 1818–1819. DOI: 10.1126/science.1075874.

Álvarez-Camacho, M.; Gonella, S.; Campbell, S.; Scrimger, R. A.; Wismer, W. V. (2017): A systematic review of smell alterations after radiotherapy for head and neck cancer. In: *Cancer treatment reviews* 54, S. 110–121. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.02.003.

Anastasov, Nataša; Höfig, Ines; Vasconcellos, Iria Gonzalez; Rappl, Kristina; Braselmann, Herbert; Ludyga, Natalie et al. (2012): Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells. In: *Radiation oncology (London, England)* 7, S. 206. DOI: 10.1186/1748-717X-7-206.

Ang, K. Kian; Zhang, Qiang; Rosenthal, David I.; Nguyen-Tan, Phuc Felix; Sherman, Eric J.; Weber, Randal S. et al. (2014): Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma. RTOG 0522. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 (27), S. 2940–2950. DOI: 10.1200/JCO.2013.53.5633.

Ansevin, A. T.; Vizard, D. L.; Brown, B. W.; McConathy, J. (1976): High-resolution thermal denaturation of DNA. I. Theoretical and practical considerations for the

resolution of thermal subtransitions. In: *Biopolymers* 15 (1), S. 153–174. DOI: 10.1002/bip.1976.360150111.

Arantes, Lidia Maria Rebolho Batista; Laus, Ana Carolina; Melendez, Matias Eliseo; Carvalho, Ana Carolina de; Sorroche, Bruna Pereira; Marchi, Pedro Rafael Martins de et al. (2017): MiR-21 as prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma patients undergoing an organ preservation protocol. In: *Oncotarget* 8 (6), S. 9911–9921. DOI: 10.18632/oncotarget.14253.

Argiris, Athanassios; Eng, Cathy (2003): Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. In: *Cancer treatment and research* 114, S. 15–60.

Argiris, Athanassios; Karamouzis, Michalis V.; Raben, David; Ferris, Robert L. (2008): Head and neck cancer. In: *The Lancet* 371 (9625), S. 1695–1709. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60728-X.

AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. und Deutsche Krebshilfe e.V. (2012): Leitlinienprogramm Onkologie, Mundhöhlenkarzinom. Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Version 2.0. AWMF-Register-Nummer (007-100OL). Online verfügbar unter http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/007_100OLI_S3_Mundhoehlenkarzinom_122012-verlaengert.pdf.

Banerjee, R.; Mani, R-S; Russo, N.; Scanlon, C. S.; Tsodikov, A.; Jing, X. et al. (2011): The tumor suppressor gene rap1GAP is silenced by miR-101-mediated EZH2 overexpression in invasive squamous cell carcinoma. In: *Oncogene* 30 (42), S. 4339–4349. DOI: 10.1038/onc.2011.141.

Begg, A. C.; van der Kolk, P. J.; Dewit, L.; Bartelink, H. (1986): Radiosensitization by cisplatin of RIF1 tumour cells in vitro. In: *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* 50 (5), S. 871–884.

Benard, Anne; Janssen, Connie M.; van den Elsen, Peter J.; van Eggermond, Marja C. J. A.; Hoon, Dave S. B.; van de Velde, Cornelis J. H.; Kuppen, Peter J. K. (2014): Chromatin status of apoptosis genes correlates with sensitivity to chemo-, immune- and radiation therapy in colorectal cancer cell lines. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 19 (12), S. 1769–1778. DOI: 10.1007/s10495-014-1042-8.

- Bernstein, Carol; Bernstein, Harris; Payne, Claire M.; Dvorak, Katerina; Garewal, Harinder (2008): Field defects in progression to gastrointestinal tract cancers. In: *Cancer letters* 260 (1-2), S. 1–10. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.11.027.
- Bernstein, Emily; Allis, C. David (2005): RNA meets chromatin. In: *Genes & development* 19 (14), S. 1635–1655. DOI: 10.1101/gad.1324305.
- Bernstein, Emily; Kim, Sang Yong; Carmell, Michelle A.; Murchison, Elizabeth P.; Alcorn, Heather; Li, Mamie Z. et al. (2003): Dicer is essential for mouse development. In: *Nature genetics* 35 (3), S. 215–217. DOI: 10.1038/ng1253.
- Bewley, Arnaud F.; Farwell, D. Gregory (2017): Oral leukoplakia and oral cavity squamous cell carcinoma. In: *Clinics in dermatology* 35 (5), S. 461–467. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2017.06.008.
- Bi, Yujing; Liu, Guangwei; Yang, Ruifu (2009): MicroRNAs. Novel regulators during the immune response. In: *Journal of cellular physiology* 218 (3), S. 467–472. DOI: 10.1002/jcp.21639.
- Bio-Rad Laboratories Inc.: iQ SYBR Green Supermix Instruction Manual 2009. Online verfügbar unter <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10016680.pdf>.
- Blandino, Giovanni; Dobbstein, Matthias (2004): p73 and p63. Why do we still need them? In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 3 (7), S. 886–894.
- Blandino, Giovanni; Moll, Ute M. (2014): p63 regulation by microRNAs. In: *Cell Cycle* 8 (10), S. 1466–1470. DOI: 10.4161/cc.8.10.8766.
- Boguszewski, Cesar Luiz; Boguszewski, Margaret Cristina da Silva; Kopchick, John J. (2016): Growth hormone, insulin-like growth factor system and carcinogenesis. In: *Endokrynologia Polska* 67 (4), S. 414–426. DOI: 10.5603/EP.a2016.0053.
- Boldrup, Linda; Coates, Philip J.; Wahlgren, Magnus; Laurell, Göran; Nylander, Karin (2012): Subsite-based alterations in miR-21, miR-125b, and miR-203 in squamous cell carcinoma of the oral cavity and correlation to important target proteins. In: *Journal of Carcinogenesis* 11. DOI: 10.4103/1477-3163.104007.
- Boominathan, Lakshmanane (2010a): The guardians of the genome (p53, TA-p73, and TA-p63) are regulators of tumor suppressor miRNAs network. In: *Cancer metastasis reviews* 29 (4), S. 613–639. DOI: 10.1007/s10555-010-9257-9.

Boominathan, Lakshmanane (2010b): The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex. In: *PloS one* 5 (5), e10615. DOI: 10.1371/journal.pone.0010615.

Bordini, Lorenzo; Taino, Giuseppe (2017): Gli effetti stocastici delle radiazioni ionizzanti. In: *Giornale italiano di medicina del lavoro ed ergonomia* 39 (2), S. 116–123.

Bose, Rumela; Ain, Rupasri (2018): Regulation of Transcription by Circular RNAs. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1087, S. 81–94. DOI: 10.1007/978-981-13-1426-1_7.

Braun, Christian J.; Zhang, Xin; Savelyeva, Irina; Wolff, Sonja; Moll, Ute M.; Schepeler, Troels et al. (2008): p53-Responsive micrornas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. In: *Cancer research* 68 (24), S. 10094–10104. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1569.

Braun, Thomas; Gautel, Mathias (2011): Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (6), S. 349–361. DOI: 10.1038/nrm3118.

Breving, Kimberly; Esquela-Kerscher, Aurora (2010): The complexities of microRNA regulation. Mirandering around the rules. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 42 (8), S. 1316–1329. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.09.016.

Buchner, J. (2002): Introduction. The cellular protein folding machinery. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59 (10), S. 1587–1588.

Calin, George A.; Croce, Carlo M. (2006): MicroRNA signatures in human cancers. In: *Nature reviews. Cancer* 6 (11), S. 857–866. DOI: 10.1038/nrc1997.

Cannell, Ian G.; Kong, Yi Wen; Bushell, Martin (2008): How do microRNAs regulate gene expression? In: *Biochemical Society transactions* 36 (Pt 6), S. 1224–1231. DOI: 10.1042/BST0361224.

Cao, Xinwei; Yeo, Gene; Muotri, Alysson R.; Kuwabara, Tomoko; Gage, Fred H. (2006): Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. In: *Annual review of neuroscience* 29, S. 77–103. DOI: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112839.

Capella, Diogo Lenzi; Gonçalves, Jussara Maria; Abrantes, Adelino António Artur; Grando, Liliane Janete; Daniel, Filipe Ivan (2017): Proliferative verrucous leukoplakia.

Diagnosis, management and current advances. In: *Brazilian journal of otorhinolaryngology* 83 (5), S. 585–593. DOI: 10.1016/j.bjorl.2016.12.005.

Chaicharoenaudomrung, Nipha; Kunhorm, Phongsakorn; Noisa, Parinya (2019): Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. In: *World journal of stem cells* 11 (12), S. 1065–1083. DOI: 10.4252/wjsc.v11.i12.1065.

Chan, Jennifer A.; Krichevsky, Anna M.; Kosik, Kenneth S. (2005): MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. In: *Cancer research* 65 (14), S. 6029–6033. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0137.

Chang, Steven S.; Jiang, Wei Wen; Smith, Ian; Poeta, Luana M.; Begum, Shahnaz; Glazer, Chad et al. (2008): MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. In: *International journal of cancer* 123 (12), S. 2791–2797. DOI: 10.1002/ijc.23831.

Chatterjea, Anindita (2013): Guidelines for miRNA mimic and miRNA inhibitor experiments. For miRNA research. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/ch/resources/resourcedetail?id=3e1477ad-74a2-4ee6-9c31-54b1997f2941&lang=en>.

Chen, Dong; Guo, Yihong; Chen, Yaqiu; Guo, Qiaonan; Chen, Junyi; Li, Yining et al. (2020): LncRNA growth arrest-specific transcript 5 targets miR-21 gene and regulates bladder cancer cell proliferation and apoptosis through PTEN. In: *Cancer medicine* 9 (8), S. 2846–2858. DOI: 10.1002/cam4.2664.

Chen, Zujian; Yu, Tianwei; Cabay, Robert J.; Jin, Yi; Mahjabeen, Ishrat; Luan, Xianghong et al. (2017): miR-486-3p, miR-139-5p, and miR-21 as Biomarkers for the Detection of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. In: *Biomarkers in Cancer* 9, S. 1–8. DOI: 10.4137/BIC.S40981.

Chendrimada, Thimmaiah P.; Finn, Kenneth J.; Ji, Xinjun; Baillat, David; Gregory, Richard I.; Liebhaber, Stephen A. et al. (2007): MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. In: *Nature* 447 (7146), S. 823–828. DOI: 10.1038/nature05841.

Chendrimada, Thimmaiah P.; Gregory, Richard I.; Kumaraswamy, Easwari; Norman, Jessica; Cooch, Neil; Nishikura, Kazuko; Shiekhattar, Ramin (2005): TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. In: *Nature* 436 (7051), S. 740–744. DOI: 10.1038/nature03868.

- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical biochemistry* 162 (1), S. 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
- Christoffersen, N. R.; Shalgi, R.; Frankel, L. B.; Leucci, E.; Lees, M.; Klausen, M. et al. (2010): p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. In: *Cell death and differentiation* 17 (2), S. 236–245. DOI: 10.1038/cdd.2009.109.
- Cimmino, Amelia; Calin, George Adrian; Fabbri, Muller; Iorio, Marilena V.; Ferracin, Manuela; Shimizu, Masayoshi et al. (2005): miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (39), S. 13944–13949. DOI: 10.1073/pnas.0506654102.
- Counts, J. L.; Goodman, J. I. (1995): Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. In: *Cell* 83 (1), S. 13–15. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90228-7.
- Cowland, Jack B.; Hother, Christoffer; Grønbaek, Kirsten (2007): MicroRNAs and cancer. In: *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 115 (10), S. 1090–1106. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_775.xml.x.
- Crowther, Andrew J.; Ocasio, Jennifer K.; Fang, Fang; Meidinger, Jessica; Wu, Jaclyn; Deal, Allison M. et al. (2016): Radiation Sensitivity in a Preclinical Mouse Model of Medulloblastoma Relies on the Function of the Intrinsic Apoptotic Pathway. In: *Cancer research* 76 (11), S. 3211–3223. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0025.
- Cunningham, F. H.; Fiebelkorn, S.; Johnson, M.; Meredith, C. (2011): A novel application of the Margin of Exposure approach. Segregation of tobacco smoke toxicants. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 49 (11), S. 2921–2933. DOI: 10.1016/j.fct.2011.07.019.
- Demokan, Semra; Dalay, Nejat (2011): Role of DNA methylation in head and neck cancer. In: *Clinical epigenetics* 2 (2), S. 123–150. DOI: 10.1007/s13148-011-0045-3.
- Dienstmann, Rodrigo; Taberero, Josep (2011): BRAF as a Target for Cancer Therapy. In: *ACAMC* 11 (3), S. 285–295. DOI: 10.2174/187152011795347469.

Dominguez, Kenneth; Ward, W. Steven (2009): A novel nuclease activity that is activated by Ca(2+) chelated to EGTA. In: *Systems biology in reproductive medicine* 55 (5-6), S. 193–199. DOI: 10.3109/19396360903234052.

Dt. Ärztebl 1997 94: A-3277-3280 [Heft 48]. Simultane Radiochemotherapie. Unter Mitarbeit von Hans-Joachim Schmoll, Jürgen Dunst, Axel Becker und Wolfgang E. Fleig. Hg. v. Deutscher Ärzteverlag GmbH und Redaktion Deutsches Ärzteblatt (48). Online verfügbar unter <https://www.aerzteblatt.de/archiv/8712/Simultane-Radiochemotherapie>, zuletzt geprüft am 18.06.2019.

Ebhardt, Harald; Reichart, Peter A.; Schmidt-Westhausen, Andrea Maria (2018): Curriculum Spezielle Pathologie für Zahnmediziner. 2., überarbeitete Auflage. Berlin: Quintessence Publishing (Curriculum).

Erson, A. E.; Yakicier, M. C.; Selcuklu, S. D. (2011): MIRN21 (microRNA 21). In: *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* (3). DOI: 10.4267/2042/38450.

Fabian, Marc Robert; Sonenberg, Nahum; Filipowicz, Witold (2010): Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. In: *Annual review of biochemistry* 79, S. 351–379. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060308-103103.

Fiedler, Jan; Jazbutyte, Virginija; Kirchmaier, Bettina C.; Gupta, Shashi K.; Lorenzen, Johan; Hartmann, Dorothee et al. (2011): MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. In: *Circulation* 124 (6), S. 720–730. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.039008.

Fietkau, R. (2012): Simultane Radiochemotherapie zur Behandlung solider Tumoren. In: *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* 188 Suppl 3, S. 263–271. DOI: 10.1007/s00066-012-0194-0.

Filipowicz, Witold; Bhattacharyya, Suwendra N.; Sonenberg, Nahum (2008): Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs. Are the answers in sight? In: *Nature reviews. Genetics* 9 (2), S. 102–114. DOI: 10.1038/nrg2290.

Filipski, K. K.; Mathijssen, R. H.; Mikkelsen, T. S.; Schinkel, A. H.; Sparreboom, A. (2009): Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 86 (4), S. 396–402. DOI: 10.1038/clpt.2009.139.

- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 391 (6669), S. 806–811. DOI: 10.1038/35888.
- Gale, Nina; Poljak, Mario; Zidar, Nina (2017): Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours. What is New in the 2017 WHO Blue Book for Tumours of the Hypopharynx, Larynx, Trachea and Parapharyngeal Space. In: *Head and neck pathology* 11 (1), S. 23–32. DOI: 10.1007/s12105-017-0788-z.
- Galluzzi, Lorenzo; López-Soto, Alejandro; Kumar, Sharad; Kroemer, Guido (2016): Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. In: *Immunity* 44 (2), S. 221–231. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.01.020.
- Galvão De Podestá, Olívia Perim; Peres, Stela Verzinhasse; Salaroli, Luciane Bresciani; Cattafesta, Monica; Podestá, José Roberto Vasconcelos de; Zeidler, Sandra Lúcia Ventorin von et al. (2019): Consumption of minimally processed foods as protective factors in the genesis of squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil. In: *PloS one* 14 (7), e0220067. DOI: 10.1371/journal.pone.0220067.
- Gandini, Sara; Botteri, Edoardo; Iodice, Simona; Boniol, Mathieu; Lowenfels, Albert B.; Maisonneuve, Patrick; Boyle, Peter (2008): Tobacco smoking and cancer. A meta-analysis. In: *International journal of cancer* 122 (1), S. 155–164. DOI: 10.1002/ijc.23033.
- Garcia-Calvo, M.; Peterson, E. P.; Rasper, D. M.; Vaillancourt, J. P.; Zamboni, R.; Nicholson, D. W.; Thornberry, N. A. (1999): Purification and catalytic properties of human caspase family members. In: *Cell death and differentiation* 6 (4), S. 362–369. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400497.
- Gasparri, Roberto; Romano, Rosalia; Sedda, Giulia; Borri, Alessandro; Petrella, Francesco; Galetta, Domenico et al. (2018): Diagnostic biomarkers for lung cancer prevention. In: *Journal of breath research* 12 (2), S. 27111. DOI: 10.1088/1752-7163/aa9386.
- Goeman, Frauke; Strano, Sabrina; Blandino, Giovanni (2017): MicroRNAs as Key Effectors in the p53 Network. In: *International review of cell and molecular biology* 333, S. 51–90. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2017.04.003.

Gombos, Katalin; Horváth, Róbert; Szele, Eszter; Juhász, Krisztina; Gocze, Katalin; Somlai, Károly et al. (2013): miRNA expression profiles of oral squamous cell carcinomas. In: *Anticancer research* 33 (4), S. 1511–1517.

Gomes, Carolina C.; Gomez, Ricardo S. (2008): MicroRNA and oral cancer. Future perspectives. In: *Oral oncology* 44 (10), S. 910–914. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2008.01.002.

Gonzalez-Cano, L.; Hillje, A-L; Fuertes-Alvarez, S.; Marques, M. M.; Blanch, A.; Ian, R. W. et al. (2013): Regulatory feedback loop between TP73 and TRIM32. In: *Cell death & disease* 4, e704. DOI: 10.1038/cddis.2013.224.

Govers, Tim M.; Patel, Sejal; Takes, Robert P.; Merkx, Thijs; Rovers, Maroeska; Grutters, Janneke (2015): Cost-effectiveness of selective neck dissection versus modified radical neck dissection for treating metastases in patients with oral cavity cancer. A modelling study. In: *Head & neck* 37 (12), S. 1762–1768. DOI: 10.1002/hed.23833.

Grandis, J. R.; Twardy, D. J. (1993): Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. In: *Cancer research* 53 (15), S. 3579–3584.

Gregory, Richard I.; Chendrimada, Thimmaiah P.; Cooch, Neil; Shiekhattar, Ramin (2005): Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. In: *Cell* 123 (4), S. 631–640. DOI: 10.1016/j.cell.2005.10.022.

Gregory, Richard I.; Yan, Kai-Ping; Amuthan, Govindasamy; Chendrimada, Thimmaiah; Doratotaj, Behzad; Cooch, Neil; Shiekhattar, Ramin (2004): The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. In: *Nature* 432 (7014), S. 235–240. DOI: 10.1038/nature03120.

Griffiths-Jones, Sam; Grocock, Russell J.; van Dongen, Stijn; Bateman, Alex; Enright, Anton J. (2006): miRBase. MicroRNA sequences, targets and gene nomenclature. In: *Nucleic acids research* 34 (Database issue), D140-4. DOI: 10.1093/nar/gkj112.

Griffiths-Jones, Sam; Saini, Harpreet Kaur; van Dongen, Stijn; Enright, Anton J. (2008): miRBase. Tools for microRNA genomics. In: *Nucleic acids research* 36 (Database issue), D154-8. DOI: 10.1093/nar/gkm952.

Griñán-Lisón, Carmen; Olivares-Urbano, María Auxiliadora; Jiménez, Gema; López-Ruiz, Elena; Del Val, Coral; Morata-Tarifa, Cynthia et al. (2020): miRNAs as radio-

response biomarkers for breast cancer stem cells. In: *Molecular oncology* 14 (3), S. 556–570. DOI: 10.1002/1878-0261.12635.

Gunn, G. Brandon; Blanchard, Pierre; Garden, Adam S.; Zhu, X. Ronald; Fuller, C. David; Mohamed, Abdallah S. et al. (2016): Clinical Outcomes and Patterns of Disease Recurrence After Intensity Modulated Proton Therapy for Oropharyngeal Squamous Carcinoma. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 95 (1), S. 360–367. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2016.02.021.

Gwak, Ho-Shin; Kim, Tae Hoon; Jo, Guk Heui; Kim, Youn-Jae; Kwak, Hee-Jin; Kim, Jong Heon et al. (2012): Silencing of microRNA-21 confers radio-sensitivity through inhibition of the PI3K/AKT pathway and enhancing autophagy in malignant glioma cell lines. In: *PloS one* 7 (10), e47449. DOI: 10.1371/journal.pone.0047449.

Halford, S.; Rowan, A.; Sawyer, E.; Talbot, I.; Tomlinson, I. (2005): O(6)-methylguanine methyltransferase in colorectal cancers. Detection of mutations, loss of expression, and weak association with G:CA:T transitions. In: *Gut* 54 (6), S. 797–802. DOI: 10.1136/gut.2004.059535.

Hall, Eric J. (2000): Radiobiology for the radiologist. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Han, Jinju; Lee, Yoontae; Yeom, Kyu-Hyun; Kim, Young-Kook; Jin, Hua; Kim, V. Narry (2004): The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. In: *Genes & development* 18 (24), S. 3016–3027. DOI: 10.1101/gad.1262504.

Handa, Osamu; Naito, Yuji; Yoshikawa, Toshikazu (2011): Redox biology and gastric carcinogenesis. The role of Helicobacter pylori. In: *Redox report : communications in free radical research* 16 (1), S. 1–7. DOI: 10.1179/174329211X12968219310756.

Harfe, Brian D.; McManus, Michael T.; Mansfield, Jennifer H.; Hornstein, Eran; Tabin, Clifford J. (2005): The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (31), S. 10898–10903. DOI: 10.1073/pnas.0504834102.

He, Hanbing; Wang, Cheng; Dai, Qian; Li, Fengtian; Bergholz, Johann; Li, Zhonghan et al. (2016a): p53 and p73 Regulate Apoptosis but Not Cell-Cycle Progression in Mouse Embryonic Stem Cells upon DNA Damage and Differentiation. In: *Stem cell reports* 7 (6), S. 1087–1098. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.10.008.

He, Qianting; Chen, Zujian; Cabay, Robert J.; Zhang, Leitao; Luan, Xianghong; Chen, Dan et al. (2016b): microRNA-21 and microRNA-375 from oral cytology as biomarkers for oral tongue cancer detection. In: *Oral oncology* 57, S. 15–20. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2016.03.017.

He, Yu; Zhang, Liangyu; Cheng, Guanghui; Yuan, Renbing; Zhuang, Yongzhi; Zhang, Dehui et al. (2017): Upregulation of circulating miR-21 is associated with poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma. In: *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 10 (7), S. 7362–7368.

Hedbäck, Nora; Jensen, David H.; Specht, Lena; Fiehn, Anne-Marie K.; Therkildsen, Marianne H.; Friis-Hansen, Lennart et al. (2014): MiR-21 expression in the tumor stroma of oral squamous cell carcinoma. An independent biomarker of disease free survival. In: *PloS one* 9 (4), e95193. DOI: 10.1371/journal.pone.0095193.

Hegan, Denise Campisi; Narayanan, Latha; Jirik, Frank R.; Edelmann, Winfried; Liskay, R. Michael; Glazer, Peter M. (2006): Differing patterns of genetic instability in mice deficient in the mismatch repair genes Pms2, Mlh1, Msh2, Msh3 and Msh6. In: *Carcinogenesis* 27 (12), S. 2402–2408. DOI: 10.1093/carcin/bgl079.

Heindl, Katrin; Pezic, Dubravka; Gebeshuber, Christoph Andreas (2014): Small RNAs and Their Big Implications. In Vivo, In Vitro, In Silico. In: *RNA Biology* 4 (3), S. 165–168. DOI: 10.4161/rna.4.3.5309.

Henson, Brian J.; Bhattacharjee, Samsiddhi; O'Dee, Dawn M.; Feingold, Eleanor; Gollin, Susanne M. (2009): Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy. In: *Genes, chromosomes & cancer* 48 (7), S. 569–582. DOI: 10.1002/gcc.20666.

Hermeking, H. (2010): The miR-34 family in cancer and apoptosis. In: *Cell death and differentiation* 17 (2), S. 193–199. DOI: 10.1038/cdd.2009.56.

Hiddemann, Wolfgang (2010): Spezieller Teil. Solide Tumoren, Lymphome, Leukämien ; mit 483 Tabellen. 2., aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer Medizin (Die Onkologie, / W. Hiddemann ... ; Teil 2).

Hoffman, Robert M. (1984): Altered methionine metabolism, DNA methylation and oncogene expression in carcinogenesis. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 738 (1-2), S. 49–87. DOI: 10.1016/0304-419X(84)90019-2.

Holmstrup, P. (2018): Oral erythroplakia-What is it? In: *Oral diseases* 24 (1-2), S. 138–143. DOI: 10.1111/odi.12709.

Honecker, Friedemann; Claßen, Johannes; Preiß, Joachim; Dornoff, Wolfgang (2018): Taschenbuch Onkologie. Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2018/2019. 19th ed. Germering bei München: W. Zuckschwerdt Verlag. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=5309193>.

Hong, Zhang; Feng, Zhang; Sai, Zhang; Tao, Su (2014): PER3, a novel target of miR-103, plays a suppressive role in colorectal cancer in vitro. In: *BMB reports* 47 (9), S. 500–505. DOI: 10.5483/bmbrep.2014.47.9.212.

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006.

Invitrogen (2013): Lipofectamine® 2000 Reagent Protocol. Online verfügbar unter https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Lipofectamine_2000_Reag_protocol.pdf.

Irwin, Meredith S.; Kondo, Keiichi; Marin, Maria Carmen; Cheng, Lynn S.; Hahn, William C.; Kaelin, William G. (2003): Chemosensitivity linked to p73 function. In: *Cancer cell* 3 (4), S. 403–410. DOI: 10.1016/s1535-6108(03)00078-3.

Ito, Yasuhiro; Miyauchi, Akira; Kudo, Takumi; Kihara, Minoru; Fukushima, Mitsuhiro; Miya, Akihiro (2017): The Effectiveness of Prophylactic Modified Neck Dissection for Reducing the Development of Lymph Node Recurrence of Papillary Thyroid Carcinoma. In: *World journal of surgery* 41 (9), S. 2283–2289. DOI: 10.1007/s00268-017-4023-6.

Jackson, James P.; Lindroth, Anders M.; Cao, Xiaofeng; Jacobsen, Steven E. (2002): Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. In: *Nature* 416 (6880), S. 556–560. DOI: 10.1038/nature731.

Javanmardi, Sanaz; Aghamaali, Mahmoud Reza; Abolmaali, Samira Sadat; Mohammadi, Samaneh; Tamaddon, Ali Mohammad (2017): miR-21, An Oncogenic Target miRNA for Cancer Therapy. Molecular Mechanisms and Recent Advancements in Chemo and Radio-resistance. In: *Current gene therapy* 16 (6), S. 375–389. DOI: 10.2174/1566523217666170102105119.

- Jethwa, Ashok R.; Khariwala, Samir S. (2017): Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. In: *Cancer metastasis reviews* 36 (3), S. 411–423. DOI: 10.1007/s10555-017-9689-6.
- Jevnaker, Anne-Marthe; Khuu, Cuong; Kj le, Elisabeth; Bryne, Magne; Osmundsen, Harald (2011): Expression of members of the miRNA17-92 cluster during development and in carcinogenesis. In: *Journal of cellular physiology* 226 (9), S. 2257–2266. DOI: 10.1002/jcp.22562.
- Jiang, Lu; Liu, Xiqiang; Kolokythas, Antonia; Yu, Jinsheng; Wang, Anxun; Heidbreder, Caroline E. et al. (2010): Downregulation of the Rho GTPase signaling pathway is involved in the microRNA-138-mediated inhibition of cell migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma. In: *International journal of cancer* 127 (3), S. 505–512. DOI: 10.1002/ijc.25320.
- Johnson, Newell W.; Jayasekara, Prasanna; Amarasinghe, A. A. Hemantha K. (2011): Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity. Epidemiology and aetiology. In: *Periodontology 2000* 57 (1), S. 19–37. DOI: 10.1111/j.1600-0757.2011.00401.x.
- Joshi, Poonam; Dutta, Sourav; Chaturvedi, Pankaj; Nair, Sudhir (2014): Head and neck cancers in developing countries. In: *Rambam Maimonides medical journal* 5 (2), e0009. DOI: 10.5041/RMMJ.10143.
- Jung, Hyun Min; Phillips, Brittany L.; Patel, Rushi S.; Cohen, Donald M.; Jakymiw, Andrew; Kong, William W. et al. (2012): Keratinization-associated miR-7 and miR-21 Regulate Tumor Suppressor Reversion-inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs (RECK) in Oral Cancer*. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (35), S. 29261–29272. DOI: 10.1074/jbc.M112.366518.
- Kajiwara, Chihiro; Fumoto, Katsumi; Kimura, Hirokazu; Nojima, Satoshi; Asano, Keita; Odagiri, Kazuki et al. (2018): p63-Dependent Dickkopf3 Expression Promotes Esophageal Cancer Cell Proliferation via CKAP4. In: *Cancer research* 78 (21), S. 6107–6120. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1749.
- Kanavy, Holly E.; Gerstenblith, Meg R. (2011): Ultraviolet radiation and melanoma. In: *Seminars in cutaneous medicine and surgery* 30 (4), S. 222–228. DOI: 10.1016/j.sder.2011.08.003.

- Kanotra, Sohit Paul; Kanotra, Sonika; Gupta, Ashutosh; Paul, J. (2011): Chemoradiation in Advanced Head and Neck Cancers. A Comparison of two Radiosensitizers, Paclitaxel and Cisplatin. In: *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery : official publication of the Association of Otolaryngologists of India* 63 (3), S. 229–236. DOI: 10.1007/s12070-011-0263-1.
- Kapur, Mridu; Monaghan, Caitlin E.; Ackerman, Susan L. (2017): Regulation of mRNA Translation in Neurons-A Matter of Life and Death. In: *Neuron* 96 (3), S. 616–637. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.09.057.
- Kasinski, Andrea L.; Slack, Frank J. (2010): Potential microRNA therapies targeting Ras, NFkappaB and p53 signaling. In: *Current opinion in molecular therapeutics* 12 (2), S. 147–157.
- Kim, V. Narry; Nam, Jin-Wu (2006): Genomics of microRNA. In: *Trends in genetics : TIG* 22 (3), S. 165–173. DOI: 10.1016/j.tig.2006.01.003.
- Kleinsorge, F.; Schmidmayr, M. (2018): Humane Papillomavirusinfektion bei Frauen. Diagnostik, Therapie und Bedeutung der Impfung. In: *Der Urologe. Ausg. A*. DOI: 10.1007/s00120-018-0795-z.
- Koenig, H.; Patel, A. (1970a): Biochemical basis for fluorouracil neurotoxicity. The role of Krebs cycle inhibition by fluoroacetate. In: *Archives of neurology* 23 (2), S. 155–160. DOI: 10.1001/archneur.1970.00480260061008.
- Koenig, H.; Patel, A. (1970b): The acute cerebellar syndrome in 5-fluorouracil chemotherapy. A manifestation of fluoroacetate intoxication. In: *Neurology* 20 (4), S. 416.
- Koide, T. (1975): Idiopathic hypertrophic subaortic stenosis (IHSS), hypertrophic obstructive cardiomyopathy (HOCM), and asymmetric septal hypertrophy (ASH). In: *Kokyu to junkan. Respiration & circulation* 23 (2), S. 148.
- Kourie, Hampig Raphael; Klastersky, Jean A. (2017): Physical long-term side-effects in young adult cancer survivors. Germ cell tumors model. In: *Current opinion in oncology* 29 (4), S. 229–234. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000375.
- Kowshik, Jaganathan; Mishra, Rajakishore; Sophia, Josephraj; Rautray, Satabdi; Anbarasu, Kumaraswamy; Reddy, G. Deepak et al. (2017): Nimbolide upregulates RECK by targeting miR-21 and HIF-1 α in cell lines and in a hamster oral carcinogenesis model. In: *Scientific Reports* 7. DOI: 10.1038/s41598-017-01960-5.

- Kozaki, Ken-ichi; Imoto, Issei; Mogi, Seiki; Omura, Ken; Inazawa, Johji (2008): Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. In: *Cancer research* 68 (7), S. 2094–2105. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5194.
- Kozomara, Ana; Griffiths-Jones, Sam (2011): miRBase. Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. In: *Nucleic acids research* 39 (Database issue), D152-7. DOI: 10.1093/nar/gkq1027.
- Kozomara, Ana; Griffiths-Jones, Sam (2014): miRBase. Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. In: *Nucleic acids research* 42 (Database issue), D68-73. DOI: 10.1093/nar/gkt1181.
- Krichevsky, Anna M.; Gabriely, Galina (2009): miR-21. A small multi-faceted RNA. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 13 (1), S. 39–53. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x.
- Kruijff, S.; Hoekstra, H. J. (2012): The current status of S-100B as a biomarker in melanoma. In: *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 38 (4), S. 281–285. DOI: 10.1016/j.ejso.2011.12.005.
- Kumar, M.; Lu, Z.; Takwi, A. A. L.; Chen, W.; Callander, N. S.; Ramos, K. S. et al. (2011): Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. In: *Oncogene* 30 (7), S. 843–853. DOI: 10.1038/onc.2010.457.
- Kurokawa, Manabu; Kornbluth, Sally (2009): Caspases and kinases in a death grip. In: *Cell* 138 (5), S. 838–854. DOI: 10.1016/j.cell.2009.08.021.
- Lagos-Quintana, M.; Rauhut, R.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. (2001): Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. In: *Science (New York, N.Y.)* 294 (5543), S. 853–858. DOI: 10.1126/science.1064921.
- Laible, G.; Wolf, A.; Dorn, R.; Reuter, G.; Nislow, C.; Lebersorger, A. et al. (1997): Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in Drosophila heterochromatin and at S. cerevisiae telomeres. In: *The EMBO journal* 16 (11), S. 3219–3232. DOI: 10.1093/emboj/16.11.3219.
- Lamkanfi, M.; Festjens, N.; Declercq, W.; Vanden Berghe, T.; Vandenabeele, P. (2007): Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. In: *Cell death and differentiation* 14 (1), S. 44–55. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402047.

Lamparella, Nicholas; Barochia, Amit; Almokadem, Salah (2013): Impact of genetic markers on treatment of non-small cell lung cancer. In: *Advances in experimental medicine and biology* 779, S. 145–164. DOI: 10.1007/978-1-4614-6176-0_6.

Lassen, Pernille; Eriksen, Jesper G.; Hamilton-Dutoit, Stephen; Tramm, Trine; Alsner, Jan; Overgaard, Jens (2009): Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (12), S. 1992–1998. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.2853.

Lawrence; Tepper; Blackstock (1997): Fluoropyrimidine-Radiation Interactions in Cells and Tumors. In: *Seminars in radiation oncology* 7 (4), S. 260–266. DOI: 10.1053/SRAO00700260.

Le, Minh T. N.; Teh, Cathleen; Shyh-Chang, Ng; Xie, Huangming; Zhou, Beiyan; Korzh, Vladimir et al. (2009): MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. In: *Genes & development* 23 (7), S. 862–876. DOI: 10.1101/gad.1767609.

Le Li; Li, Lijia; Li, Wei; Chen, Taiqi; Bin, Zou; Zhao, Lina et al. (2018): TAp73-induced phosphofructokinase-1 transcription promotes the Warburg effect and enhances cell proliferation. In: *Nature Communications* 9 (1), S. 4683. DOI: 10.1038/s41467-018-07127-8.

Lee, R. C.; Ambros, V. (2001): An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. In: *Science (New York, N.Y.)* 294 (5543), S. 862–864. DOI: 10.1126/science.1065329.

Lee, Rosalind; Feinbaum, Rhonda; Ambros, Victor (2004a): A short history of a short RNA. In: *Cell* 116, S89-S92. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00035-2.

Lee, Rosalind C.; Feinbaum, Rhonda L.; Ambros, Victor (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. In: *Cell* 75 (5), S. 843–854. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.

Lee, Yoontae; Kim, Minju; Han, Jinju; Yeom, Kyu-Hyun; Lee, Sanghyuk; Baek, Sung Hee; Kim, V. Narry (2004b): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. In: *The EMBO journal* 23 (20), S. 4051–4060. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600385.

Leeman, Jonathan E.; Li, Jin-Gao; Pei, Xin; Venigalla, Praveen; Zumsteg, Zachary S.; Katsoulakis, Evangelia et al. (2017): Patterns of Treatment Failure and Postrecurrence Outcomes Among Patients With Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell

- Carcinoma After Chemoradiotherapy Using Modern Radiation Techniques. In: *JAMA oncology* 3 (11), S. 1487–1494. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.0973.
- Lewin, Benjamin (1998): *Molekularbiologie der Gene*. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. (Spektrum Lehrbuch).
- Lewis, Benjamin P.; Shih, I-hung; Jones-Rhoades, Matthew W.; Bartel, David P.; Burge, Christopher B. (2003): Prediction of mammalian microRNA targets. In: *Cell* 115 (7), S. 787–798.
- Lezina, L.; Purmessur, N.; Antonov, A. V.; Ivanova, T.; Karpova, E.; Krishan, K. et al. (2013): miR-16 and miR-26a target checkpoint kinases Wee1 and Chk1 in response to p53 activation by genotoxic stress. In: *Cell death & disease* 4, e953. DOI: 10.1038/cddis.2013.483.
- Li, Chen; Zhang, Kai; Chen, Jing; Chen, Longbang; Wang, Rui; Chu, Xiaoyuan (2017a): MicroRNAs as regulators and mediators of forkhead box transcription factors function in human cancers. In: *Oncotarget* 8 (7), S. 12433–12450. DOI: 10.18632/oncotarget.14015.
- Li, Liqin; Li, Heng (2013): Role of microRNA-mediated MMP regulation in the treatment and diagnosis of malignant tumors. In: *Cancer Biology & Therapy* 14 (9), S. 796–805. DOI: 10.4161/cbt.25936.
- Li, Ming-Yi; Liu, Jin-Quan; Chen, Dong-Ping; Li, Zhou-Yu; Qi, Bin; He, Lu et al. (2017b): Radiotherapy induces cell cycle arrest and cell apoptosis in nasopharyngeal carcinoma via the ATM and Smad pathways. In: *Cancer Biology & Therapy* 18 (9), S. 681–693. DOI: 10.1080/15384047.2017.1360442.
- Li, Shao-Ming; Gao, Ling; Ren, Wen-Hao; Zhi, Ke-Qian (2017c): Comparative study of functional neck dissection and radical neck dissection for early oral squamous cell carcinoma. In: *Shanghai kou qiang yi xue = Shanghai journal of stomatology* 26 (3), S. 305–308.
- Li, Yi; Zhao, Shiguang; Zhen, Yunbo; Li, Qiang; Teng, Lei; Asai, Akio; Kawamoto, Keiji (2011): A miR-21 inhibitor enhances apoptosis and reduces G(2)-M accumulation induced by ionizing radiation in human glioblastoma U251 cells. In: *Brain tumor pathology* 28 (3), S. 209–214. DOI: 10.1007/s10014-011-0037-1.

- Lin, C. W.; Li, X. R.; Zhang, Y.; Hu, G.; Guo, Y. H.; Zhou, J. Y. et al. (2014): TAp63 suppress metastasis via miR-133b in colon cancer cells. In: *British Journal of Cancer* 110 (9), S. 2310–2320. DOI: 10.1038/bjc.2014.118.
- Lin, Jin-Ching (2012): Adjuvant chemotherapy in advanced nasopharyngeal carcinoma based on plasma EBV load. In: *J Radiat Oncol* 1 (2), S. 117–127. DOI: 10.1007/s13566-012-0036-9.
- Lin, Tongxiang; Chao, Connie; Saito, Shin'ichi; Mazur, Sharlyn J.; Murphy, Maureen E.; Appella, Ettore; Xu, Yang (2005): p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. In: *Nature cell biology* 7 (2), S. 165–171. DOI: 10.1038/ncb1211.
- Lingen, Mark W.; Kalmar, John R.; Karrison, Theodore; Speight, Paul M. (2008): Critical Evaluation of Diagnostic Aids for the Detection of Oral Cancer. In: *Oral oncology* 44 (1), S. 10–22. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2007.06.011.
- Liu, Haibin; Cheng, Yin; Xu, Yaping; Xu, He; Lin, Zheng; Fan, Jingping; Lang, Juntian (2019): The inhibition of tumor protein p53 by microRNA-151a-3p induced cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma. In: *Bioscience reports* 39 (10). DOI: 10.1042/BSR20191357.
- Liu, Kai; Zhao, Xinke; Gu, Jing; Wu, Jianjun; Zhang, Hong; Li, Yingdong (2017): Effects of 12C6+ heavy ion beam irradiation on the p53 signaling pathway in HepG2 liver cancer cells. In: *Acta biochimica et biophysica Sinica* 49 (11), S. 989–998. DOI: 10.1093/abbs/gmx096.
- Liu, Min; Wu, Haidong; Liu, Tao; Li, Yixuan; Wang, Fang; Wan, Haiying et al. (2009): Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma. In: *Cell research* 19 (7), S. 828–837. DOI: 10.1038/cr.2009.72.
- Liu, Yu; Chen, Chong; Xu, Zhengmin; Scuoppo, Claudio; Rillahan, Cory D.; Gao, Jianjiong et al. (2016): Deletions linked to TP53 loss drive cancer through p53-independent mechanisms. In: *Nature* 531 (7595), S. 471–475. DOI: 10.1038/nature17157.
- Lo, Wen-Liang; Yu, Cheng-Chia; Chiou, Guang-Yuh; Chen, Yi-Wei; Huang, Pin-I; Chien, Chian-Shiu et al. (2011): MicroRNA-200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells. In: *The Journal of pathology* 223 (4), S. 482–495. DOI: 10.1002/path.2826.

Lodish, Harvey F. (2004): Molecular cell biology. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company.

Lorch, Jochen H.; Goloubeva, Olga; Haddad, Robert I.; Cullen, Kevin; Sarlis, Nicholas; Tishler, Roy et al. (2011): Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck. Long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. In: *The Lancet Oncology* 12 (2), S. 153–159. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70279-5.

Lottspeich, Friedrich; Engels, Joachim W. (Hg.) (2006): Bioanalytik. 2. Aufl. München: Spektrum Akad. Verl.

Lu, Hai; Yang, Xinping; Duggal, Praveen; Allen, Clint T.; Yan, Bin; Cohen, Jonah et al. (2011): TNF- α promotes c-REL/ Δ Np63 α interaction and TAp73 dissociation from key genes that mediate growth arrest and apoptosis in head and neck cancer. In: *Cancer research* 71 (21), S. 6867–6877. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2460.

Lu, Z.; Liu, M.; Stribinskis, V.; Klinge, C. M.; Ramos, K. S.; Colburn, N. H.; Li, Y. (2008): MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. In: *Oncogene* 27 (31), S. 4373–4379. DOI: 10.1038/onc.2008.72.

Lu, Zhenduo; Jiao, Dechuang; Qiao, Jianghua; Yang, Sen; Yan, Min; Cui, Shude; Liu, Zhenzhen (2015): Restin suppressed epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis in breast cancer cells through upregulating mir-200a/b expression via association with p73. In: *Molecular cancer* 14, S. 102. DOI: 10.1186/s12943-015-0370-9.

Luan, Shihai; Sun, Linlin; Huang, Fengping (2010): MicroRNA-34a. A novel tumor suppressor in p53-mutant glioma cell line U251. In: *Archives of medical research* 41 (2), S. 67–74. DOI: 10.1016/j.arcmed.2010.02.007.

Ludwig, Joseph A.; Weinstein, John N. (2005): Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. In: *Nature reviews. Cancer* 5 (11), S. 845–856. DOI: 10.1038/nrc1739.

Luqmani, Y. A. (2005): Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. In: *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre* 14 Suppl 1, S. 35–48. DOI: 10.1159/000086183.

- Lynam-Lennon, Niamh; Maher, Stephen G.; Reynolds, John V. (2009): The roles of microRNA in cancer and apoptosis. In: *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 84 (1), S. 55–71. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2008.00061.x.
- Ma, Qunying; Wang, Xinying; Li, Zhao; Li, Bingsheng; Ma, Fengli; Peng, Liang et al. (2013): microRNA-16 represses colorectal cancer cell growth in vitro by regulating the p53/survivin signaling pathway. In: *Oncology reports* 29 (4), S. 1652–1658. DOI: 10.3892/or.2013.2262.
- Ma, Yongfu; Xia, Hui; Liu, Yang; Li, Min (2014): Silencing miR-21 sensitizes non-small cell lung cancer A549 cells to ionizing radiation through inhibition of PI3K/Akt. In: *BioMed Research International* 2014, S. 617868. DOI: 10.1155/2014/617868.
- Maasland, Denise H. E.; van den Brandt, Piet A.; Kremer, Bernd; Goldbohm, R. Alexandra; Schouten, Leo J. (2015): Consumption of vegetables and fruits and risk of subtypes of head-neck cancer in the Netherlands Cohort Study. In: *International journal of cancer* 136 (5), E396-409. DOI: 10.1002/ijc.29219.
- Mackay, I. M. (2002): Real-time PCR in virology. In: *Nucleic acids research* 30 (6), S. 1292–1305. DOI: 10.1093/nar/30.6.1292.
- Malkin, David (2011): Li-fraumeni syndrome. In: *Genes & cancer* 2 (4), S. 475–484. DOI: 10.1177/1947601911413466.
- Mamoori, Afraa; Gopalan, Vinod; Lam, Alfred K-Y (2018): Role of miR-193a in Cancer. Complexity and Factors Control the Pattern of its Expression. In: *Current cancer drug targets* 18 (7), S. 618–628. DOI: 10.2174/1568009618666180308105727.
- Manikantan, K.; Bang, B.; Sharan, R.; Mallick, I.; Chatterjee, S.; Arun, P. (2016): Therapeutic Neck Dissection in Oral Squamous Cell Carcinoma. Is Selective Neck Dissection the Way Ahead? In: *Kathmandu University medical journal (KUMJ)* 14 (55), S. 221–225.
- Mao, L.; Lee, J. S.; Fan, Y. H.; Ro, J. Y.; Batsakis, J. G.; Lippman, S. et al. (1996): Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. In: *Nature medicine* 2 (6), S. 682–685.
- Maroney, Patricia A.; Yu, Yang; Fisher, Jesse; Nilsen, Timothy W. (2006): Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. In: *Nature structural & molecular biology* 13 (12), S. 1102–1107. DOI: 10.1038/nsmb1174.

- Marur, Shanthi; D'Souza, Gypsyamber; Westra, William H.; Forastiere, Arlene A. (2010): HPV-associated head and neck cancer. A virus-related cancer epidemic. In: *The Lancet Oncology* 11 (8), S. 781–789. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70017-6.
- McGowan, John V.; Chung, Robin; Maulik, Angshuman; Piotrowska, Izabela; Walker, J. Malcolm; Yellon, Derek M. (2017): Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. In: *Cardiovascular drugs and therapy* 31 (1), S. 63–75. DOI: 10.1007/s10557-016-6711-0.
- Meier, J. K.; Schuderer, J. G.; Zeman, F.; Klingelhöffer, Ch; Hullmann, M.; Spanier, G. et al. (2019): Health-related quality of life. A retrospective study on local vs. microvascular reconstruction in patients with oral cancer. In: *BMC oral health* 19 (1), S. 62. DOI: 10.1186/s12903-019-0760-2.
- Michalowski, A. (1986): The pathogenesis of the late side-effects of radiotherapy. In: *Clinical radiology* 37 (3), S. 203–207. DOI: 10.1016/s0009-9260(86)80316-6.
- Mizoguchi, Masahiro; Guan, Yanlei; Yoshimoto, Koji; Hata, Nobuhiro; Amano, Toshiyuki; Nakamizo, Akira; Sasaki, Tomio (2012): MicroRNAs in Human Malignant Gliomas. In: *Journal of oncology* 2012, S. 732874. DOI: 10.1155/2012/732874.
- Moergel, Maximilian; Abt, Eva; Stockinger, Marcus; Kunkel, Martin (2010): Overexpression of p63 is associated with radiation resistance and prognosis in oral squamous cell carcinoma. In: *Oral oncology* 46 (9), S. 667–671. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2010.06.012.
- Mojsin, M.; Topalovic, V.; Marjanovic Vicentic, J.; Stevanovic, M. (2015): Transcription factor NF-Y inhibits cell growth and decreases SOX2 expression in human embryonal carcinoma cell line NT2/D1. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 80 (2), S. 202–207. DOI: 10.1134/S0006297915020066.
- Montgomery, M. K.; Xu, S.; Fire, A. (1998): RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (26), S. 15502–15507. DOI: 10.1073/pnas.95.26.15502.
- Moses, Michael A.; George, Andrea L.; Sakakibara, Nozomi; Mahmood, Kanwal; Ponnampereuma, Roshini M.; King, Kathryn E.; Weinberg, Wendy C. (2019): Molecular Mechanisms of p63-Mediated Squamous Cancer Pathogenesis. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (14). DOI: 10.3390/ijms20143590.

Musolino, Antonino; Bella, Maria A.; Bortesi, Beatrice; Michiara, Maria; Naldi, Nadia; Zanelli, Paola et al. (2007): BRCA mutations, molecular markers, and clinical variables in early-onset breast cancer. A population-based study. In: *Breast (Edinburgh, Scotland)* 16 (3), S. 280–292. DOI: 10.1016/j.breast.2006.12.003.

Muttagi, Sidramesh Shivanand; Chaturvedi, Pankaj; Gaikwad, Rohith; Singh, Bikramjit; Pawar, Prashant (2012): Head and neck squamous cell carcinoma in chronic areca nut chewing Indian women. Case series and review of literature. In: *Indian journal of medical and paediatric oncology : official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology* 33 (1), S. 32–35. DOI: 10.4103/0971-5851.96966.

Narayanan, L.; Fritzell, J. A.; Baker, S. M.; Liskay, R. M.; Glazer, P. M. (1997): Elevated levels of mutation in multiple tissues of mice deficient in the DNA mismatch repair gene Pms2. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (7), S. 3122–3127. DOI: 10.1073/pnas.94.7.3122.

Nekulova, Marta; Holcakova, Jitka; Gu, Xiaolian; Hrabal, Vaclav; Galtsidis, Sotiris; Orzol, Paulina et al. (2016): Δ Np63 α expression induces loss of cell adhesion in triple-negative breast cancer cells. In: *BMC Cancer* 16 (1), S. 782. DOI: 10.1186/s12885-016-2808-x.

Ng, W. L.; Chen, G.; Wang, M.; Wang, H.; Story, M.; Shay, J. W. et al. (2014): OCT4 as a target of miR-34a stimulates p63 but inhibits p53 to promote human cell transformation. In: *Cell death & disease* 5, e1024. DOI: 10.1038/cddis.2013.563.

Nguyen, Huy; Loustaunau, Cristy; Facista, Alexander; Ramsey, Lois; Hassounah, Nadia; Taylor, Hilary et al. (2010): Deficient Pms2, ERCC1, Ku86, CcOI in field defects during progression to colon cancer. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (41). DOI: 10.3791/1931.

Nguyen-Tan, Phuc Felix; Zhang, Qiang; Ang, K. Kian; Weber, Randal S.; Rosenthal, David I.; Soulieres, Denis et al. (2014): Randomized phase III trial to test accelerated versus standard fractionation in combination with concurrent cisplatin for head and neck carcinomas in the Radiation Therapy Oncology Group 0129 trial. Long-term report of efficacy and toxicity. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 (34), S. 3858–3866. DOI: 10.1200/JCO.2014.55.3925.

Noma, Ken-ichi; Sugiyama, Tomoyasu; Cam, Hugh; Verdel, Andre; Zofall, Martin; Jia, Songtao et al. (2004): RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated

transcriptional and post-transcriptional silencing. In: *Nature genetics* 36 (11), S. 1174–1180. DOI: 10.1038/ng1452.

Ochs, Meike J.; Steinhilber, Dieter; Suess, Beatrix (2011): MicroRNA Involved in Inflammation. Control of Eicosanoid Pathway. In: *Frontiers in pharmacology* 2, S. 39. DOI: 10.3389/fphar.2011.00039.

O'Day, Elizabeth; Lal, Ashish (2010): MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. In: *Breast cancer research : BCR* 12 (2), S. 201. DOI: 10.1186/bcr2484.

O'Donnell, Kathryn A.; Wentzel, Erik A.; Zeller, Karen I.; Dang, Chi V.; Mendell, Joshua T. (2005): c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. In: *Nature* 435 (7043), S. 839–843. DOI: 10.1038/nature03677.

Okumura, Tomoyuki; Shimada, Yutaka; Moriyama, Makoto; Takei, Yoshinori; Omura, Tetsuya; Sekine, Shinichi et al. (2014): MicroRNA-203 inhibits the progression of esophageal squamous cell carcinoma with restored epithelial tissue architecture in vivo. In: *International journal of oncology* 44 (6), S. 1923–1932. DOI: 10.3892/ijo.2014.2365.

Olena, Abigail F.; Patton, James G. (2010): Genomic organization of microRNAs. In: *Journal of cellular physiology* 222 (3), S. 540–545. DOI: 10.1002/jcp.21993.

Orphanos, George; Kountourakis, Panteleimon (2012): Targeting the HER2 receptor in metastatic breast cancer. In: *Hematology/oncology and stem cell therapy* 5 (3), S. 127–137. DOI: 10.5144/1658-3876.2012.127.

Ory, Benjamin; Ellisen, Leif W. (2011): A microRNA-dependent circuit controlling p63/p73 homeostasis. P53 family cross-talk meets therapeutic opportunity. In: *Oncotarget* 2 (3), S. 259–264. DOI: 10.18632/oncotarget.244.

Ory, Benjamin; Ramsey, Matthew R.; Wilson, Catherine; Vadysirisack, Douangson D.; Forster, Nicole; Rocco, James W. et al. (2011): A microRNA-dependent program controls p53-independent survival and chemosensitivity in human and murine squamous cell carcinoma. In: *The Journal of clinical investigation* 121 (2), S. 809–820. DOI: 10.1172/JCI43897.

Ota, Toshio; Suzuki, Yutaka; Nishikawa, Tetsuo; Otsuki, Tetsuji; Sugiyama, Tomoyasu; Irie, Ryotaro et al. (2004): Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. In: *Nature genetics* 36 (1), S. 40–45. DOI: 10.1038/ng1285.

- Ozsolak, Fatih; Poling, Laura L.; Wang, Zhengxin; Liu, Hui; Liu, X. Shirley; Roeder, Robert G. et al. (2008): Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. In: *Genes & development* 22 (22), S. 3172–3183. DOI: 10.1101/gad.1706508.
- Paleri, Vinidh; Stafford, Frank William; Sammut, Mario S. (2005): Laser debulking in malignant upper airway obstruction. In: *Head & neck* 27 (4), S. 296–301. DOI: 10.1002/hed.20153.
- Pan, Hao; Gu, Liqun; Liu, Binjie; Li, Yiping; Wang, Yuehong; Bai, Xinna et al. (2017): Tropomyosin-1 acts as a potential tumor suppressor in human oral squamous cell carcinoma. In: *PloS one* 12 (2). DOI: 10.1371/journal.pone.0168900.
- Pan, Xuan; Wang, Zhao-Xia; Wang, Rui (2010): MicroRNA-21. A novel therapeutic target in human cancer. In: *Cancer Biology & Therapy* 10 (12), S. 1224–1232. DOI: 10.4161/cbt.10.12.14252.
- Papagiannakopoulos, Thales; Shapiro, Alice; Kosik, Kenneth S. (2008): MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. In: *Cancer research* 68 (19), S. 8164–8172. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1305.
- Perez, Carlos A.; Wazer, David E.; Halperin, Edward C.; Brady, Luther W. (Hg.) (2013): Perez and Brady's principles and practice of radiation oncology. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&AN=1473033>.
- Peskin, A. V.; Winterbourn, C. C. (2000): A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 293 (1-2), S. 157–166.
- Poon, Ivan K. H.; Jans, David A. (2005): Regulation of nuclear transport. Central role in development and transformation? In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 6 (3), S. 173–186. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2005.00268.x.
- Poreba, Marcin; Strózyk, Aleksandra; Salvesen, Guy S.; Drag, Marcin (2013): Caspase substrates and inhibitors. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5 (8), a008680. DOI: 10.1101/cshperspect.a008680.
- Pratt, Ashley J.; MacRae, Ian J. (2009): The RNA-induced silencing complex. A versatile gene-silencing machine. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (27), S. 17897–17901. DOI: 10.1074/jbc.R900012200.

Probst, Rudolf; Grevers, Gerhard; Iro, Heinrich (Hg.) (2008): Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 635 Abbildungen, 58 Tabellen. Unter Mitarbeit von Frank Rosanowski, Ulrich Eysholdt, Thomas Brauer, Frank Waldfahrer und Peter Biesalski. Georg-Thieme-Verlag. 3. korrigierte und aktualisierte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

Promega Caspase-Glo 3/7 Assay Technical Bulletin #TB323. Online verfügbar unter <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf>.

Pu, Xinzhu; Kamendulis, Lisa M.; Klaunig, James E. (2009): Acrylonitrile-induced oxidative stress and oxidative DNA damage in male Sprague-Dawley rats. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 111 (1), S. 64–71. DOI: 10.1093/toxsci/kfp133.

Qiagen (2011a): miScript II RT Kit. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=b112855a-7ce0-4b30-b493-a5683ee130fd&lang=en>.

Qiagen (2011b): miScript PCR System Handbook - Qiagen. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/ch/resources/resourcedetail?id=7954ef25-3a39-4b0a-a27e-42689dbb4f5f&lang=en>.

Qiagen (2012): RNeasy® Mini Handbook. RNeasy Mini Kit For purification of total RNA from animal cells, animal tissues, bacteria, and yeast, and for RNA cleanup RNeasy Protect Mini Kit For immediate stabilization of RNA in harvested animal tissues and subsequent total RNA purification RNeasy Plant Mini Kit For purification of total RNA from plants and filamentous fungi. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/es/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>.

Qiagen (2014): Quick-Start Protocol. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=0948c3fd-c643-4daa-a777-11425991ba3e&lang=en>.

Ragos, Vasileios; S Mastronikolis, Nicholas; Tsiambas, Evangelos; Baliou, Evangelia; N Mastronikolis, Stylianos; Tsoukalas, Nikolaos et al. (2018): p53 mutations in oral cavity carcinoma. In: *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology* 23 (6), S. 1569–1572.

Ramalingam, Vaikundamoorthy; Varunkumar, Krishnamoorthy; Ravikumar, Vilwanathan; Rajaram, Rajendran (2018): p53 mediated transcriptional regulation of long non-coding RNA by 1-hydroxy-1-norresistomycin triggers intrinsic apoptosis in adenocarcinoma lung cancer. In: *Chemico-biological interactions* 287, S. 1–12. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.03.016.

Rehm, Hubert; Letzel, Thomas (2010): *Der Experimentator. Proteinbiochemie/Proteomics*. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (Experimentator). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-8274-2313-9>.

Reichart, Peter; Sciubba, James J.; Philipsen, Hans Peter (2018): Splitters or lumpers. The 2017 WHO Classification of Head and Neck Tumours. In: *Journal of the American Dental Association (1939)* 149 (7), S. 567–571. DOI: 10.1016/j.adaj.2018.03.029.

Reidy, J.; McHugh, E.; Stassen, L. F. A. (2011): A review of the relationship between alcohol and oral cancer. In: *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland* 9 (5), S. 278–283. DOI: 10.1016/j.surge.2011.01.010.

Reinhart, B. J.; Slack, F. J.; Basson, M.; Pasquinelli, A. E.; Bettinger, J. C.; Rougvie, A. E. et al. (2000): The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 403 (6772), S. 901–906. DOI: 10.1038/35002607.

Reis, Patricia P.; Tomenson, Miranda; Cervigne, Nilva K.; Machado, Jerry; Jurisica, Igor; Pintilie, Melania et al. (2010): Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. In: *Molecular cancer* 9, S. 238. DOI: 10.1186/1476-4598-9-238.

Reiser, Maximilian; Bartenstein, Peter (2011): *Radiologie*. 110 Tabellen. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Das duale Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-001-2136>.

Ren, WenHao; Qiang, Cui; Gao, Ling; Li, Shao-Ming; Zhang, Lin-Mei; Wang, Xiao-Long et al. (2014): Circulating microRNA-21 (MIR-21) and phosphatase and tensin homolog (PTEN) are promising novel biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma. In: *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 19 (7), S. 590–596. DOI: 10.3109/1354750X.2014.955059.

- Ridolfi, Barbara; Abdel-Haq, Hanin (2017): Neurodegenerative Disorders Treatment. The MicroRNA Role. In: *Current gene therapy* 17 (5), S. 327–363. DOI: 10.2174/1566523218666180119120726.
- Ririe, K. M.; Rasmussen, R. P.; Wittwer, C. T. (1997): Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. In: *Analytical biochemistry* 245 (2), S. 154–160. DOI: 10.1006/abio.1996.9916.
- Rivera, César (2015): Essentials of oral cancer. In: *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (9), S. 11884–11894.
- Robbins, K. T.; Medina, J. E.; Wolfe, G. T.; Levine, P. A.; Sessions, R. B.; Pruet, C. W. (1991): Standardizing neck dissection terminology. Official report of the Academy's Committee for Head and Neck Surgery and Oncology. In: *Archives of otolaryngology-head & neck surgery* 117 (6), S. 601–605.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). (Berlin, 2019): Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe., S. 24–27.
- Rocco, James W.; Leong, Chee-Onn; Kuperwasser, Nicolas; DeYoung, Maurice Phillip; Ellisen, Leif W. (2006): p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. In: *Cancer cell* 9 (1), S. 45–56. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.12.013.
- Roche Cell Proliferation Reagent WST-1 2011. Online verfügbar unter <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/cellprorobul.pdf>.
- Rodriguez, Antony; Griffiths-Jones, Sam; Ashurst, Jennifer L.; Bradley, Allan (2004): Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. In: *Genome research* 14 (10A), S. 1902–1910. DOI: 10.1101/gr.2722704.
- Rokhlin, Oskar W.; Scheinker, Vladimir S.; Taghiyev, Agshin F.; Bumcrot, David; Glover, Rebecca A.; Cohen, Michael B. (2008): MicroRNA-34 mediates AR-dependent p53-induced apoptosis in prostate cancer. In: *Cancer Biology & Therapy* 7 (8), S. 1288–1296. DOI: 10.4161/cbt.7.8.6284.
- Sachdeva, Mohit; Zhu, Shoumin; Wu, Fangting; Wu, Hailong; Walia, Vijay; Kumar, Sumit et al. (2009): p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor

miR-145. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (9), S. 3207–3212. DOI: 10.1073/pnas.0808042106.

Saraiva, Cláudia; Esteves, Marta; Bernardino, Liliana (2017): MicroRNA. Basic concepts and implications for regeneration and repair of neurodegenerative diseases. In: *Biochemical pharmacology* 141, S. 118–131. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.07.008.

Saranath, D.; Tandle, A. T.; Teni, T. R.; Dedhia, P. M.; Borges, A. M.; Parikh, D. et al. (1999): p53 inactivation in chewing tobacco-induced oral cancers and leukoplakias from India. In: *Oral oncology* 35 (3), S. 242–250. DOI: 10.1016/S1368-8375(98)00110-9.

Sarradin, Victor; Siegfried, Aurore; Uro-Coste, Emmanuelle; Delord, Jean-Pierre (2018): Classification de l'OMS 2017 des tumeurs de la tête et du cou. Principales nouveautés et mise à jour des méthodes diagnostiques. In: *Bulletin du cancer* 105 (6), S. 596–602. DOI: 10.1016/j.bulcan.2018.04.004.

Schaefer, Bernhard; Sun, Wei; Li, Yi-Sheng; Fang, Liang; Chen, Wei (2018): The evolution of posttranscriptional regulation. In: *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, e1485. DOI: 10.1002/wrna.1485.

Schwamborn, Jens C.; Berezikov, Eugene; Knoblich, Juergen A. (2009): The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. In: *Cell* 136 (5), S. 913–925. DOI: 10.1016/j.cell.2008.12.024.

Schweyen, Ramona; Stang, Andreas; Wienke, Andreas; Eckert, Alexander; Kuhnt, Thomas; Hey, Jeremias (2017): The influence of dental treatment on the development of osteoradionecrosis after radiotherapy by modern irradiation techniques. In: *Clinical oral investigations* 21 (8), S. 2499–2508. DOI: 10.1007/s00784-017-2048-8.

Scully, Crispian; Flint, Stephen; Porter, Stephen R. (1997): *Erkrankungen der Mundhöhle. Diagnose und Therapie*. 2. Aufl. München: Urban & Schwarzenberg.

Seitz, Sarah J.; Schleithoff, Elisa Schulze; Koch, Andreas; Schuster, André; Teufel, Andreas; Staib, Frank et al. (2010): Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. In: *International journal of cancer* 126 (9), S. 2049–2066. DOI: 10.1002/ijc.24861.

- Sen, George L.; Blau, Helen M. (2005): Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. In: *Nature cell biology* 7 (6), S. 633–636. DOI: 10.1038/ncb1265.
- Shah, Jatin P. (2014): A century of progress in head and neck cancer. First edition. Philadelphia, New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P), LTD.
- Shao, Junli; Wang, Chaoxi; Li, Linqiu; Liang, Hairong; Dai, Juanxiu; Ling, Xiaoxuan; Tang, Huanwen (2018): Luteoloside Inhibits Proliferation and Promotes Intrinsic and Extrinsic Pathway-Mediated Apoptosis Involving MAPK and mTOR Signaling Pathways in Human Cervical Cancer Cells. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6). DOI: 10.3390/ijms19061664.
- Shen, Fengmei; Mo, Meng-Hsuan; Chen, Liang; An, Shejuan; Tan, Xiaohui; Fu, Yebo et al. (2014): MicroRNA-21 Down-regulates Rb1 Expression by Targeting PDCD4 in Retinoblastoma. In: *Journal of Cancer* 5 (9), S. 804–812. DOI: 10.7150/jca.10456.
- Shipston, M. J.; Tian, L. (2016): Posttranscriptional and Posttranslational Regulation of BK Channels. In: *International review of neurobiology* 128, S. 91–126. DOI: 10.1016/bs.irn.2016.02.012.
- Si, H.; Lu, H.; Yang, X.; Mattox, A.; Jang, M.; Bian, Y. et al. (2016): TNF- α modulates genome-wide redistribution of Δ Np63 α /TAp73 and NF- κ B cREL interactive binding on TP53 and AP-1 motifs to promote an oncogenic gene program in squamous cancer. In: *Oncogene* 35 (44), S. 5781–5794. DOI: 10.1038/onc.2016.112.
- Si, M-L; Zhu, S.; Wu, H.; Lu, Z.; Wu, F.; Mo, Y-Y (2007): miR-21-mediated tumor growth. In: *Oncogene* 26 (19), S. 2799–2803. DOI: 10.1038/sj.onc.1210083.
- Singchat, Worapong; Hitakomate, Ekarat; Rerkarmnuaychoke, Budsaba; Suntronpong, Aorarat; Fu, Beiyuan; Bodhisuwan, Winai et al. (2016): Genomic Alteration in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) Cell Lines Inferred from Karyotyping, Molecular Cytogenetics, and Array Comparative Genomic Hybridization. In: *PloS one* 11 (8), e0160901. DOI: 10.1371/journal.pone.0160901.
- Siomi, Haruhiko; Siomi, Mikiko C. (2010): Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. In: *Molecular cell* 38 (3), S. 323–332. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.03.013.

- Skiba-Tatarska, Marta; Kusa-Podkańska, Marta; Surtel, Anna; Wysokińska-Miszczuk, Joanna (2016): The side-effects of head and neck tumors radiotherapy. In: *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* 41 (241), S. 47–49.
- Skipper, Magdalena (2007): Dedicated protection for the female germline. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (1), S. 4–5. DOI: 10.1038/nrm2091.
- Slaughter, Danely P.; Southwick, Harry W.; Smejkal, Walter (1953): “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. In: *Cancer* 6 (5), S. 963–968. DOI: 10.1002/1097-0142(195309)6:5<963::AID-CNCR2820060515>3.0.CO;2-Q.
- Soares, Eduardo; Zhou, Huiqing (2018): Master regulatory role of p63 in epidermal development and disease. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 75 (7), S. 1179–1190. DOI: 10.1007/s00018-017-2701-z.
- Song, Ji-Joon; Liu, Jidong; Tolia, Niraj H.; Schneiderman, Jonathan; Smith, Stephanie K.; Martienssen, Robert A. et al. (2003): The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. In: *Nature structural biology* 10 (12), S. 1026–1032. DOI: 10.1038/nsb1016.
- Steel, G. Gordon (Hg.) (1997): Basic clinical radiobiology. 2. ed. London u.a.: Arnold.
- Stiewe, T.; Pützer, B. M. (2001): p73 in apoptosis. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 6 (6), S. 447–452. DOI: 10.1023/a:1012433522902.
- Stoscheck, C. M.; King, L. E. (1986): Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. In: *Cancer research* 46 (3), S. 1030–1037.
- Strano, S.; Rossi, M.; Fontemaggi, G.; Munarriz, E.; Soddu, S.; Sacchi, A.; Blandino, G. (2001): From p63 to p53 across p73. In: *FEBS letters* 490 (3), S. 163–170. DOI: 10.1016/s0014-5793(01)02119-6.
- Strano, Sabrina; Blandino, Giovanni (2003): p73-mediated chemosensitivity. A preferential target of oncogenic mutant p53. In: *Cell Cycle* 2 (4), S. 348–349.
- Su, Xiaohua; Gi, Young Jin; Chakravarti, Deepavali; Chan, Io Long; Zhang, Aijun; Xia, Xuefeng et al. (2012): TAp63 is a master transcriptional regulator of lipid and glucose metabolism. In: *Cell metabolism* 16 (4), S. 511–525. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.09.006.
- Sun, Teng; Dong, Yan-Han; Du, Wei; Shi, Chun-Ying; Wang, Kun; Tariq, Muhammad-Akram et al. (2017): The Role of MicroRNAs in Myocardial Infarction. From Molecular

Mechanism to Clinical Application. In: *International Journal of Molecular Sciences* 18 (4). DOI: 10.3390/ijms18040745.

Suwasini, S.; Chatterjee, Kabita; Purkait, Swapan Kumar; Samaddar, Dipankar; Chatterjee, Ananjan; Kumar, Madhuresh (2018): Expression of P53 Protein and Ki-67 Antigen in Oral Leukoplakia with Different Histopathological Grades of Epithelial Dysplasia. In: *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry* 8 (6), S. 513–522. DOI: 10.4103/jispcd.JISPCD_241_18.

Tachibana, Hirohiko; Sho, Ri; Takeda, Yuji; Zhang, Xuhong; Yoshida, Yukie; Narimatsu, Hiroto et al. (2016): Circulating miR-223 in Oral Cancer. Its Potential as a Novel Diagnostic Biomarker and Therapeutic Target. In: *PloS one* 11 (7), e0159693. DOI: 10.1371/journal.pone.0159693.

Timmons, Lisa; Tabara, Hiroaki; Mello, Craig C.; Fire, Andrew Z. (2003): Inducible Systemic RNA Silencing in *Caenorhabditis elegans*. In: *Molecular Biology of the Cell* 14 (7), S. 2972–2983. DOI: 10.1091/mbc.E03-01-0858.

Tseng, Hui-Hwa; Tseng, Yu-Kai; You, Jyun-Jie; Kang, Bor-Hwang; Wang, Tsung-Han; Yang, Cheng-Mei et al. (2017): Next-generation Sequencing for microRNA Profiling. MicroRNA-21-3p Promotes Oral Cancer Metastasis. In: *Anticancer research* 37 (3), S. 1059–1066. DOI: 10.21873/anticancer.11417.

Urbánek, P.; Klotz, L-O (2017): Posttranscriptional regulation of FOXO expression. MicroRNAs and beyond. In: *British journal of pharmacology* 174 (12), S. 1514–1532. DOI: 10.1111/bph.13471.

Vahabi, Mahrou; Pulito, Claudio; Sacconi, Andrea; Donzelli, Sara; D'Andrea, Marco; Manciocco, Valentina et al. (2019): miR-96-5p targets PTEN expression affecting radio-chemosensitivity of HNSCC cells. In: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 38 (1), S. 9. DOI: 10.1186/s13046-019-1119-x.

van der Riet, P.; Nawroz, H.; Hruban, R. H.; Corio, R.; Tokino, K.; Koch, W.; Sidransky, D. (1994): Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. In: *Cancer research* 54 (5), S. 1156–1158.

van der Waal, I. (2019): Oral leukoplakia; a proposal for simplification and consistency of the clinical classification and terminology. In: *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 24 (6), e799-e803. DOI: 10.4317/medoral.23372.

Veij Mestdagh, Pieter D. de; van Werkhoven, Eric; Navran, Arash; Boer, Jan Paul de; Schreuder, Willem H.; Vogel, Wouter V.; Al-Mamgani, Abraham (2019): Incidence of contralateral regional failure in the electively irradiated contralateral neck of patients with head and neck squamous cell carcinoma. In: *Clinical and translational radiation oncology* 17, S. 7–13. DOI: 10.1016/j.ctro.2019.04.015.

Verdel, André; Jia, Songtao; Gerber, Scott; Sugiyama, Tomoyasu; Gygi, Steven; Grewal, Shiv I. S.; Moazed, Danesh (2004): RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5658), S. 672–676. DOI: 10.1126/science.1093686.

Vikhreva, Polina; Melino, Gerry; Amelio, Ivano (2018): p73 Alternative Splicing. Exploring a Biological Role for the C-Terminal Isoforms. In: *Journal of molecular biology* 430 (13), S. 1829–1838. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.04.034.

Vogelstein, Bert; Papadopoulos, Nickolas; Velculescu, Victor E.; Zhou, Shibin; Diaz, Luis A.; Kinzler, Kenneth W. (2013): Cancer genome landscapes. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6127), S. 1546–1558. DOI: 10.1126/science.1235122.

Vora, H. H.; Trivedi, T. I.; Shukla, S. N.; Shah, N. G.; Goswami, J. V.; Shah, P. M. (2006): p53 expression in leukoplakia and carcinoma of the tongue. In: *The International journal of biological markers* 21 (2), S. 74–80. DOI: 10.5301/jbm.2008.5628.

Wagner, S.; Reder, H.; Sharma, S. J.; Würdemann, N.; Wittekindt, C.; Klußmann, J. P. (2018): Das HPV-getriebene Oropharynxkarzinom – Inzidenz, Trends, Diagnose und Therapie. In: *Der Urologe. Ausg. A*. DOI: 10.1007/s00120-018-0810-4.

Waissbluth, Sofia; Daniel, Sam J. (2013): Cisplatin-induced ototoxicity. Transporters playing a role in cisplatin toxicity. In: *Hearing research* 299, S. 37–45. DOI: 10.1016/j.heares.2013.02.002.

Wakiyama, Motoaki; Takimoto, Koji; Ohara, Osamu; Yokoyama, Shigeyuki (2007): Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. In: *Genes & development* 21 (15), S. 1857–1862. DOI: 10.1101/gad.1566707.

Wan, Guohui; Mathur, Rohit; Hu, Xiaoxiao; Zhang, Xinna; Lu, Xiongbin (2011): miRNA response to DNA damage. In: *Trends in biochemical sciences* 36 (9), S. 478–484. DOI: 10.1016/j.tibs.2011.06.002.

- Wang, Yin; Zhu, Yu; Lv, Pin; Li, Longjiang (2015): Targeting miR-21 with AS-miR-21 suppresses aggressive growth of human tongue squamous cell carcinoma in vivo. In: *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (5), S. 4773–4781.
- Wang, Yong; Scheiber, Melissa N.; Neumann, Carola; Calin, George A.; Zhou, Daohong (2011): MicroRNA regulation of ionizing radiation-induced premature senescence. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 81 (3), S. 839–848. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2010.09.048.
- Warnakulasuriya, S.; Ariyawardana, A. (2016): Malignant transformation of oral leukoplakia. A systematic review of observational studies. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 45 (3), S. 155–166. DOI: 10.1111/jop.12339.
- Warnakulasuriya, Saman (2009): Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. In: *Oral oncology* 45 (4-5), S. 309–316. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2008.06.002.
- Warnakulasuriya, Saman (2018): Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. In: *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 125 (6), S. 582–590. DOI: 10.1016/j.oooo.2018.03.011.
- Watson, J. D.; Crick, F. H. (1953): Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. In: *Nature* 171 (4356), S. 737–738. DOI: 10.1038/171737a0.
- Wendt, T. G.; Grabenbauer, G. G.; Rödel, C. M.; Thiel, H. J.; Aydin, H.; Rohloff, R. et al. (1998): Simultaneous radiochemotherapy versus radiotherapy alone in advanced head and neck cancer. A randomized multicenter study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16 (4), S. 1318–1324. DOI: 10.1200/JCO.1998.16.4.1318.
- Wienholds, Erno; Plasterk, Ronald H. A. (2005): MicroRNA function in animal development. In: *FEBS letters* 579 (26), S. 5911–5922. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.07.070.
- Wienken, Christoph J.; Baaske, Philipp; Duhr, Stefan; Braun, Dieter (2011): Thermophoretic melting curves quantify the conformation and stability of RNA and DNA. In: *Nucleic acids research* 39 (8), e52. DOI: 10.1093/nar/gkr035.

Wightman, Bruce; Ha, Ilho; Ruvkun, Gary (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. In: *Cell* 75 (5), S. 855–862. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90530-4.

Wittekind, Christian (Hg.) (2017): TNM - Klassifikation maligner Tumoren. Union for International Cancer Control; Wiley-VCH. Achte Auflage. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Online verfügbar unter <http://www.wiley-vch.de/publish/dt/books/ISBN978-3-527-34280-8/>.

Wittenberg, Curt; Reed, Steven I. (2005): Cell cycle-dependent transcription in yeast. Promoters, transcription factors, and transcriptomes. In: *Oncogene* 24 (17), S. 2746–2755. DOI: 10.1038/sj.onc.1208606.

Wong, Thian-Sze; Liu, Xiao-Bing; Wong, Birgitta Yee-Hang; Ng, Raymond Wai-Man; Yuen, Anthony Po-Wing; Wei, William Ignace (2008): Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14 (9), S. 2588–2592. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0666.

Wu, Bo-hai; Xiong, Xue-peng; Jia, Jun; Zhang, Wen-feng (2011): MicroRNAs. New actors in the oral cancer scene. In: *Oral oncology* 47 (5), S. 314–319. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2011.03.019.

www.mirbase.org: mir21 Geninformation. Online verfügbar unter http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000077.

Xie, Xiaohui; Lu, Jun; Kulbokas, E. J.; Golub, Todd R.; Mootha, Vamsi; Lindblad-Toh, Kerstin et al. (2005): Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. In: *Nature* 434 (7031), S. 338–345. DOI: 10.1038/nature03441.

Xu, Pinglong; Lin, Xia; Feng, Xin-Hua (2016): Posttranslational Regulation of Smads. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8 (12). DOI: 10.1101/cshperspect.a022087.

Yan, Xiaowei; Hoek, Tim A.; Vale, Ronald D.; Tanenbaum, Marvin E. (2016): Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules In Vivo. In: *Cell* 165 (4), S. 976–989. DOI: 10.1016/j.cell.2016.04.034.

Yang, Annie; Zhu, Zhou; Kapranov, Philipp; McKeon, Frank; Church, George M.; Gingeras, Thomas R.; Struhl, Kevin (2006): Relationships between p63 binding, DNA

sequence, transcription activity, and biological function in human cells. In: *Molecular cell* 24 (4), S. 593–602. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.10.018.

Yang, Cheng-Chieh; Hung, Pei-Shih; Wang, Pei-Wen; Liu, Chung-Ji; Chu, Ting-Hui; Cheng, Hui-Wen; Lin, Shu-Chun (2011): miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 40 (5), S. 397–404. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2010.01003.x.

Yao, Tingting; Lin, Zhongqiu (2012): MiR-21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20. In: *Biochimica et biophysica acta* 1822 (2), S. 248–260. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.09.018.

Yi, Rui; Qin, Yi; Macara, Ian G.; Cullen, Bryan R. (2003): Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. In: *Genes & development* 17 (24), S. 3011–3016. DOI: 10.1101/gad.1158803.

Yu, Tao; Wang, Xiao-yi; Gong, Ren-guo; Li, An; Yang, Sen; Cao, Yu-tang et al. (2009): The expression profile of microRNAs in a model of 7,12-dimethyl-benzaanthrance-induced oral carcinogenesis in Syrian hamster. In: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 28 (1), S. 64. DOI: 10.1186/1756-9966-28-64.

Yu, Xing; Wu, Yibo; Liu, Yang; Deng, Hongxia; Shen, Zhisen; Xiao, Bingxiu; Guo, Junming (2014): miR-21, miR-106b and miR-375 as novel potential biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma. In: *Current pharmaceutical biotechnology* 15 (5), S. 503–508. DOI: 10.2174/1389201015666140519110616.

Yu, Zhi-wei; Zhong, Lai-ping; Ji, Tong; Zhang, Ping; Chen, Wan-tao; Zhang, Chen-ping (2010): MicroRNAs contribute to the chemoresistance of cisplatin in tongue squamous cell carcinoma lines. In: *Oral oncology* 46 (4), S. 317–322. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2010.02.002.

Yuan, Tom Z.; Ormonde, Callum F. G.; Kudlacek, Stephan T.; Kunche, Sameeran; Smith, Joshua N.; Brown, William A. et al. (2015): Shear-stress-mediated refolding of proteins from aggregates and inclusion bodies. In: *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 16 (3), S. 393–396. DOI: 10.1002/cbic.201402427.

- Zätterström, U. K.; Wennerberg, J.; Ewers, S. B.; Willén, R.; Attewell, R. (1991): Prognostic factors in head and neck cancer. Histologic grading, DNA ploidy, and nodal status. In: *Head & neck* 13 (6), S. 477–487. DOI: 10.1002/hed.2880130603.
- Zeilinger, Katrin; Freyer, Nora; Damm, Georg; Seehofer, Daniel; Knöspel, Fanny (2016): Cell sources for in vitro human liver cell culture models. In: *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 241 (15), S. 1684–1698. DOI: 10.1177/1535370216657448.
- Zeng, Yan; Cullen, Bryan R. (2004): Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. In: *Nucleic acids research* 32 (16), S. 4776–4785. DOI: 10.1093/nar/gkh824.
- Zeng, Yan; Yi, Rui; Cullen, Bryan R. (2005): Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. In: *The EMBO journal* 24 (1), S. 138–148. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600491.
- Zhang, Baohong; Pan, Xiaoping; Cobb, George P.; Anderson, Todd A. (2007): microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. In: *Developmental biology* 302 (1), S. 1–12. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.08.028.
- Zhang, Yanhong; Yan, Wensheng; Jung, Yong Sam; Chen, Xinbin (2012): Mammary epithelial cell polarity is regulated differentially by p73 isoforms via epithelial-to-mesenchymal transition. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (21), S. 17746–17753. DOI: 10.1074/jbc.M112.358143.
- Zhang, Yingjie; Gao, Jin-Song; Tang, Xiaoli; Tucker, Lynne D.; Quesenberry, Peter; Rigoutsos, Isidore; Ramratnam, Bharat (2009a): MicroRNA 125a and its regulation of the p53 tumor suppressor gene. In: *FEBS letters* 583 (22), S. 3725–3730. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.10.002.
- Zhang, Yuqing; Li, Min; Wang, Hao; Fisher, William E.; Lin, Peter H.; Yao, Qizhi; Chen, Changyi (2009b): Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. In: *World journal of surgery* 33 (4), S. 698–709. DOI: 10.1007/s00268-008-9833-0.
- Zhu, Honghai; Zhu, Xiaoyuan; Cheng, Genyang; Zhou, Minghui; Lou, Weihua (2015): Downregulation of microRNA-21 enhances radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma. In: *Experimental and Therapeutic Medicine* 9 (6), S. 2185–2189. DOI: 10.3892/etm.2015.2403.

Zipper, Hubert; Brunner, Herwig; Bernhagen, Jürgen; Vitzthum, Frank (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. In: *Nucleic acids research* 32 (12), e103. DOI: 10.1093/nar/gnh101.

Danksagung

Schlussendlich ist diese Arbeit zu Ende gekommen und meine Erleichterung darüber ist außerordentlich. Auch wenn diese Arbeit mich sehr viel Zeit, Energie und Aufwand gekostet hat, wäre sie ohne das Zutun und die Geduld Anderer nicht möglich gewesen. Daher möchte ich hier insbesondere meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Maximilian Moergel für die sehr gute Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren danken. Er begleitete diese Arbeit mit seinem Rat, vielen Anregungen und letztlich auch seiner Zeit sowie viel Geduld. Ich lernte ihn als einen sehr anspruchsvollen und kompetenten Menschen kennen, der für die in einer Promotionsarbeit zwangsläufig auftretenden Probleme gute Ratschläge und Hilfestellungen parat hatte. Darüberhinaus möchte ich gerne Frau Dr. Jutta Goldschmidt erwähnen, während der Experimente im Labor war sie für mich eine immer ansprechbare Unterstützerin, die mir in vielen schwierigen Situationen weiter zu helfen wusste. Weiterhin möchte ich mich bei dem weiteren Gutachter dieser Arbeit Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. K. Sagheb für die Bewertung bedanken. Dank gilt auch dem Team des IMBEI um Frau Prof. Dr. M. Blettner, insbesondere meiner Statistikberaterin Frau Dr. Poplawski möchte ich für die kompetente Beratung hinsichtlich der Durchführung der statistischen Auswertung dieser Arbeit und natürlich für ihre freundliche und entgegenkommende Art danken. Ebenso gilt mein Dank Herrn Priestersbach für seine sachkundige, geduldige und wertvolle Unterstützung bei der statistischen Analyse der Daten dieser Doktorarbeit. Dr. Kathrin Hofstädter möchte ich für Ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfe in der Endphase dieser Arbeit danken. Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir in meinem Leben alle Freiheiten ließen und ohne deren Unterstützung mein Studium der Humanmedizin und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären. Ihr stetiges Interesse am Fortschritt meiner Promotion war Ansporn für mich, diese zu Ende zu bringen. Ihnen möchte ich meine tiefe Dankbarkeit zum Ausdruck bringen, ohne sie würde ich heute nicht dort stehen, wo ich bin.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|--------------------|
| Name | Christoph Kroschke |
| Geburtsdatum | 25.04.1986 |
| Geburtsort | Nürtingen |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |

Schulbildung

| | |
|-------------|--|
| 1992 - 1996 | Grundschule Linsenhofen |
| 1996 - 2005 | Hölderlin - Gymnasium, Nürtingen |
| 22.06.2005 | Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife mit Abschlussnote 1,8 |

Studium

| | |
|-------------------|--|
| 10/2005 - 10/2006 | Studium Fachrichtung Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg |
| 10/2006 - 07/2007 | Studium an der Berufsakademie Stuttgart, Fachrichtung Maschinenbau |
| 10/2007 - 04/2008 | Studium der Mathematik und Geschichte an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen |
| 04/2008 - 05/2014 | Studium der Medizin an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz |
| WS 09/10 | Studentische Hilfskraft im Makroskopischen Kurs der Anatomie |
| 24.03.2010 | Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit der Note befriedigend |
| 09.05.2014 | Ärztliche Prüfung mit der Note befriedigend |

Berufslaufbahn

| | |
|-------------------------|--|
| 15.02.2015 – 15.06.2020 | Assistenzarzt Chirurgie in der medius Klinik Nürtingen |
|-------------------------|--|