

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

Auswirkungen von Valproinsäure auf die Paraoxonase-2 (PON2) in Zellen des oralen  
Plattenepithelkarzinoms

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

Vorgelegt von

Moritz Koopmann  
aus Siegen

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter: xxx

2. Gutachter: xxx

Tag der Promotion: 22. August 2025

Meinen Eltern

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	III
TABELLENVERZEICHNIS.....	IV
<b>1 EINLEITUNG / ZIEL DER DISSERTATION .....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURDISKUSSION .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Das orale Plattenepithelkarzinom .....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Epidemiologie des oralen Plattenepithelkarzinoms .....	4
2.1.2 Ätiologie des oralen Plattenepithelkarzinoms.....	4
2.1.3 Karzinogenese .....	5
2.1.4 Klinische Manifestation .....	6
2.1.5 Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms.....	8
2.1.6 Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies .....	9
2.1.7 Inhibierung des Zelltodes .....	11
<b>2.2 Paraoxonase-2 .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Histon-Deacetylase .....</b>	<b>14</b>
2.3.1 Histon-Deacetylase-Inhibitoren.....	15
<b>2.4 Valproinsäure.....</b>	<b>16</b>
<b>2.5 p21.....</b>	<b>17</b>
<b>2.6 p27.....</b>	<b>18</b>
<b>2.7 Caveolin-1 .....</b>	<b>18</b>
<b>2.8 Autophagiemarker LC3B.....</b>	<b>19</b>
<b>2.9 GRP78 .....</b>	<b>21</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>23</b>
3.1.1 Zellkultur.....	23
3.1.2 Molekularbiologische Reagenzien.....	24
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien .....	25
3.1.4. Verbrauchsmaterialien .....	26
3.1.5 Laborgeräte .....	27
3.1.6 Zelllinien .....	28
3.1.7 Antikörper .....	28
<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.2.1 Zellbiologische Methoden .....	29
3.2.1.1 Etablierung der Zellkultur .....	29
3.2.1.2 Passagieren der Zellen .....	29
3.2.1.3 Behandlung der Zellen mit Valproinsäure .....	30
3.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	32
3.2.2.1 RNA-Extraktion .....	32
3.2.2.2 Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA .....	33

3.2.2.3 Reverse Transkription .....	33
3.2.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR.....	35
3.2.2.5 MTT-Protokoll .....	38
3.2.2.6 Proteinextraktion.....	39
3.2.2.7 Messung der Proteinmengen .....	40
3.2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	40
3.2.2.8 Western Blot.....	42
3.2.2.9 Stripping.....	46
3.2.2.10 Die Messung von intrazellulären ROS-Spiegeln .....	47
3.2.2.11 Durchführung der statistischen Analysen.....	47
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Bestimmung der basalen PON2 Expression.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Bestimmung der spezifischen VPA-Konzentration .....</b>	<b>50</b>
<b>4.3 Einfluss von VPA auf die Genexpression von PON2, p21, CAV1, LC3B und p27 .....</b>	<b>52</b>
<b>4.4 Analyse der Proteinexpression .....</b>	<b>54</b>
4.4.1 Analyse der PON2 Proteinexpression.....	54
4.4.2 Analyse der GRP78 Proteinexpression .....	56
<b>4.5 Ergebnisse Viabilitätsmessung .....</b>	<b>58</b>
<b>4.6 Ergebnisse der intrazellulären ROS-Messung.....</b>	<b>60</b>
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1 Auswirkungen von Valproinsäure auf den Zellzyklus und die p21-Expression .....</b>	<b>62</b>
<b>5.2 Auswirkung von Valproinsäure auf die Zellviabilität .....</b>	<b>64</b>
<b>5.3 Auswirkung von Valproinsäure auf die Expression von Paraoxonase-2 .....</b>	<b>66</b>
<b>5.4 Valproinsäure und die Induktion von oxidativem Stress .....</b>	<b>68</b>
<b>5.5 Valproinsäure und die Induktion von Autophagie.....</b>	<b>69</b>
<b>5.6 Die Rolle von Caveolin-1.....</b>	<b>70</b>
<b>5.7 Die Wirkung von Valproinsäure auf p27 .....</b>	<b>71</b>
<b>5.8 Auswirkungen von Valproinsäure auf die Expression von GRP78.....</b>	<b>72</b>
<b>5.9 Valproinsäure und PON2 in der adjuvanten Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms .....</b>	<b>73</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>75</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>77</b>
<b>8 DANKSAGUNG .....</b>	<b>94</b>
<b>9 TABELLARISCHER LEBENS LAUF .....</b>	<b>95</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Apaf-1	apoptotischer Aktivierungsfaktor 1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
as	antisense
ATP	Adenosintriphosphat
BCL-2	B-Zell-Lymphom 2
BSA	Bovins Serum Albumin
CDK	cyclin-abhängige Kinase
CDK-Inhibitor	cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor
cDNA	complementary DNA
DMNQ	2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal Growth Factor
ESCC	Ösophaguskarzinom
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GABA	gamma-Aminobuttersäure
h	Stunde
HAT	Histon-Acetyl-Transferase
HCL	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitoren
HNSCC	Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs
HPV	humane Papillomviren
HSP	Hitzeschockprotein, Hitzeschockprotein
kDa	Kilodalton
LDL	Low Density Lipoprotein
LI	Labeling Index
mA	Miliampere
MDR	Multiple Drug Resistance
MDR1	Multidrug-Resistance-Protein 1
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
min	Minuten

ml.....	Mililiter
mM .....	Milimol
mRNA.....	messenger-RNA
MTT .....	Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid
ng .....	Nanogramm
nm .....	Nanometer
OPSCC.....	oropharyngeales Plattenepithelkarzinom
OSCC .....	orales Plattenepithelkarzinom
PBS .....	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR.....	Polymerasekettenreaktion
PD-L1 .....	programmed cell death ligand 1
PON2.....	Paraoxonase-2
PTM.....	posttranslationale Proteinmodifikation
PTP .....	Permeabilitätsübergangspore
Rb.....	Retinoblastom-Protein
RNA.....	Ribonukleinsäure
ROS.....	reaktive Sauerstoffspezies
s.....	sense
SDS .....	Natriumdodecylsulfat
sek.....	Sekunde
SOD.....	Superoxid-Dismutase
U/min.....	Umdrehungen pro Minute
UPR.....	Unfolded Protein Response
VPA .....	Valproinsäure
µl .....	Mikroliter

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: hallmarks of cancer .....	5
Abbildung 2: Stufenschema der Karzinogenese .....	6
Abbildung 3: Klinische Erscheinungsformen des Mundhöhlenkarzinoms.....	7
Abbildung 4: Entstehung, Regulation und Effekte von zellulären ROS.....	10
Abbildung 5: Entstehung von Arzneimittelresistenzen bei Krebszellen .....	11
Abbildung 6: Funktionen von HDACs und HDACi.....	15
Abbildung 7: Bestimmung der spezifischen VPA-Konzentration.....	30
Abbildung 8: Versuchsaufbau mit spezifischer VPA-Konzentration .....	31
Abbildung 9: Ablauf der PCR .....	36
Abbildung 10: 96-well Platte.....	37
Abbildung 11: Western Blot der basalen PON2 Proteinexpression .....	48
Abbildung 12: Basale PON2 Proteinexpression.....	49
Abbildung 13: Ermittlung der Arbeitskonzentration von VPA für die Zelllinien CAL-27, SCC-9 und SCC-25.....	51
Abbildung 14: mRNA-Expression nach Inkubation mit VPA .....	53
Abbildung 15: Western Blot der PON2 Proteinexpression nach Inkubation mit VPA	54
Abbildung 16: PON2 Proteinexpression nach Inkubation mit VPA .....	55
Abbildung 17: Western Blot der GRP78 Proteinexpression nach Inkubation mit VPA .....	56
Abbildung 18: GRP78 Proteinexpression nach Inkubation mit VPA .....	57
Abbildung 19: Auswirkung von VPA auf die Zellviabilität .....	59
Abbildung 20: Induktion von ROS durch VPA.....	61

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellkultur.....	23
Tabelle 2: Molekularbiologische Reagenzien.....	24
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien .....	25
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien .....	26
Tabelle 5: Laborgeräte .....	27
Tabelle 6: Zelllinien .....	28
Tabelle 7: Antikörper .....	28
Tabelle 8: Konzentrationen und Volumina der VPA-Lösung.....	30
Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die reverse Transkription	35
Tabelle 10: Zusammensetzung Mastermix pro well.....	36
Tabelle 11: Primersequenzen .....	37
Tabelle 12: Stammlösung für MTT-Test.....	38
Tabelle 13: Lysepuffer.....	38
Tabelle 14: Ansatz für die Proteinextraktion .....	39
Tabelle 15: 5x Laufpuffer .....	41
Tabelle 16: 1x Laufpuffer .....	41
Tabelle 17: Aufbau der semi-dry-unit .....	42
Tabelle 18: Anodenpuffer 1 .....	43
Tabelle 19: Anodenpuffer 2.....	43
Tabelle 20: Kathodenpuffer.....	44
Tabelle 21: 10x TBS.....	45
Tabelle 22: 25 mM Glycin .....	46
Tabelle 23: 10% SDS.....	46
Tabelle 24: Blocking Solution.....	46

# 1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Das orale Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (OSCC) stellt eine der häufigsten malignen Erkrankungen weltweit dar (6). Trotz kombinierter Therapieansätze aus Chirurgie, Chemo- und Strahlentherapie liegt die 5-Jahres Überlebensrate für Männer bei nur 52 % (7). Grund für diese schlechte Quote ist unter anderem die Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegenüber den adjuvanten Therapiemaßnahmen. Dies haben Hannahn und Weinberg schon vor 20 Jahren in ihrer Publikation „hallmarks of cancer“ beschrieben (4). Die Gründe für eine Resistenzentwicklung sind vielfältig. Dazu gehören unter anderem die Inaktivierung von Medikamenten, die Veränderung der Zielstruktur, eine Verstärkung des Effluxes und Inhibierung der Apoptose (1). Die Umgehung der Apoptose spielt dabei eine entscheidende Rolle. Adjuvante Therapien beruhen in aller Regel auf der Induktion von oxidativem Stress durch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (8). Zu diesen ROS gehören zum Beispiel das Hydroxyl-Radikal  $\text{OH}\bullet$  und das Hyperoxid-Anion  $\text{O}_2\bullet^-$ . Durch diese Radikale kommt es sowohl zu Schäden innerhalb der Zelle als auch zur Schädigung der DNA. Dies führt zur Induktion der Apoptose (3).

Das antioxidative Enzym Paraoxonase-2 (PON2) kommt ubiquitär im Körper vor und schützt so physiologischerweise die Zellen vor oxidativem Stress. Dies ist wichtig, da durch ROS diverse Erkrankungen wie zum Beispiel Atherosklerose verursacht werden (9). Außerdem spielen ROS bei der Entstehung von Neoplasien eine entscheidende Rolle. Die Radikale führen zu irreversiblen DNA-Schäden, was eine maligne Entartung begünstigt (3). In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass in Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms PON2 verstärkt exprimiert wird (10). Zum einen fängt PON2 so ROS in Tumorzellen ab, die durch den entgleisten Stoffwechsel entstehen. Zum anderen scheint es ein Weg zu sein, über den sie die therapieinduzierte Apoptose durch ROS umgehen können. OSCC-Zellen, bei denen PON2 in vitro ausgeschaltet wurde, reagierten mit einer erhöhten Sensitivität auf die Bestrahlung und es kam zu verstärkter Apoptose (10). Es stellt sich daher die Frage, ob und wie man in Zellen des OSCC eine Downregulation von PON2 induzieren kann.

Die Therapie des OSCC kann mit Einschränkungen der Lebensqualität verbunden sein (11). Auf der Suche nach einem geeigneten Medikament steht daher neben der Wirkung auch das Nebenwirkungsprofil im Vordergrund. Valproinsäure (VPA) wird seit Jahren sehr erfolgreich in der Dauermedikation von Epilepsie eingesetzt (12). VPA zeichnet sich durch eine gute Verträglichkeit und niedrige Kosten aus. Letzteres spielt aus ökonomischen Gesichtspunkten in der Onkologie eine wichtige Rolle, da die Krebstherapie eine sehr kostenintensive Behandlung ist. Es ist bereits bekannt, dass VPA neben seiner antikonvulsiven Wirkung in Tumorzellen einen Zellzyklusarrest induzieren kann und somit das Tumorwachstum hemmt (13). Dies beruht auch auf der Induktion von ROS durch VPA. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine

Kombination aus Cisplatin und VPA die apoptotische Wirkung in der adjuvanten Therapie von Tumorzellen im Kopf- und Halsbereich deutlich verstärkt (14). Dies war sowohl in vitro als auch in vivo der Fall. Neben dieser bekannten Wirkung auf den Zellzyklus, scheint VPA aber noch einen weiteren Angriffspunkt zu haben. Tseng et al konnten zeigen, dass es in Zellen des multiformen Glioblastoms, einer Neoplasie der Astrozyten, zu einer Downregulation von PON2, sowie einer gesteigerten ROS Produktion nach Inkubation mit VPA kommt (15). Dies hatte ein verringertes Zellwachstum und eine gesteigerte Apoptose zur Folge. PON2 scheint daher ein vielversprechender Kandidat als Angriffspunkt für die adjuvante Therapie mit VPA zu sein. Die vorliegende Arbeit soll untersuchen, inwiefern VPA in Zelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms eine Auswirkung auf die Expression von PON2 hat und ob es ebenfalls zu einer Downregulation kommt. Die Ergebnisse könnten in Zukunft eine entscheidende Rolle bei der Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms spielen, um Resistenzmechanismen der Tumorzellen auszuhebeln.

Neben PON2 soll in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss von VPA auf weitere zelluläre Proteine untersucht werden, um die zugrundeliegenden Mechanismen und Zusammenhänge mit PON2 besser zu verstehen. p21 ist ein Cyclin abhängiger Kinase-Inhibitor (CDK-Inhibitor), dessen Aktivierung zum Arrest des Zellzyklus und somit zu einer Hemmung des Zellwachstums führt (16). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung von Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle mit VPA zu einem Anstieg der p21 Expression führt und das Tumorwachstum inhibiert (17). Ein weiterer CDK-Inhibitor ist p27. Er hat eine ähnliche Funktion wie p21 und seine Expression führt ebenfalls zu einem Zellzyklus-Arrest und somit zu einem Stopp des Zellwachstums (18). Es ist bereits bekannt, dass eine fehlende Expression von p27 in vivo zu einem verstärkten Tumorwachstum führt (19). Die vorliegende Arbeit soll die Wirkung von VPA auf p21 bestätigen und einen möglichen Einfluss auf p27 erforschen. Die therapeutische Hochregulation der beiden CDK-Inhibitoren scheint ein vielversprechender Therapieansatz zu sein. Caveolin-1 (CAV1) ist das wichtigste Strukturprotein der Caveolae. Dies sind Einstülpungen in der Plasmamembran der Zelle und dienen der Mechanotransduktion (20). Dabei werden physikalische Signale in intrazelluläre molekulare Prozesse umgewandelt (21). CAV1 kommt ubiquitär in allen Zellen vor und ist für die physiologische Funktion unabdingbar. Bis dato ist seine Rolle in der Tumorgenese nicht vollständig verstanden. So konnten sowohl Eigenschaften eines Tumorsuppressors als auch eines Tumorpromoters nachgewiesen werden (22). Die vorliegende Arbeit soll den Einfluss von VPA auf CAV1 genauer untersuchen und helfen, die Rolle von CAV1 in der Tumorgenese besser zu verstehen. Des Weiteren soll die Rolle des Autophagiemarkers LC3B untersucht werden. Autophagie bezeichnet einen Prozess innerhalb der Zelle, bei dem fehlerhafte oder mutierte Proteine und beschädigte oder zu alte Zellorganellen abgebaut und verwertet werden (23). Somit sind Autophagie und LC3B wichtige Bestandteile der physiologischen zellulären Funktionen und

schützen unter anderem die Zelle vor maligner Entartung (24). In Tumorzellen hingegen ist eine gesteigerte Autophagie mit einem verstärkten Tumorprogress vergesellschaftet. So korrelieren hohe Werte LC3B beim oralen Plattenepithelkarzinom mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechterer Prognose (25). LC3B scheint daher ein sinnvolles therapeutisches Ziel der adjuvanten Tumorthherapie. Diese Arbeit soll den Einfluss von VPA auf die Expression von LC3B untersuchen, um neue therapeutische Ansätze für das orale Plattenepithelkarzinom zu erforschen. Das glucoseregulierte Protein 78 (GRP78) gehört zur Familie der Hitzeschockproteine (HSP) und fungiert im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) als Chaperon. Es sorgt für eine korrekte Faltung und Zusammensetzung der Proteine (26). Es ist somit auch an der unfolded protein response (UPR) beteiligt. Kommt es durch vermehrte fehlgefaltete Proteine zu ER-Stress, wird die Expression des antiapoptotisch wirkenden GRP78 verstärkt und somit die Apoptose der Zelle verhindert (27). Tumorzellen nutzen diese antiapoptischen Eigenschaften durch vermehrte Expression von GRP78, um einer therapieinduzierten Apoptose zu entgehen (28). Der Zusammenhang zwischen GRP78 und der UPR ist insofern bemerkenswert, da auch PON2 beim ER-stress über den UPR vermehrt exprimiert wird (29). Der Zusammenhang zwischen PON2, GRP78 und der UPR im Zuge einer Behandlung mit VPA, soll in dieser Arbeit weiter untersucht werden. Ein besseres Verständnis der Zusammenhänge könnte entscheidende Vorteile in der Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms erbringen.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Das orale Plattenepithelkarzinom**

#### **2.1.1 Epidemiologie des oralen Plattenepithelkarzinoms**

Jährlich erkranken 18,1 Millionen Menschen an Krebs (30). Neben Erkrankungen des Herzens gehört Krebs zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen (31). Von jährlich 502.655 neuen Krebserkrankungen in Deutschland betreffen ungefähr 15.000 die Mundhöhle und den Rachen (7). Davon sind 84 % Plattenepithelkarzinome. Das orale Plattenepithelkarzinom (OSCC) der Mundhöhle steht weltweit an sechster Stelle der häufigsten Krebserkrankungen (6). Männer sind im Verhältnis 2:1 bis 4:1 deutlich häufiger betroffen als Frauen (32). Die Inzidenzraten unterscheiden sich global gesehen. Zwei Drittel aller jährlichen Neuerkrankungen treten in Entwicklungsländern auf (6). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt laut Robert-Koch-Institut für Männer bei 52 % und für Frauen bei 62 % (7).

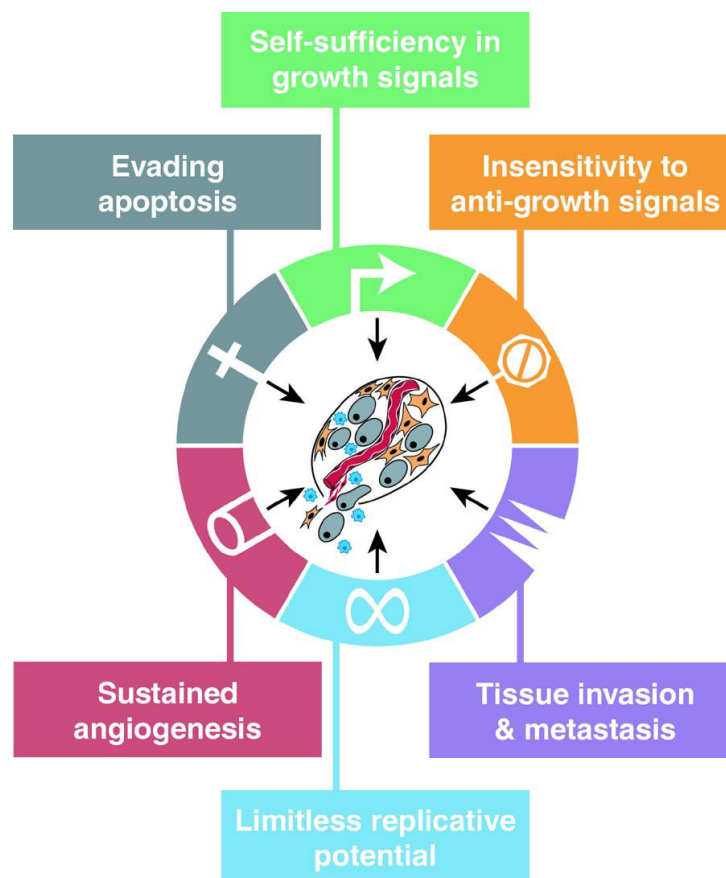
#### **2.1.2 Ätiologie des oralen Plattenepithelkarzinoms**

Als gesicherte Hauptrisikofaktoren gelten Tabakrauchen und Alkoholgenuss (33-35). Gemeinsam haben sie synergistische Effekte auf die Pathogenese (35, 36). Dies liegt zum einen an der alkoholbedingten erhöhten Permeabilität der Mundschleimhaut für die im Tabakrauch enthaltenen Substanzen (37). Zum anderen verursacht Alkohol einen verminderten Speichelfluss und vermindert den Abbau karzinogener Substanzen in der Leber, was zu einer erhöhten Anfälligkeit für Neoplasien führt (37). Das Risiko einer malignen Entartung des Epithels steigt mit Menge und Dauer des Nikotinabusus an. Bei 40 pack years ist das relative Risiko gegenüber einem Nichtraucher um das Siebenfache erhöht. Für die Karzinogenität sind vor allem tabak-spezifische Nitrosamine wie N-Nitrosonornikotin oder aromatische Kohlenwasserstoffe wie 3,4-Benzopyren verantwortlich (38). Auch Virusinfektionen können Risikofaktoren für die Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms sein. So birgt die Infektion mit humanen Papillomviren (HPV) ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines oropharyngealen Plattenepithelkarzinoms (OPSCC) (39-41). Der häufigste Typ ist HPV 16. Er konnte in über 90 % aller HPV-Infektionen nachgewiesen werden. Studien ergaben, dass 12 % aller Patienten, die an einem OPSCC erkrankt waren, positiv auf HPV 16 getestet wurden (42). Ein weiterer wichtiger Einfluss für die Entstehung des OSCC ist die Mundhygiene. So erkrankten Patienten mit schlechter Mundhygiene signifikant häufiger am OSCC (43). Regionale Traditionen und Gewohnheiten stellen in manchen Regionen der Erde Risikofaktoren dar, die in Mitteleuropa nicht bekannt

sind. So führt der im asiatischen und pazifischen Raum verbreitete Konsum der Betelnuss, neben den genannten Risikofaktoren, vermehrt zur Entstehung von OSCC (44).

### 2.1.3 Karzinogenese

Hanahan und Weinberg beschrieben vor rund 20 Jahren in ihrer Publikation „hallmarks of cancer“ die Eigenschaften maligner Tumorzellen (4). Dazu gehören nachhaltige Proliferation, die Umgehung der Wachstumsinhibition, Umgehung der Apoptose, unendliches Replikationsvermögen, die Induktion der Angiogenese und die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung (4). Zehn Jahre später ergänzten sie diese um zwei weitere Merkmale: abnorme Stoffwechselwege und Umgehung des Immunsystems (45).

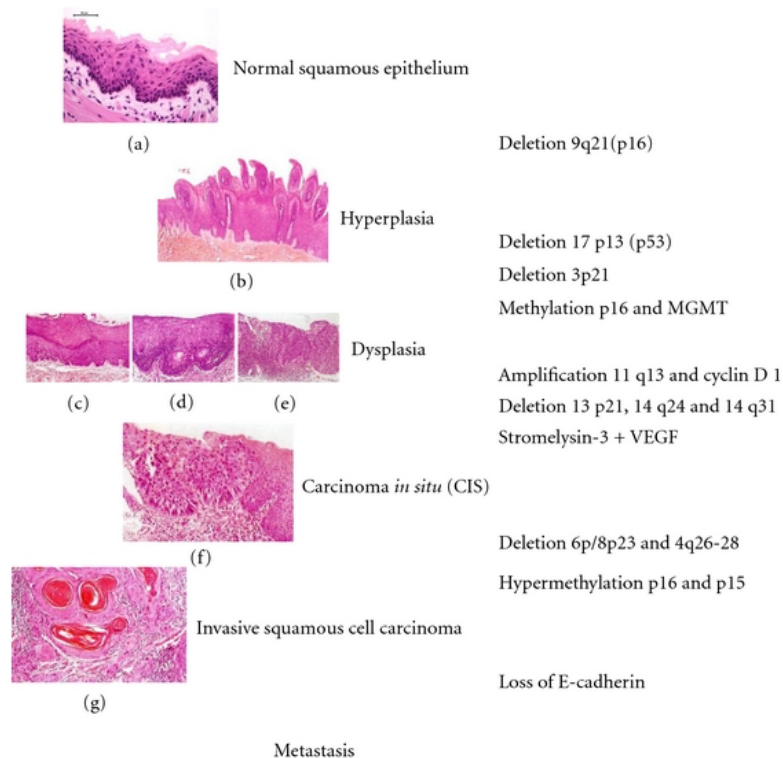


**Abbildung 1: hallmarks of cancer**

Zu den Eigenschaften maligne entarteter Zellen gehören nachhaltige Proliferation, die Umgehung der Wachstumsinhibition, die Umgehung der Apoptose, ein unendliches Replikationsvermögen, die Induktion der Angiogenese und die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung (4). Abbildung entnommen aus „The Hallmarks of Cancer, Cell Press, 2000.

Aufgrund der oben genannten Faktoren kommt es zu Beginn der Karzinogenese zu genetischen Veränderungen einer oder mehrerer Zellen. Zu diesem frühen Zeitpunkt ist die Morpho-

logie noch nicht verändert. Die stufenweise klinische Veränderung, über die einzelnen Dysplasiestadien bis zum Carcinoma in situ, ist mit der Akkumulation der genetischen Veränderung vergesellschaftet (46, 47). Dabei ist die Reihenfolge wie folgt: gesundes Epithel, Hyperplasie, Dysplasie, Carcinoma in situ, invasives Plattenepithelkarzinom und Metastasierung (2). Dieser mehrstufige Prozess kann sich über einen Zeitraum von 20 Jahren erstrecken (46). Es gibt verschiedene prä-maligne klinische Erscheinungen des OSCC. Dazu gehören Leukoplakie, Erythroplakie, Nikotinstomatitis, Lichen planus und die submuköse Fibrose (48). Diverse Studien zum Risiko einer malignen Transformation solcher Präkanzerosen wurden durchgeführt. Silverman et al. zeigten bei 17,5 % der Leukoplakien eine Entartung (49). Im Gegensatz zur Leukoplakie sind Prävalenz und Inzidenz der Erythroplakie deutlich geringer. Allerdings neigt sie häufiger zu Entartung. So zeigten Shafer und Waldron bei 91 % der histologischen Untersuchungen von Erythroplakien dysplastische oder karzinomatöse Veränderungen (50).



**Abbildung 2: Stufenschema der Karzinogenese**

Gesundes Epithel entwickelt sich über Hyperplasie, Dysplasie und Carcinoma in situ zu einem invasiven Plattenepithelkarzinom (2). Abbildung entnommen aus „Understanding Carcinogenesis for Fighting Oral Cancer“, Journal of Oncology“, 2011.

## 2.1.4 Klinische Manifestation

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle weist kein einheitliches Erscheinungsbild auf. Es präsentiert sich häufig als ulzerierende Läsion mit derbem Randwall. Es kommen verschiedene Wachstumsmuster vor. Man unterscheidet zwischen exophytisch, proliferativ und papillomatös wachsenden Tumoren (33). Sowohl leuko- als auch erythroplakes Aussehen ist möglich. Die leukoplaken Bereiche entstehen dabei durch eine Keratinisierung des Epithels. Es können alle Bereiche der Mundhöhle betroffen sein, jedoch ist der Tumor in den meisten Fällen auf der Zunge oder dem Mundboden lokalisiert. Abbildung 3 zeigt zwei verschiedene klinische Erscheinungsformen des Mundhöhlenkarzinoms. Zum einen zeigt das linke Bild einen verruköses Karzinom im rechten Mundboden. Zum anderen ist im rechten Bild ein erythroplakes, initiales Plattenepithelkarzinom der Wangenschleimhaut rechts erkennbar. Entsteht der Tumor auf dem Alveolarfortsatz, ist ein Verlust der Prothesenpassung als Erstsymptom zu beobachten. Symptome eines fortgeschrittenen Stadiums sind Schmerzen, Schluckbeschwerden, Sensibilitätsstörungen oder pathologische Frakturen. Dies sind Anzeichen für ein infiltratives und destruierendes Wachstum. In vielen Fällen wird der Tumor erst im fortgeschrittenen Stadium detektiert, bei dem oftmals schon lokoregionäre Halslymphknotenmetastasen vorliegen. Weiterhin liegen bei bis zu 40 % der Patienten mit klinisch unauffälligem Halslymphknotenstatus bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sogenannte okkulte Metastasen der Halslymphknoten vor (51). Neben dem Vorhandensein von Halslymphknotenmetastasen wirkt sich auch die Tumorgroße negativ auf die Prognose aus, weswegen der Früherkennung des OSCC eine entscheidende Rolle zukommt.



**Abbildung 3: Klinische Erscheinungsformen des Mundhöhlenkarzinoms**

Es sind zwei unterschiedliche klinische Manifestationen des Mundhöhlenkarzinoms zu erkennen. Links: verruköses Karzinom im Bereich des rechten Mundbodens. Rechts: erythroplak anmutendes, beginnend invasives Plattenepithelkarzinom der rechten Wangenschleimhaut. Abbildung zur Verfügung gestellt durch die Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Mainz.

## 2.1.5 Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms

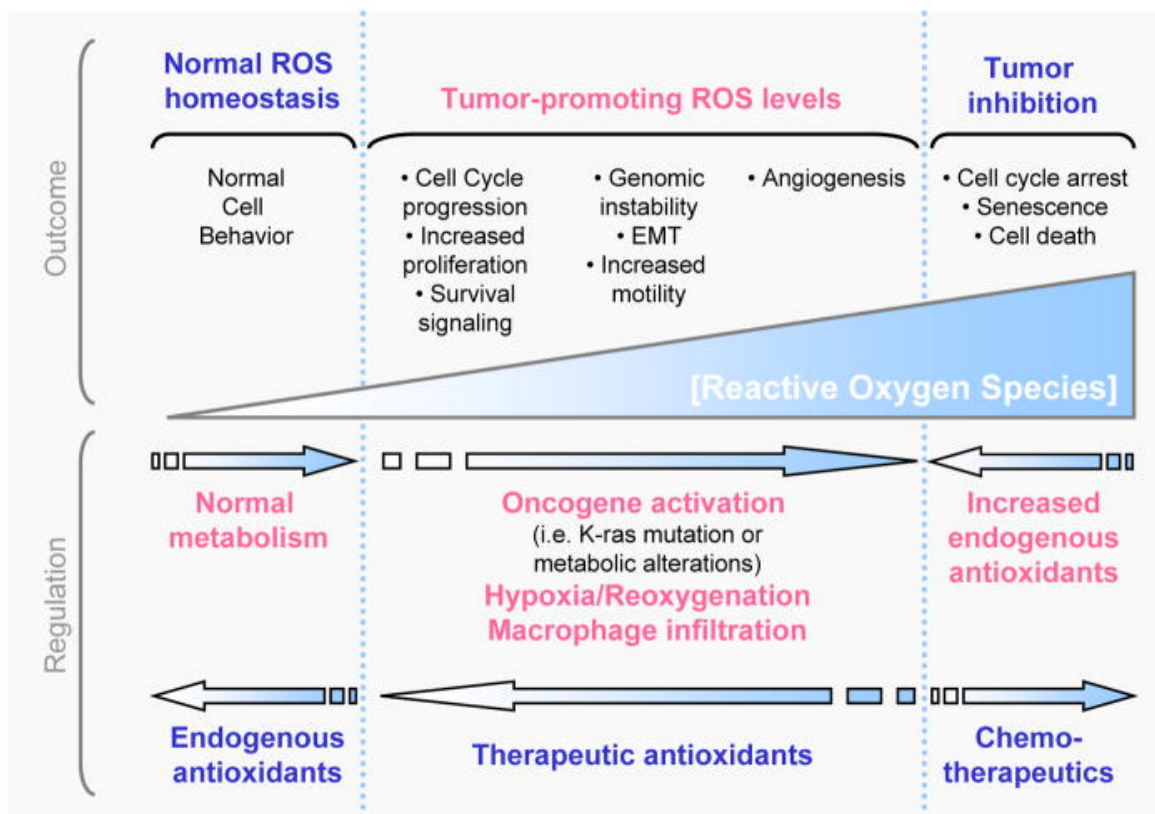
Man unterscheidet bei der Therapie des OSCC zwei grundlegende Prinzipien: Bei der kurativen Therapie wird eine vollständige Heilung angestrebt. Bei der palliativen Therapie ist nicht die Heilung der Erkrankung das Ziel, sondern die Behandlung der durch sie hervorgerufenen Beschwerden, um ein Maximum an Lebensqualität zu erreichen. Wird ein kurativer Therapieansatz verfolgt, so stehen verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung. Die alleinige chirurgische Therapie, die alleinige Strahlentherapie, eine Strahlentherapie in Kombination mit einer Chemotherapie oder die Kombination von chirurgischer Therapie, Strahlentherapie und Chemotherapie (51). Die Auswahl des Therapiekonzeptes wird vornehmlich von Faktoren wie Tumorausdehnung, Lymphknotenbefall, Alter und Allgemeinzustand abhängig gemacht. Die Karzinome im Frühstadium werden meist chirurgisch behandelt, wohingegen fortgeschrittene Stadien unterstützend oder definitiv mittels Strahlentherapie und/oder Chemotherapie therapiert werden. Allerdings gibt es noch keine prospektiv randomisierte kontrollierte Multicenterstudie, die eine Aussage zur Überlegenheit einer Therapieform zulässt und zwar weder für die Stadien I und II noch für die fortgeschrittenen Mundhöhlenkarzinome im Stadium III und IV (51). Das grundsätzliche Ziel, bei kurativer Intention, unabhängig von der Therapieform, ist die dauerhafte Tumorfreiheit. Diese ist in einem fortgeschrittenen Stadium häufig nur durch radikale, nicht organerhaltende Resektionen zu erreichen. Dies führt unweigerlich zu einem Verlust an Lebensqualität (11). Aber auch die Strahlentherapie führt aufgrund der Nebenwirkungen wie Dysphagie, Xerostomie oder Mukositis zu einem Verlust von Lebensqualität (52, 53). Ein weiterer Nachteil ist die niedrige Erfolgsrate bei alleiniger Bestrahlung. Hier kommt es nur in 20 % der Fälle zu einer Komplettremission des Tumors. Daher wird sie bei kurativer Intention meist in Kombination mit chirurgischer Resektion und/oder Chemotherapie eingesetzt. Als Chemotherapeutika, für adjuvante oder palliative Zwecke, kommen etablierte Medikamente wie Cisplatin, 5-Fluoruracil oder Docetaxel zum Einsatz (54, 55). Die Prognose verbessert sich durch die Chemotherapie, da sie auch okkulte Metastasen und Tumorresiduen erfasst. Laut einer Metaanalyse kommt es bei Einsatz von platinhaltigen Pharmaka zu besserem Therapieansprechen (56). Eine weitere Therapieoption ist die Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab. Studien zeigten ein besseres Gesamtüberleben bei einer Kombination dieses EGFR-Inhibitors mit Bestrahlung oder Chemotherapie (57). Des Weiteren können die PD-1-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab in der palliativen Situation zur Immuntherapie des OSCC eingesetzt werden (51). Pembrolizumab kann bei PD-L1 (programmed cell death ligand 1)-exprimierenden Tumor- und Immunzellen als First-Line-Monotherapie oder in Kombination mit Platin und 5-Fluoruracil eingesetzt werden (51). Trotz interdisziplinärer Behandlung und der Weiterentwicklung, bzw. Neuentwicklung von Therapiekonzepten, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate geschlechterabhängig zwischen 50 % und 60 % (7). Das Ansprechen des

oralen Plattenepithelkarzinoms auf die adjuvanten Therapiemaßnahmen bleibt also schlecht vorhersagbar und ist häufig mit starken Nebenwirkungen vergesellschaftet.

### **2.1.6 Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies**

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind Radikale, also Ionen oder Moleküle, die ein einzelnes ungepaartes Elektron in ihrer äußeren Hülle besitzen (3). Sie sind daher sehr instabil und bestrebt, mit ihrer Umgebung zu reagieren, um eine höhere Stabilität zu erreichen. Wichtige Vertreter der ROS sind das Hydroxyl-Radikal  $\text{OH}\bullet$  und das Hyperoxid-Anion  $\text{O}_2\bullet^-$ . Aufgrund des Oxidationsprozesses kommt es zu Schäden im Organismus. Auf zellulärer Ebene sind davon vor allem Lipide, Low Density Lipoproteine (LDL), Proteine und Nukleinsäuren betroffen (58). Im Organismus entstehen ROS in den Mitochondrien, während diese Adenosintriphosphat (ATP) generieren (59). Dort reagieren die frei gewordenen Elektronen mit einem Sauerstoffmolekül und es entsteht ein Superoxid-Molekül. Unter physiologischen Bedingungen werden die entstandenen ROS neutralisiert. Die Neutralisation kann auf zwei Arten erfolgen. Entweder durch Enzyme, wie die Superoxid-Dismutasen (SOD), oder nicht-enzymatisch durch Antioxidantien, wie zum Beispiel Glutathion, Flavonoide und die Vitamine A, C und E (3). Hervorzuheben sind hier die SOD. Sie gehören zur Familie der Metalloenzyme und sind die ersten Enzyme, die bei der Abwehr von ROS aktiviert werden. Sie kommen ubiquitär in allen Aerobiern vor und katalysieren dort die Disproportionierung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid (60). ROS können auch pathologisch erhöht sein. Gründe für ihre vermehrte Entstehung sind ionisierende Strahlung oder toxische Chemikalien. Vor allem beim Rauchen von Zigaretten entsteht oxidativer Stress (61). Durch das Missverhältnis von ROS und Antioxidantien kommt es zu irreversiblen Zellschäden, welche die Pathogenese verschiedener Krankheiten fördern. Laut verschiedener Studien korrelieren hohe Level ROS unter anderem mit Diabetes Mellitus, Alzheimer, Parkinson, Arteriosklerose, Hypertonie, Asthma, Katarakt, rheumatoider Arthritis und diversen Krebsleiden (62). Gerade bei der Tumorentstehung spielen ROS eine entscheidende Rolle. Freie Radikale schädigen die DNA, da sie zu Basenmodifikationen, Deletionen, Strangbrüchen, Translokationen und Hyper-/Hypomethylierungen führen (63). Dies kann zu neoplastischen Veränderungen führen. Gerade das Gewebe der Mundhöhle ist dabei aufgrund seiner starken Exposition gegenüber Noxen für eine Entartung prädestiniert. Die beiden Hauptrisikofaktoren zur Entwicklung eines oralen Plattenepithelkarzinoms, Tabakrauch und Alkohol, verursachen große Mengen an ROS (61, 64). Hat sich erst eine Neoplasie gebildet, so unterstützen ROS das Tumorgeschehen. Diese tumorfördernden ROS-Konzentrationen können zu Zellzyklusprogression, verstärkter Proliferation und vermehrten Überlebenssignalen, epithelial-mesenchymaler Transition, erhöhter Motilität, genomischer Instabilität und erhöhter Angiogenese führen (3). Überschreitet die ROS-Konzentration einen gewissen Punkt,

so kommt es zur Inhibierung des Tumorwachstums. ROS induziert dann Zellzyklus-Arrest, Seneszenz und Zelltod (3). Adjuvante Therapieformen machen sich diesen Umstand zu nutze. Es wird angenommen, dass durch die Chemotherapie die bereits erhöhten ROS-Level einen Schwellenwert überschreiten, was dann den Zelltod zur Folge hat (8). So führt die Therapie mit Cisplatin zu hohen intrazellulären ROS-Leveln und induziert Apoptose (65). Auch die Strahlentherapie basiert auf einem ähnlichen Mechanismus. Während der Bestrahlung entstehen durch die Radiolyse des Wassers Radikale wie  $O_2^-$  oder  $OH^-$ . Wie oben beschrieben reagieren diese sehr leicht mit dem umgebenden Gewebe und wirken toxisch. Die ROS-Konzentration steigt direkt nach der Bestrahlung für mehrere Stunden an, was neben den direkt radiogen bedingten Doppelstrangbrüchen zu weiterer DNA-Schädigung führt (66).

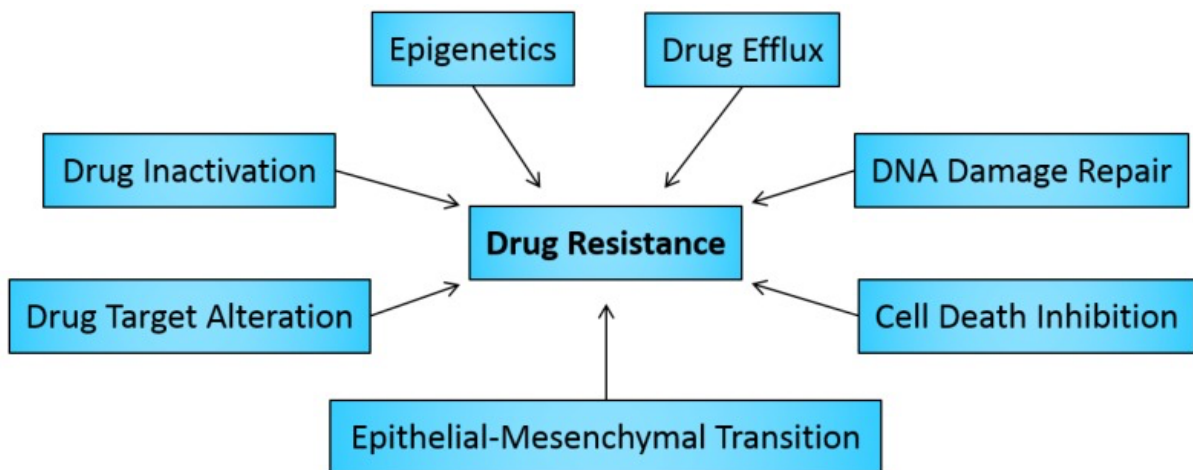


**Abbildung 4: Entstehung, Regulation und Effekte von zellulären ROS**

Zunächst kommt es durch eine gesteigerte ROS-Produktion (z.B. durch Tabakrauch) zu einer Entartung der gesunden Zellen und zur gesteigerten Tumorprogression. Werden nun durch Chemotherapeutika weitere Radikale erzeugt, kommt es zu einem Zellzyklusarrest und zum Absterben der Tumorzelle (3). Abbildung entnommen aus „Reactive oxygen species in cancer“, Free Radical Research, 2010.

## 2.1.7 Inhibierung des Zelltodes

Es stellt sich die Frage, wieso das Ansprechen auf diese Therapieformen weiterhin so variabel ist. Beim OSCC liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nach wie vor bei 50 % bis 60 % (7). Verantwortlich dafür sind Arzneimittelresistenzen. Sie wurden zuerst bei Bakterien beschrieben. Diese entwickeln bekanntermaßen Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika. Man fand heraus, dass ähnliche Mechanismen auch bei Krebszellen auftreten. Dazu gehören die Inaktivierung des Medikaments, eine Veränderung der Zielstruktur, die Verstärkung des Effluxes, eine Reparatur der DNA-Schäden, eine epitheliale-mesenchymale Transition und Metastasierung, die Epigenetik, die Heterogenität der Krebszellen und Inhibierung des Zelltodes (1).



**Abbildung 5: Entstehung von Arzneimittelresistenzen bei Krebszellen**

Es gibt verschiedene Gründe, warum Tumorzellen eine Resistenz gegen die adjuvanten Therapien entwickeln können. Dazu gehören unter anderem die Inaktivierung des Medikaments, eine Veränderung der Zielstruktur, ein verstärkter Efflux, die Reparatur der DNA-Schäden und die Inhibierung des Zelltodes (1). Abbildung entnommen aus „Drug Resistance in Cancer: An Overview“, Cancers, 2014.

Hier soll genauer auf die Inhibierung des Zelltodes eingegangen werden. Bei der Regulation des Zellzyklus spielen Apoptose und Autophagie eine zentrale Rolle. Bei der Apoptose gibt es zwei etablierte Wege: zum einen den intrinsischen Weg, der durch Mitochondrien vermittelt wird und an dem die Proteine der B-Zell-Lymphom 2 (BCL-2) -Familie, Caspase-9 und Akt beteiligt sind, zum anderen den extrinsischen Weg, an dem Rezeptoren auf der Zelloberfläche beteiligt sind (1). Caspase-9 ist auch an der ROS vermittelten Apoptose beteiligt. ROS beschädigt die mitochondriale Membran und mitochondriale Permeabilitätsübergangspore (PTP), wodurch die Elektronentransferkette gestört wird und die Freisetzung von Cytochrom-C induziert wird (67). Im Zytosol bildet Cytochrom-C mit dem apoptotischen Aktivierungsfaktor

1 (Apaf-1) und Procaspase-9 sogenannte „Apoptosome“, die zur Aktivierung von Caspase-9 führen, was zu Spaltung zellulärer Proteine und zum apoptotischen Zelltod führt (67). Mit Hilfe antiapoptotischer Proteine wie die der BCL-2- oder Paraoxonase-Familie können Zellen dies vermeiden. Wie oben beschrieben, ist die Umgehung der Apoptose ein charakteristisches Merkmal der Karzinogenese. Daher sind für die Tumorforschung die betreffenden Gene und Proteine von Bedeutung. Im Folgenden soll die Rolle der Paraoxonase-2 näher beleuchtet werden

## 2.2 Paraoxonase-2

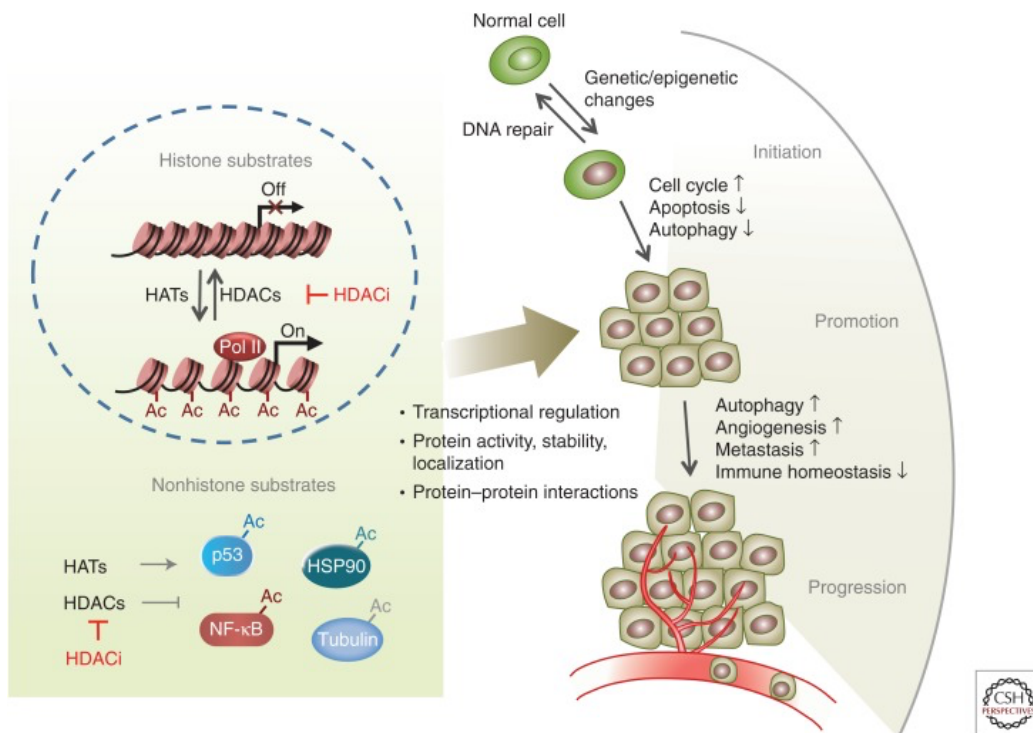
Das Enzym Paraoxonase-2 (PON2) gehört neben PON1 und PON3 zur Familie der Paraoxonasen. Die drei Gene sitzen beim Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 7q21-22 (68). Alle drei wirken anti-oxidativ, anti-inflammatorisch und anti-atherosklerotisch (9). PON2 ist intrazellulär lokalisiert und weist ein molekulares Gewicht von ungefähr 44 Kilodalton (kDa) auf (69). Die mRNA von PON2 wird nahezu ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert, die höchsten Werte sind jedoch in Leber, Lunge, Plazenta, Hoden und Herz messbar (70). Auch ist die mRNA im Endothel, der glatten Muskulatur und den Makrophagen innerhalb der arteriellen Gefäßwände zu finden (71). Intrazellulär befindet sich PON2 an der inneren Mitochondrienmembran (72), am endoplasmatischen Retikulum (29), der Plasmamembran (73) und der Kernhülle (29). Das humane PON2 zeichnet sich durch zwei grundlegende Eigenschaften aus: eine enzymatische Laktonase-Aktivität und eine anti-oxidative Aktivität (74). Zum einen kann es bakterielle Laktone inaktivieren und stellt somit eine natürliche Schutzfunktion gegen *Pseudomonas aeruginosa* dar (75, 76). Zum anderen weist PON2 ausgeprägte antioxidative Eigenschaften auf. Diese anti-oxidative Wirkung von PON2 spielt bei degenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle, da die Pathogenese solcher Krankheiten mit erhöhten ROS-Leveln korreliert (77). So wird PON2 eine gefäßprotektive Wirkung zugeschrieben, da sie die ROS-Level durch ihre antioxidativen Eigenschaften senkt. In den letzten Jahren ist das wissenschaftliche Interesse an PON2 gestiegen, da dieses Enzym auch in Tumorzellen exprimiert wird (78). Bei verschiedenen malignen Prozessen scheint eine erhöhte PON2 Konzentration mit einer schlechteren Prognose für den Patienten verbunden zu sein (79). Einige Arbeitsgruppen haben bereits an verschiedene Tumorzellen erforscht, welche Rolle PON2 dort spielt. Erhöhte Werte des Enzyms konnten in Zellen des Ovarialkarzinoms (80), des Bauchspeicheldrüsenkarzinoms (81), des Harnblasenkarzinoms (82), des oralen Plattenepithelkarzinoms (10), des Magenkarzinoms (83) und bei Karzinomen der Haut festgestellt werden. Bei infiltrativ wachsenden Basalzellkarzinomen ist PON2 ebenfalls signifikant erhöht. (84). Bei den Melanomen korrelierten die PON2 Werte positiv mit

Breslow-Tumordicke, Clark-Level und Lymphknotenmetastasen (84). Daher war es naheliegend, PON2 als möglichen Angriffspunkt neuer Therapieformen zu untersuchen. Allein ein Knockdown von PON2 führte aufgrund des starken Anstiegs von ROS zur Apoptose von verschiedenen Tumorzellen (85). Krüger et al. bestrahlten Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms in vitro und untersuchten die PON2 Werte. Eine vermehrte Expression von PON2 schützte die Zellen vor strahleninduzierter Apoptose, wohingegen ein Knockdown von PON2 zu einer höheren Apoptose Rate führte (10). Aber nicht nur gegen eine Bestrahlung scheint PON2 protektiv zu wirken. Bei der Behandlung von Zellen des Harnblasenkarzinoms mit den Chemotherapeutika Cisplatin und Gemcitabine hatte der Knockdown von PON2 eine erhöhte Menge ROS und ein geringeres Überleben zur Folge (82). Trotz Behandlung mit den antineoplastischen Therapeutika kam es nach Hochregulierung von PON2 zu stärkerer Zellproliferation als bei der Kontrollgruppe (82). Ein temporäres Ausschalten von PON2 führte bei Cisplatin behandelten A375 Melanomzellen zu einer signifikant verminderten Zellproliferation und geringeren Lebensfähigkeit (86). Weiterhin nahm die Sensitivität gegenüber Cisplatin nach Knockdown von PON2 deutlich zu. Diese Studien zeigen, dass in Tumorzellen die Überexpression von PON2 einen Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress und somit auch gegen adjuvante Therapieformen darstellt. Ein Therapieansprechen wird daher im Laufe der Behandlung immer unwahrscheinlicher, da die ROS-resistenten Tumorzellen einen Überlebensvorteil haben. Eine Inhibition von PON2 erscheint unter diesen Gesichtspunkten sinnvoll, da so das Therapieansprechen verbessert werden könnte. Die Unterbindung der Neutralisation von therapieinduziertem oxidativem Stress, könnte eine erfolgversprechende Unterstützung der bisherigen Therapien darstellen.

## 2.3 Histon-Deacetylase

Posttranslationale Proteinmodifikationen (PTM) von Proteinen finden nach der Translation statt. Diese Veränderungen beeinflussen die Funktion des Polypeptids. Es sind viele verschiedene PTMs bekannt. Zu den Mechanismen gehören DNA-Methylierung, Histonmodifikation und RNA-vermitteltes Silencing (87). Histone bilden zusammen mit dem DNA-Faden das sogenannte Nucleosom, den Grundbaustein der Chromosomen (88). Histonmodifikationen bestehen zumeist aus Methylierung, Acetylierung, ADP-Ribosylierung oder Phosphorylierung (88). All diese Modifikationen dienen dazu, das Ablesen der Erbinformation gezielt zu steuern, indem sie die histongebundene DNA mehr oder weniger zugänglich machen (88). Sowohl Histon-Acetyl-Transferasen (HAT), als auch Histon-Deacetylasen (HDAC) können Histone kovalent modifizieren. HATs können die  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten acetylieren. Dadurch verlieren diese ihre positive Ladung und können keine Ionenbindungen mehr ausbilden, was zu einer Auflockerung des Nucleosomenkerns und letztlich eine verbesserte Zugangsfähigkeit von regulatorischen DNA-Sequenzen zur Folge hat (88). Genau gegensätzlich wirken die HDACs. Sie deacetylieren die Lysinreste, die daraufhin wieder positiv geladen sind. Die nun schlechtere Zugangsfähigkeit führt zu verminderter DNA-Transkription und somit letzten Endes zu verminderter Genexpression. Humane HDACs werden nach Sequenz- und Domänenverwandtschaft zu ihren homologen Genen in Hefen, sogenannten Orthologen, in vier Gruppen eingeteilt (89). Klasse I enthält HDAC 1, 2, 3 und 8. Die Klasse II lässt sich nochmals unterteilen: IIa besteht aus HDAC 4, 5, 7 und 9. Klasse IIb enthält HDAC 6 und 10. Klasse III besteht aus sieben Sirtuinen. Zuletzt gibt es noch Klasse IV, die nur HDAC 11 enthält.

Verschiedene Autoren konnten im Rahmen von Studien zeigen, dass diverse HDACs in malignen Tumoren dereguliert sind. Patienten mit hoher Expression von HDACs zeigen meist eine fortgeschrittene Pathogenese und schlechteres Outcome (5). So waren bei vermehrter Expression von HDAC1 und HDAC3 die 5-Jahres Überlebensraten von Patienten mit Lungenkarzinomen signifikant schlechter (90, 91). Hohe Werte von HDAC2 wurden auch in Tumorgewebe des Pankreaskarzinoms gefunden (92). Verstärkte Expression der Klasse I HDACs 1, 2 und 3 war bei Proben des Prostatakarzinoms zu messen (93). In Zellen des OSCC konnte eine Überexpression von HDAC8 festgestellt werden. Die Deacetylierung von Histonen spielt eine entscheidende Rolle bei verschiedenen Schritten der Tumorgenese. Dazu gehören Zellzyklus, Apoptose, Reaktion auf DNA-Schäden, Metastasierung, Angiogenese und Autophagie (5). HDAC1 und HDAC2 können an die CDK-Inhibitoren p21, p27 und p57 binden und deren Expression hemmen (94, 95). So werden Proliferation und Zellwachstum kontrolliert. Ein Verlust der HDACs führt zum Zellzyklus Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase. Zusätzlich beeinträchtigt ein Knockdown von HDAC1 in Tumorzellen den Übergang von G<sub>2</sub>- zu M-Phase (96).



**Abbildung 6: Funktionen von HDACs und HDACi**

Die Histondeacetylasen (HDACs) sorgen über Deacetylierung der Histone für eine verminderte Transkription der DNA. Die Funktion der HDACs ist in Tumorzellen dereguliert, was zu einer verminderten Expression von Tumorsuppressoren wie z.B. p53 führt. Es kommt zu einer gesteigerten Autophagie, einer verminderten Apoptose und einer Entgleisung des Zellzyklus. Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi) können die Expression von Tumorsuppressoren wiederherstellen und sorgen für einen Zellzyklus-Arrest, sowie die Induktion von Apoptose (5). Abbildung entnommen aus „HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy“, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2016.

### 2.3.1 Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Vor dem Hintergrund der Relevanz der HDACs sind Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) in den vergangenen Jahren in den Mittelpunkt der Tumorforschung gerückt. Da die entgleiste Regulation des Zellzyklus einen zentralen Punkt der Tumorgenese darstellt (4), kann dessen Hemmung durch HDACi zu verlangsamtem Tumorwachstum führen. Man unterscheidet vier Hauptgruppen von HDACi: Hydroxamsäuren, Benzamide, kurzkettige Fettsäuren und cyclische Peptide. Sie alle weisen den gleichen Wirkmechanismus auf: Die Hemmung der Deacetylase der HDACs. Dies erreichen sie durch kompetitive Hemmung am aktiven Zentrum (97). Die Aktivität der Deacetylase ist  $Zn^{2+}$ -abhängig. HDACi binden an das  $Zn^{2+}$ -Ion am aktiven Zentrum und unterbinden somit die enzymatische Funktion. HDACi können den abnormen Acetylierungen, die bei Krebszellen vorzufinden sind, entgegenwirken und die Expression von

Tumorsuppressoren reaktivieren. Dies führt zur Induktion von Zellzyklus-Arrest, Apoptose, Differenzierung und Inhibierung von Angiogenese und Metastasierung (5). Nach Behandlung von Tumorzellen mit HDACi kam es zur verstärkten Expression von p21 und einer Unterdrückung bestimmter Wachstumsfaktoren, die für die Angiogenese von Bedeutung sind (98).

## 2.4 Valproinsäure

Valproinsäure (VPA) ist eine verzweigte, kurzkettige Fettsäure, die ein Derivat der natürlich vorkommenden Valeriansäure ist (12). Primär wird sie zur Medikation von Krampfanfällen genutzt, aber auch gegen Migräne und bipolare Störungen eingesetzt (12). VPA blockiert im ZNS erregende Ionenkanäle, wie die spannungsabhängigen Natrium- und Calcium-Kanäle. Zusätzlich wird die Synthese von Gamma-Aminobuttersäure (GABA) aktiviert und ihr Abbau gehemmt. VPA verstärkt somit die inhibitorische Wirkung von GABA auf das ZNS. Daraus erklärt sich auch die antikonvulsive Wirkung von VPA. Außerdem hemmt VPA die Histon-Deacetylase. Sie kann also als Histon-Deacetylase-Inhibitor eingesetzt werden (99, 100). VPA bietet mehrere Vorteile gegenüber anderen HDACi, auch wenn ihre Potenz im Vergleich niedriger ist: Die Hemmung der HDACs wird in vivo schon bei niedriger VPA-Konzentration erreicht und hat ein sehr günstiges Nebenwirkungsprofil. Allerdings kann VPA teratogen wirken, was vor allem auf die HDAC-Inhibierung zurückzuführen ist (100). Daher ist VPA während der Gravidität kontraindiziert. VPA hat eine sehr lange Halbwertszeit und ist leicht applizierbar (101). In Studien inhibierte VPA erfolgreich das Wachstum von Zellen des Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) (17, 102). Es kam zu einer dosisabhängigen Histon H3 Acetylierung und p21 Expression, sowie zu einer dosisabhängigen Zytostase (13). VPA führt zu einer Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 (103). Die Zugabe von gut verträglichen Dosen HDACi, wie zum Beispiel VPA, zu platinbasierten Chemotherapeutika führte zu einer erhöhten Chemosensitivität verschiedener Krebsarten (104, 105). Eine in vivo Studie zeigte, dass VPA in Kombination mit Cisplatin und Cetuximab synergistisch antiproliferativ und proapoptotisch auf Zellen des Kopf-Hals-Karzinoms wirkt, während gesunde menschliche Fibroblasten von dieser Wirkung nicht betroffen waren (14). Außerdem wird durch VPA-Zugabe die Radiosensitivität von Zellen des Plattenepithelkarzinoms gegenüber einer Bestrahlung erhöht (103). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass die Behandlung von menschlichen Zelllinien des Glioblastoma multiforme zu einem Zellzyklus-Arrest in der G2-Phase der Zellteilung und zu einer vermehrten p21 Expression führte (15). Die Menge an ROS war erhöht und die PON2 Expression erniedrigt im Vergleich zu unbehandelten Zellen (15). Dies legt die Vermutung nahe, dass VPA den PON2-vermittelten Schutzmechanismus der Tumorzellen vor oxidativem Stress auszuhebeln vermag, wobei der genaue Mechanismus ungeklärt bleibt.

## 2.5 p21

Das Gen CDKN1A exprimiert das Protein p21, einen Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitor (CDK-Inhibitor). Dieser hemmt universell alle Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) (16). Das namensgebende Gen ist auf Chromosom 6p21.2 lokalisiert. Das Polypeptid besteht aus 164 Aminosäuren und weist ein molekulares Gewicht von ungefähr 18 kDa auf (106). p21 gehört zur Familie der CDK-Inhibitoren, die in zwei Klassen aufgeteilt werden können: CIP/KIP und INK4. p21 ist wie p27 und p57 Teil der Kinase-Inhibitor-Proteine. Bei Säugetieren wird der Zellzyklus durch CDKs und ihre regulatorischen Cyclin-Untereinheiten reguliert. Zellzyklus-Progression wird durch eine Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) herbeigeführt und p21 unterbricht diese Interaktion, was zu einer Hemmung des Zellzyklus führt. Die Expression von p21 wird durch den Tumorsuppressor p53 moduliert. p53 wird auch als Wächter des Genoms bezeichnet (107). Der Transkriptionsfaktor kommt unter physiologischen Bedingungen nur in geringer Konzentration in der Zelle vor, spielt aber eine Schlüsselrolle bei der Reaktion der Zelle auf genomischen Stress. Zu den Stressfaktoren zählen eine direkte DNA-Schädigung durch UV- oder  $\gamma$ -Strahlung bzw. genotoxische Substanzen (z.B. Chemotherapeutika), aber auch indirekte Mechanismen wie die pathologische Aktivierung des Zellzyklus durch aberrante Expression von Onkogenen (108). Nach DNA-Schädigung kann dieser Transkriptionsfaktor in tetramerer Form direkt an den Promoter des Gens von CDK-Inhibitor p21 binden: Dadurch wird die Expression von p21 hochreguliert (88). Expression von p21 führt zu Heraufregulation verschiedener Gene, die mit Zellseneszenz oder altersbedingten Krankheiten wie Arteriosklerose, Alzheimer, Amyloidose und Arthritis assoziiert sind (109). Neben der Hemmung der Zellproliferation inhibiert p21 auch die Apoptose (110). Ob eine Reparatur der DNA erfolgt oder die Apoptose eingeleitet wird, hängt dabei vom Schweregrad des Schadens ab. Aufgrund des Einflusses auf die Regulierung des Zellzyklus, ist p21 für die Tumorforschung von Interesse. Der inhibierende Effekt von p21 auf Tumorzellen, wird anhand verschiedener Studien deutlich. So zeigten Patienten mit p21-positiven Lungenzellkarzinomen ein verbessertes Gesamtüberleben gegenüber Patienten mit p21-negativen Karzinomen (111). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei Plattenepithelkarzinomzellen. Bei Ösophaguskarzinomen (ESCC) war die 5-Jahres Überlebensrate für Patienten mit einem p21 Labeling Index (LI) über 30 % deutlich höher als für Patienten mit einem LI von unter 30 % (112). Eine Transfektion von p21-cDNA in SKOV3 und OVCAR3 Zellen des Ovarialkarzinoms hatte ein reduziertes Tumorstadium und verbessertes Ansprechen auf Cisplatin zur Folge (113). Außerdem war eine geringere Menge Cisplatin nötig, um die Tumorzellen zu töten. Man untersuchte die therapeutische Heraufregulation von p21 mittels des HDACi VPA bei Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms. Die Zelllinien reagierten auf VPA-Behandlung mit einer verminderter Zellproliferation, die mit einer Hochregulation von p21 assoziiert war (17).

## 2.6 p27

p27 wird vom Gen CDKN1B exprimiert und ist ein 27 kDa schweres Protein, das zur Familie der CDK-Inhibitoren gehört und dem Protein p21 sehr ähnlich ist (18). Es kommt sowohl im Nukleus und Cytoplasma (114), als auch in den Mitochondrien (115) vor. p27 ist ein universaler Inhibitor der CDKs und führt zu einem Zellzyklus-Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase (18). Die Level an p27 sind in ruhenden Zellen erhöht und nehmen nach mitotischer Stimulation ab (116). p27 moduliert also wie p21 den Zellzyklus und seine Eigenschaften machen es zu einem Tumorsuppressor. Studien zeigten, dass sich niedrige Level an p27 ungünstig auf TNM-Stadium und den Differenzierungsgrad auswirken (117, 118). Schon vor über 20 Jahren wurde die Bedeutung von p27 bei Frauen, die an Brustkrebs erkrankt waren, untersucht. Eine verminderte p27 Expression korrelierte mit einem reduzierten krankheitsfreien Überleben verglichen mit einer erhöhten p27 Expression (119). Weiterhin führte der knockout von p27 bei Mäusen zu einem verstärkten Wachstum von Tumoren der Mamma und der Speicheldrüsen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (19). Sowohl Mutationen als auch Polymorphismen des p27-codierenden Gens können die Tumorgenese beeinflussen. Keimbahnmutationen des Gens CDKN1B führten zur Entwicklung von Multiplen endokriner Neoplasien (MEN) bei Menschen und Ratten (120). MEN sind autosomal-dominant vererbte Tumorerkrankungen, die ein ungehemmtes Wachstum endokriner Drüsen bewirken. Sowohl beim Prostatakarzinom als auch beim Plattenepithelkarzinom des Kopf-/Halsbereichs (HNSCC) war ein Einzelnukleotidpolymorphismus in p27 mit schlechteren Prognosen bezüglich des Tumorstadiums und der Rezidivfreiheit verbunden (121, 122). Im Gegensatz dazu hatten Patienten mit hohen Werten von p27 eine bessere Prognose (123). p27 scheint auch als prognostischer Marker für das Ansprechen von Plattenepithelkarzinomen auf adjuvante Therapieformen geeignet zu sein. Die Expression von p27 wurde bei HNSCC nach Behandlung der Patienten mit Cisplatin oder 5-Fluoruracil immunhistochemisch untersucht. Eine verstärkte Expression von p27 im Tumorgewebe hatte positive Auswirkung auf das Therapieansprechen (124). Ein weiterer möglicher Therapieansatz ist die Behandlung mit HDACi, wie zum Beispiel Trichostatin A. Wie VPA hemmt es die Zellproliferation und induziert Apoptose. Trichostatin A hemmt den Zellzyklus in der G1 Phase bei Zelllinien des Plattenepithelkarzioms des Ösophagus, da es durch die vermehrte Expression von p27 zu einer Inaktivierung der CDKs kommt (125).

## 2.7 Caveolin-1

Caveolae sind 50-100 nm große, flaschenförmige Einstülpungen in der Plasmamembran (20). Es sind spezielle *Lipid Rafts*, die entscheidend für die zelluläre Mechanotransduktion sind. Dabei werden physikalische Signale in intrazelluläre molekulare Prozesse umgewandelt (21).

Die wichtigsten Strukturproteine sind dabei die Caveoline CAV1, CAV2 und CAV3. CAV1 wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. Die größten Mengen sind in Adipozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und verschiedenen Epithelien zu finden. CAV2 zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie CAV1. CAV3 hingegen ist ausschließlich in Muskelzellen nachgewiesen worden, vor allem in Herz- und Skelettmuskulatur (126). CAV1 ist in den Caveolae der Plasmamembran, dem Golgi-Apparat und dessen Transportvesikeln lokalisiert (127, 128). Caveolae und somit auch CAV1 erfüllen verschiedenste zelluläre Funktionen: Sie sind unter anderem am Membrantransport und der Endozytose, aber auch an der Regulation des Calcium- und Lipidstoffwechsels beteiligt. Auch für den Zellzyklus sind sie von Bedeutung. CAV1 verursacht eine Hemmung der Rezeptoren für den Epidermal Growth Factor (EGF), was zu vermindertem Zellwachstum führt. Defekte der Caveolae scheinen mit verschiedenen Erkrankungen vergesellschaftet zu sein. Bei Tierversuchen führte ein Knockdown von CAV1 zum Verlust der Caveolae, was eine Beeinträchtigung des Signalweges von Calcium und Stickstoffmonoxid im kardiovaskulären System zur Folge hatte (129). Veränderungen der endothel-abhängigen Kontraktion, der Relaxation und des Muskeltonus wurden dadurch ausgelöst. CAV1 verfügt über Eigenschaften eines Tumorpromoter (130) und eines Tumorsuppressors (131). Studien zeigen, dass in Zellen des Harnblasenkarzinoms (132) und des Lungenkarzinoms (133) CAV1 die Rolle eines Tumorpromoters besitzt. Andere Studien deuten auf eine tumorsuppressive Funktion hin: Versuche an Mäusen zeigten bei einer Unterbrechung der CAV1 Expression eine deutlich verstärkte Tumorgenese des Mammakarzinoms (133). In vitro Studien mit SW480 Zellen des kolorektalen Karzinoms deuten ebenfalls eine tumorsuppressive Wirkung von CAV1 hin (134). Shatz et al. vermuten, dass es im Frühstadium der Tumorgenese zu einer Unterdrückung des Tumorwachstums durch CAV1 kommt (22). Zu diesem Zeitpunkt sind nur wenige veränderte Zellen vorhanden, die vermehrt CAV1 exprimieren. Die wachstumshemmenden Eigenschaften überwiegen. In einem späteren Stadium, wenn sich die CAV1 exprimierenden Zellen durchgesetzt haben, sind die Werte deutlich erhöht und führen zu einem Überlebensvorteil durch die antiapoptotischen Eigenschaften (22). Auch bei Multipler Drug Resistance (MDR) in Tumorzellen scheint CAV1 eine Rolle zu spielen. Die CAV1 Expression korreliert positiv mit MDR bei Adenokarzinomzellen des Kolons und Adriamycin-Resistenz bei Adenokarzinomzellen der Mamma (135). Auch beim ESCC wird CAV1 vermehrt exprimiert und geht mit erhöhter MDR einher (136).

## **2.8 Autophagiemarker LC3B**

Autophagie stammt vom altgriechischen Wort *autophagos* „sich selbst verzehrend“. Autophagie bezeichnet einen Prozess innerhalb der Zelle, bei dem fehlerhafte oder mutierte Proteine und beschädigte oder zu alte Zellorganellen abgebaut und verwertet werden (23). So wird die

Homöostase innerhalb der Zelle erhalten. Die Abfallprodukte werden von Autophagosomen aufgenommen. Dabei handelt es sich um Vesikel mit einer Doppelmembran. Diese verschmelzen dann mit den Lysosomen. Es entstehen Autophagolysosomen, welche die sequestrierten Komponenten abbauen und wiederverwerten. Der Autophagie-Prozess wird über sogenannte *autophagy related genes* (ATG) gesteuert (137). Das Microtubule-Associated protein 1 Light Chain 3 beta (LC3B) wird vom Gen MAP1LC3B exprimiert und gehört zu den Proteinen der ATG8-Familie. Es kommen insgesamt drei verschiedenen Typen LC3 vor: A, B und C. Die Expression von LC3B ist allerdings der sicherste Marker dafür, dass Autophagosome gebildet werden (138), also ob Autophagie stattfindet oder nicht. Daher eignet es sich am ehesten für die Quantifizierung der Autophagie. Eine Dysregulation von Autophagozytose ist mit verschiedenen neurodegenerativen, kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes Typ II und Krebs vergesellschaftet (139), (140), (141), (142). Die Autophagie nimmt bei der Karzinogenese eine Sonderstellung ein. Einerseits fördert sie unter physiologischen Bedingungen die Zellerhaltung, aber sorgt andererseits auch für eine Tumorprogression in entarteten Zellen. Degenhardt et al erklärten dieses Phänomen folgendermaßen: Autophagie verhindert in Zellen, in denen die Apoptose nicht mehr funktioniert, eine Zellnekrose, die lokale Entzündung und Tumorstromung fördert (24). Außerdem kommt es in Zellen, in denen die Autophagie defekt ist, zur Ansammlung von „Zellmüll“. Dazu gehören zum Beispiel geschädigte Mitochondrien, ROS und Einschlusskörperchen. Dies führt zur Schädigung von DNA, der Aktivierung von Onkogenen und zu Tumorgenese (143). Autophagie wirkt also protektiv gegen diese schwerwiegenden Schäden. Allerdings machen sich die entarteten Zellen den Mechanismus der Autophagie zu nutze. Die erhöhte Autophagie bietet den Krebszellen eine alternative Energiequelle für Wachstum und eine höhere Überlebenschance innerhalb der Tumormikroumgebung, wo Hypoxie, Nährstoffmangel oder therapeutische Stressbedingungen herrschen (144). Anfänglich schützt Autophagie also vor Krebs, wohingegen entstandene Krebszellen sie zur eigenen Zytprotektion nutzen. So korreliert die Expression von LC3B beim Leberzellkarzinom positiv mit der Gefäßinvasion, vermehrten Lymphknotenmetastasen und einer verminderten 5-Jahres-Überlebensrate (145). Immunhistochemische Untersuchungen an Präparaten des oralen Plattenepithelkarzinoms zeigten deutlich erhöhte Werte LC3B im Vergleich zur gesunden oralen Mukosa (25). Wie beim Leberzellkarzinom war auch hier die hohe Expression von LC3B mit aggressiven klinisch-pathologischen Befunden und schlechter Prognose verbunden. Eine Hemmung der Autophagie scheint daher eine Möglichkeit zur Steigerung der Therapie-Effizienz. Es gibt derzeit verschiedene Studien, bei denen Inhibitoren der Autophagie als unterstützende Maßnahme zur Chemotherapie getestet werden (146).

## 2.9 GRP78

Das glucoseregulierte Protein 78 (GRP78) gehört zur Familie der Hitzeschockproteine (HSP), genauer gesagt zur HSP70 Familie. Als Chaperon ist es essenziell für die normale Funktion des endoplasmatischen Retikulums (ER). Es ist im Lumen des ER lokalisiert. GRP78 sorgt dort für eine korrekte Faltung und Zusammensetzung der Proteine (26). Außerdem verhindert es den Transport von defekten oder nicht korrekt gefalteten Proteinen. GRP78 ist hierbei aufgrund seiner Eigenschaft als Chaperon an der unfolded protein response (UPR) beteiligt. Das endoplasmatische Retikulum, durch das neu synthetisierte Proteine in verschiedene zelluläre Kompartimente verschickt werden, ist hochsensibel gegenüber überschießender Fehlfaltung von Proteinen (88). Unter diesem Stress erfolgt eine gezielte Antwort des ER, die als unfolded protein response oder *ER stress response* bezeichnet wird (88). Der ER-Stress führt zur Aktivierung des UPR und zur vermehrten Expression von GRP78, das antiapoptotisch wirkt (27). Wenn der ER-Stress ein bestimmtes Maß überschreitet, wird der programmierte Zelltod eingeleitet (88). Der ER-Stress spielt vermutlich auch beim Morbus Parkinson, bei der Arteriosklerose und beim Typ-2-Diabetes eine wichtige pathogenetische Rolle (88). Dass GRP78 auch essenziell für die Entwicklung ist, konnte eine Studie mit Knockout-Mäusen zeigen. Bei homozygoten Knockout-Mäusen kam es nach 3,5 Tagen aufgrund von verminderten Proliferationsraten und massiver Apoptose zum Absterben des Embryos (147). Bei heterozygoten Knockout-Mäusen hingegen kam es zu keinen phänotypischen Auffälligkeiten. Dies zeigt, wie wichtig GRP78 für die physiologische Funktion und Entwicklung der Zelle ist. Neben diesen physiologischen Funktionen spielt GRP78 auch eine Rolle bei der Tumorgenese. Im Rahmen des unkontrollierten Zellwachstums kommt es häufig zur Induktion von ER-Stress durch Glukosemangel und Hypoxie. Dies führt zu einer Aktivierung des UPR und zur vermehrten Expression von GRP78 (27). Es scheint, dass die entarteten Zellen durch eine Upregulation von GRP78 und der Suppression von proapoptotischen Proteinen die Apoptose vermeiden, was das Tumorwachstum begünstigt (27). Es konnte gezeigt werden, dass GRP78 in verschiedenen Tumoren verstärkt exprimiert wird. Dazu gehören z.B. Prostatakrebs (148) und Lungenkrebs (149). Bei Lungenkrebs sind höhere Expressionsraten mit einem schlechteren Differenzierungsgrad der Tumorzellen und einem fortgeschrittenen Tumorwachstum vergesellschaftet (149). GRP78 scheint aber nicht nur das Tumorwachstum zu fördern, sondern auch für die Resistenz gegen Chemotherapeutika mitverantwortlich zu sein. So wird GRP78 in Gliomzellen im Vergleich zum gesunden Gewebe des Hirns überexprimiert (28). Ein Knockdown von GRP78 führte in vitro zu langsamerem Wachstum der Gliomzellen, sowie einer verstärkten Induktion von Apoptose durch Chemotherapeutika. So konnte ein Knockdown die Sensitivität der Gliomzellen für 5-Fluoruracil erhöhen, wohingegen es bei Überexpression zu keinem Ansprechen der Tumorzellen auf 5-Fluoruracil kam (28). Auch die Auswirkungen von VPA auf

GRP78 sind bereits untersucht worden. Shi et al. zeigten, dass eine Behandlung von humanen embryonalen Nierenzellen mit VPA zu einer gesteigerten Expression von GRP78 führte (150). GRP78 stellt daher ein weiteres mögliches therapeutisches Ziel für die adjuvante Tumorthherapie dar. Die Studienlage zeigt, dass GRP78 in der Karzinogenese und in der Tumorthherapie aufgrund seiner antiapoptotischen Eigenschaften eine wichtige Rolle einnimmt. Zudem scheint es einen Zusammenhang mit der Expression des antiapoptotischen PON2 zu geben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Aktivierung des UPR durch ER-Stress zur vermehrten Expression von PON2 führt, was zu einer Eradikation der stressverursachenden ROS führt (29). Somit besteht über den UPR eine Verbindung von GRP78 zu PON2. Diese Arbeit soll diesen Zusammenhang weiter untersuchen, um die Rolle der beiden Proteine, sowie die Rolle des UPR in Bezug auf die Tumorgenese zu erforschen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Zellkultur

Tabelle 1: Zellkultur

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Accutase solution, A6964	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM, 1x), Nr.: 31885-023	Gibco® by life technologies™, Paisley, UK
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), D8537	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO), D2650	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco® by life technologies™, Paisley, UK
L-Glutamine, G7513	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Penicillin-Streptomycin, P0781	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nährmischung F-12 Ham (DME/F-12, 1:1), D6421	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE

### 3.1.2 Molekularbiologische Reagenzien

Tabelle 2: Molekularbiologische Reagenzien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
DEPC-Wasser RNase free Water	VWR International GmbH, Erlangen, DE
Ethanol 70 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, DE
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, DE
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
RIPA Puffer R 0278	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1, P5726	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, P0044	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Protease Inhibitor Cocktail, P8340	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Pierce BCA Protein Assay Kit, Nr. 23227	Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, DE
Mini-PROTEAN® TGX™ Gels	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
ECL™ Prime Western Blot Detection Kit, RPN2232	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
ECL™ Rainbow™ Marker-Full Range, RPN800E	Cytiva, Global life Sciences Solutions Operations UK Ltd, Buckinghamshire, UK
Qiashreder	Qiagen GmbH, Hilden, DE

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Valproinsäure Natriumsalz 98 %, P4543	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Trypan-blau-Lösung 0,4 %	Lonza, Walkersville, MD USA
2-Mercaptoethanol, mind. 98 %, M3148	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), M5655	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Isopropanol	Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, DE
2 N Salzsäure (HCL)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
L-012 sodium salt, SML22365	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ), D5439	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Fluorescence Mounting Medium, S3028	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Bovines Serum Albumin (BSA), A7906	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Triton-X-100, for molecular biology, T8787	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Ampuwa aqua dest., B230673	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DE
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Glycin, 25 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
4x Laemmli Puffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
Natronlauge 32 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Paraformaldehyd, P-6148	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE

### 3.1.4. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Cellstar® Serologische Pipette; 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, DE
Cellstar® Zellkulturflaschen; 550 ml	Greiner Bio-One GmbH, DE
Cellstar® Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, DE
Hard-Shell® 96-Well PCR Plates	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
Life Science PCR 8er-Strips-Reaktionsgefäß, 0,2 ml, farblos	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Life Science PCR 8er-Strips-Deckelstreifen	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Cellstar® Zellkulturplatte farblos, steril, 6-Well	Greiner Bio-One GmbH, DE
Pipettenspitzen mit ART™ Barriere; 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl farblos	Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, DE
Falcon® Cell Scraper	Corning Science Mexico, Tamaulipas, Mexico

### 3.1.5 Laborgeräte

Tabelle 5: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Eismaschine AF80	Frimont S.P.A., Milano, Italien
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr GmbH, Biberach an der Riß, DE
Gefrierschrank (-80 °C)	Liebherr GmbH, Biberach an der Riß, DE
Inkubator Function Line BB16	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Kühl-Gefrier-Kombination	Liebherr GmbH, Biberach an der Riß, DE
Lichtmikroskop DM2000	Leica DMIL Microsystems, Wetzlar, DE
Automatischer Zellen-Zähler LUNA-II™	Logos Biosystems, Villeneuve d'Ascq, Frankreich
NanoDrop™ One Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, DE
PCR Workstation Pro	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
PCR Real-Time, CFX Connect™	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Pipette Pipetmann® 0,1-1000 µl	Gilson S.A.S., FR
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Sicherheitswerkbank Herasafe HS12	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Thermocycler, peqstar	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Vortex	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE
Heraeus Megafuge 16	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Microplate Reader SpectraMax® iD5	Molecular Devices, San Jose, CA USA
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA
Fusion Solo S	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, DE
pH-Meter CG840	Schott, Mainz, DE

### 3.1.6 Zelllinien

Tabelle 6: Zelllinien

Name	Hersteller
SCC-9 (CRL-1629™)	American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
SCC-25 (CRL-1628™)	American Type Culture Collection, Manassas, VA USA
CAL-27 (CRL-2095™)	American Type Culture Collection, Manassas, VA USA

### 3.1.7 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Name	Hersteller
Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin Clone AC-74	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
GRP Polyclonal Antibody, AB_559362	Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, DE
Anti-PON2 antibody, ab183710	Abcam, Cambridge, UK

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Etablierung der Zellkultur

Für die Zellkulturversuche wurden die Zelllinien SCC-9, SCC-15 und CAL-27 vom Hersteller ATCC® verwendet. Es handelt sich um Tumorzelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms die aus humanem Zungengewebe gewonnen wurden. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Die Anzucht erfolgt in 550 ml Zellkulturflaschen mit 20 ml Zellkulturmedium. Ein Mediumwechsel wird alle 48 h durchgeführt. Die Kontrolle des Zellwachstums erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Für CAL-27 wird folgendes Nährmedium eingesetzt: DMEM 1 g Glucose + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % L-Glutamin verwendet. Für SCC-9 und SCC-25 verwendet man ein Zellkulturmedium bestehend aus DME/F-12 + 10 % FCS + 1 % Hydrocortison + 1 % L-Glutamin.

#### 3.2.1.2 Passagieren der Zellen

Zuerst wird das Medium verworfen, dann erfolgt eine Spülung der Kulturflasche mit PBS. Pro Flasche werden 6 ml Accutase-Lösung hinzugegeben und die Flasche für 5-10 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre zwischengelagert. Das erfolgreiche Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wird unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Zellsuspension wird mit einer serologischen Pipette aufgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit 10 ml Zellkulturmedium aufgefüllt. Anschließend wird bei 800 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auf das Zellpellet werden 10 ml Zellkulturmedium pipettiert und mit dem Vortexmischer resuspendiert. Mit einer Pipettenspitze werden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau in einem Eppendorf Tube gemischt. Die Auszählung erfolgt mit dem automatischen Zellen-Zähler LUNA-II™. Nach der Auszählung berechnet man das Volumen, welches für eine Zellanzahl von 50.000 pro well bei insgesamt 12 well (2x 6-well Platten) nötig ist.

Hier eine kurze Beispielrechnung:

Das Zählgerät gibt eine Konzentration von 300.000 Zellen/1000 µl an. Das entspricht  $3 \times 10^6$  Zellen in 10 ml Suspension. Bei 50.000 Zellen pro well benötigt man insgesamt 600.000 Zellen. Also werden 2000 µl der Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen pipettiert.

Dieses wird mit 24 ml Zellkulturmedium aufgefüllt (2 ml pro well) und auf die zwei 6-well Platten aufgeteilt. Nach Inkubation der Zellen über 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre erfolgt ein Mediumwechsel mit 2 ml frischem Zellkulturmedium.

### 3.2.1.3 Behandlung der Zellen mit Valproinsäure

Zur Herstellung einer einmolaren (1M) Stammlösung werden 1,67 g des Salzes der Valproinsäure in 10 ml destilliertem Wasser gelöst. Es soll ermittelt werden, bei welcher Konzentration sich ein Effekt feststellen lässt und welche der drei Zelllinien am besten auf die Behandlung mit Valproinsäure anspricht. Die Konzentrationen an VPA betragen hierfür 5 mM, 7,5 mM und 10 mM. Jeweils drei *well* werden mit je 5 mM, 7,5 mM oder 10 mM behandelt. Die letzten drei *well* bleiben unbehandelt und dienen der Kontrolle. Die VPA wird auf die 6-*well*-Platten pipetiert.

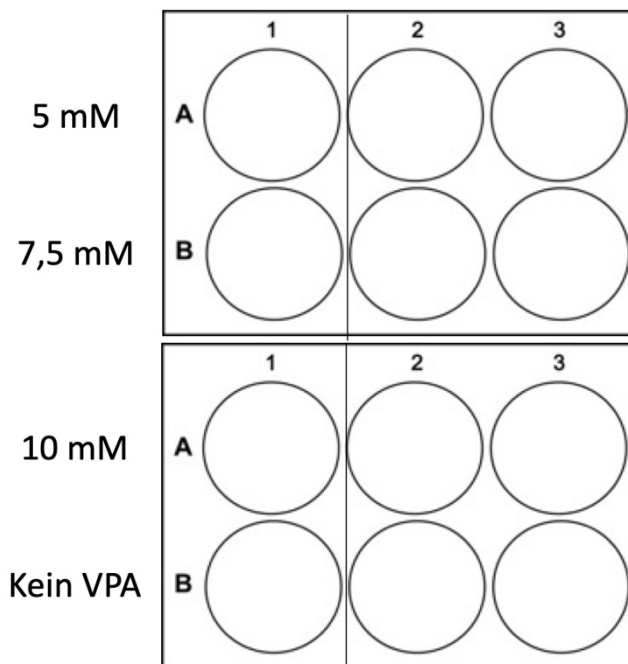


Abbildung 7: Bestimmung der spezifischen VPA-Konzentration

Tabelle 8: Konzentrationen und Volumina der VPA-Lösung

Konzentration	Volumen der VPA-Lösung pro <i>well</i>
5 mM	10 $\mu$ l
7,5 mM	15 $\mu$ l
10 mM	20 $\mu$ l

Die behandelten *well*-Platten werden für 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Durch Genexpressionsanalyse (siehe 3.2.2.4) bestimmt man, bei welcher VPA-Konzentration das Ansprechen am besten ist. Diese spezifische Konzentration wird für alle weiteren Versuche beibehalten, außer für die Immunfärbung. Der Aufbau sieht wie folgt aus: Versuchsaufbau mit spezifischer VPA-Konzentration

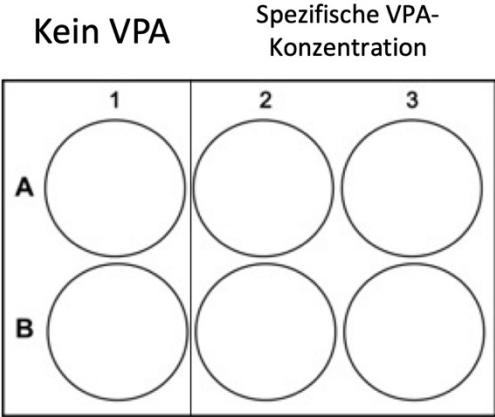


Abbildung 8: Versuchsaufbau mit spezifischer VPA-Konzentration

## 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.2.1 RNA-Extraktion

Die Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA) aus den Zellen von CAL 27, SCC-9 und SCC-25 erfolgt mit dem RNeasy® Mini Kit nach Herstellerangaben. Dazu werden die Zellen der beiden 6-well Platten, entsprechend den vier verschiedenen Konzentrationen (5 mM, 7,5 mM, 10 mM, Kontrolle), lysiert. Dies geschieht mittels 350 µl ( $<5 \times 10^6$  Zellen) RLT/ $\beta$ -ME Puffer. Durch Auf- und Abpipettieren werden die Zellen aufgelöst. Alle Arbeitsschritte während der RNA-Extraktion, bei denen das Pipettieren notwendig ist, werden mit Spitzen durchgeführt, die eine ART® Barriere enthalten. Das Lysat wird danach auf eine Qiagen-Shredder-Säule pipettiert und bei 13.000 U/min für 2 min zentrifugiert. Zu dem entstanden Lysat wird 350 µl 70 % Ethanol pipettiert und auf eine RNeasy-Säule gegeben. Die andere Säule wird verworfen. Nun wird wieder zentrifugiert, diesmal für 15 s bei 10.000 U/min und das Eluat verworfen. 350 µl RW-1-Puffer werden nun auf diese Säule pipettiert, erneut für 15 s bei 10.000 U/min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Dieser Wasch-Puffer sorgt dafür, dass alle nicht spezifischen Bindungen an der Silica-Membran entfernt werden. Zur Entfernung sämtlicher DNA-Reste pipettiert man jeweils 78 µl frisches DNase Gemisch auf die Säule und lässt diese bei Raumtemperatur für 15 min einwirken. Danach erfolgt eine erneute Zugabe von 350 µl RW-1-Puffer und die Zentrifugation bei 10.000 U/min für 15 s. Das Eluat wird verworfen und die Säule in ein neues Röhrchen eingesetzt. Nun werden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und für 15 s bei 10.000 U/min zentrifugiert. Dieser Schritt wird danach wiederholt, aber für 2 min bei 13.000 U/min. Das Eluat wird beide Male verworfen. Die Zentrifugationen mit dem RPE-Puffer dienen der Auswaschung von Salzen, die durch den Einsatz der vorherigen Puffer in die Säule gelangen. Anschließend wird die Säule für 1 min bei 10.000 U/min trocken zentrifugiert. Das Röhrchen wird vorsichtig aus der Zentrifuge entfernt und die Säule in ein vorher beschriftetes Eppendorf-Gefäß überführt. Abschließend werden 30 µl RNase freies Wasser auf die Säule pipettiert und bei 10.000 U/min für 1 min zentrifugiert. Nun befindet sich im Eppendorf-Gefäß die isolierte RNA, die in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst ist.

### 3.2.2.2 Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA

Nach vorheriger Extraktion der RNA erfolgt die quantitative Analyse, um die exakten Mengenverhältnisse herauszufinden. Sowohl die Konzentration als auch der Reinheitsgrad der RNA-Probe werden bestimmt. Die Messung wird mit dem Spektralphotometer NanoDrop® One der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Die Funktion des Geräts beruht auf dem Prinzip der Spektralphotometrie. Es deckt den Wellenlängenbereich von 220 nm bis 750 nm ab. Das Absorptionsmaximum der RNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ), das von Proteinen bei 280 nm ( $A_{280}$ ). Mit Hilfe des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  wird die Reinheit der Probe bestimmt. Dieser sollte bei ca. 2,0 liegen. Da ein niedrigerer Wert auf eine Verunreinigung hinweist, wird eine weitere Beurteilung durch den Quotienten  $A_{260}/A_{230}$  vorgenommen. Dieser Wert sollte zwischen 1,8-2,2 liegen. Eine Abweichung deutet auf eine Verunreinigung hin. Durch die Oberflächenspannung des Tropfens entsteht, nach dem Aufpipettieren der Probe, eine Flüssigkeitssäule zwischen den beiden Kontakten des Messgerätes. Die Kontakte bestehen aus Lichtleitern. Einer sendet einen Lichtblitz aus und der andere empfängt das Licht. Das empfangene Licht wird spektralphotometrisch gemessen und mit den generierten Daten durch den Computer die Konzentration berechnet. Nach Reinigung der Messfläche mit einem Mikrofasertuch, wird 1  $\mu$ l RNase freies Wasser aufpipettiert und eine Leerwertmessung durchgeführt. So erhält man den Referenzwert für die darauffolgenden Messungen der RNA-Proben. Die Messfläche wird erneut gereinigt und dann 1  $\mu$ l der RNA-Probe aufgetragen. Nach jeder Messung werden die Daten gespeichert und die Applikationsstelle gesäubert.

### 3.2.2.3 Reverse Transkription

Um die RNA für die Genexpressionsanalyse zu verwenden, wird sie zunächst in die stabilere complementary DNA (cDNA) umgewandelt. Dies geschieht durch die sogenannte reverse Transkription. Dafür nutzt man das Enzym reverse Transkriptase, welches einzelsträngige RNA in doppelsträngige cDNA umschreiben kann. Um am RNA-Strang ansetzen zu können, benötigt die Transkriptase einen DNA-Primer als Startsequenz. Da die meisten RNA-Stränge einen Poly-A-Schwanz an ihrem Ende aufweisen, stellt die Codierung des Primers kein Problem dar. Vom 3'-Ende des Primers aus synthetisiert die reverse Transkriptase einen komplementären cDNA-Strang. Aus diesem Hybridstrang muss der RNA-Strang entfernt werden, da sonst keine Replikation, beziehungsweise Transkription stattfinden kann. Der Großteil wird mittels RNasen abgebaut. Die wenigen verbliebenen RNA-Sequenzen dienen im folgenden Schritt als Primer für die DNA-Polymerase-I, die den cDNA-Strang zu einem komplementären DNA-Doppelstrang synthetisiert. DNA-Nukleotide ersetzen die übrigen RNA-Primer und der

Poly-T-Schwanz des cDNA-Strangs wird entfernt. Die entstandene DNA kann nun weiterverarbeitet werden.

Zunächst wird die RNA Menge jeder einzelnen Probe anhand des Messwertes am NanoDrop® berechnet. Folgende Formel wird dafür verwendet:

$$\text{Gesamt-RNA in ng} = \text{gemessener Wert ng/}\mu\text{l} \times 30 \mu\text{l}$$

Beispiel: Die Messung ergibt 250 ng/ $\mu$ l RNA  $\rightarrow$  7500 ng RNA Gesamtmenge

Für unsere Versuche benötigen wir 100 ng RNA je Probe, um sie in cDNA umzuschreiben. Die Formel lautet:

$$\text{Gewünschte Menge RNA} = \left( \frac{100 \text{ ng}}{\text{Gesamt RNA in ng}} \right) \times 30 \mu\text{l}$$

Daraus folgt:

$$\left( \frac{100 \text{ ng}}{7500 \text{ ng}} \right) \times 30 \mu\text{l} = 0,4 \mu\text{l}$$

Zu diesen 0,4  $\mu$ l wird genau so viel RNase freies Wasser pipettiert, dass man ein Gesamtvolumen von 15  $\mu$ l erreicht. Für das gezeigte Beispiel sind also 14,6  $\mu$ l Wasser nötig.

Zum Ansetzen des Mastermix wird das cDNA-Kit der Firma BioRad verwendet. Pro *well* werden 5  $\mu$ l Mastermix benötigt. Dieser besteht aus 1  $\mu$ l Enzym und 4  $\mu$ l iScript. Der Ansatz wird immer so berechnet, dass man einen *well* Überschuss hat. Das bedeutet bei 7 Proben ein 8-facher Ansatz. Von diesem Mastermix Ansatz wird danach zu jedem *well* 5  $\mu$ l pipettiert, sodass man eine Gesamtmenge von 20  $\mu$ l erreicht.

$$15 \mu\text{l RNA/RNase freies H}_2\text{O} + 5 \mu\text{l Mastermix} = 20 \mu\text{l}$$

Die 96-*well*-Platte wird anschließend im Thermocycler platziert. Nach Durchlaufen des Programms wird die cDNA bei -20 °C zwischengelagert.

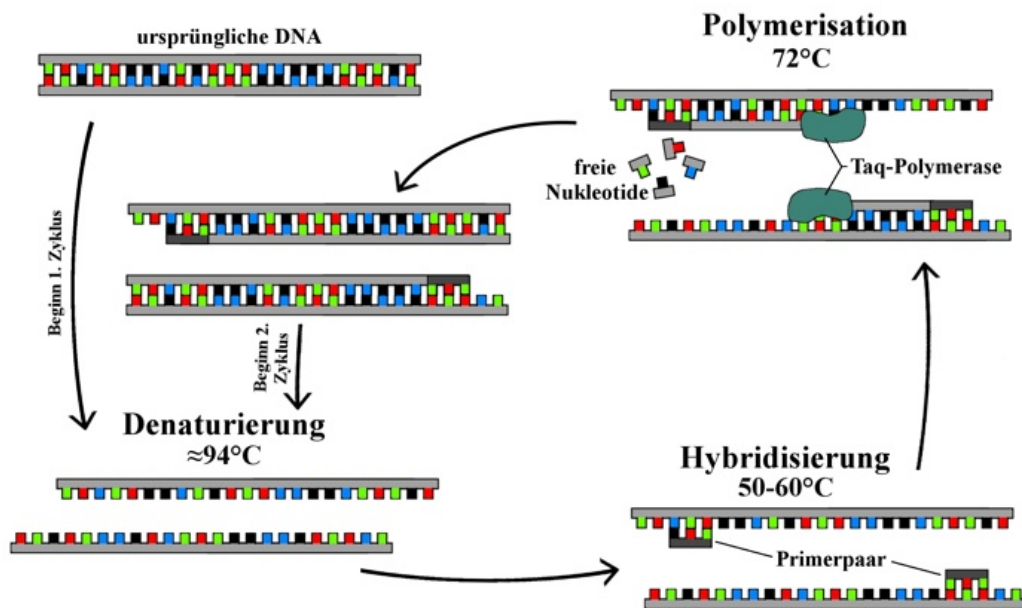
Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die reverse Transkription

Komponente	Volumen (µl)
RNase-freies Wasser	Variabel
mRNA	Variabel
5x Script Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transkriptase	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl

### 3.2.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Standardverfahren in der modernen Molekularbiologie. Ein bestimmter DNA-Abschnitt lässt sich mit dieser Technik beliebig häufig vervielfältigen, um eine ausreichende Menge für weiterführende Untersuchungen zu gewinnen. Man benötigt für die Durchführung eine hitzestabile DNA-Polymerase, die zu vervielfältigende DNA, auch Template genannt, zwei auf dieses Template abgestimmte Oligonukleotidprimer, sowie freie Nukleotide und eine Pufferlösung. Die PCR besteht aus folgenden Schritten:

1. Denaturierung: Zunächst muss der komplementäre Doppelstrang der Template-DNA in zwei Einzelstränge geteilt werden. Dies geschieht bei einer Temperatur von 94 °C
2. Hybridisierung: Nach einer Abkühlungsphase auf 55 °C lagern sich die passenden Oligonukleotidprimer an die beiden Einzelstränge an, indem sich Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Nukleinbasen bilden.
3. Elongation: Nun wird erneut auf 72 °C erhitzt. Das ist die optimale Arbeitstemperatur für die DNA-Polymerase. Sie bindet die komplementären Nukleotide an die Einzelstränge. Somit erhält man eine genaue Kopie des ursprünglichen Templates. Am Ende dieses Zyklus wird erneut auf 94 °C erhitzt und der Prozess beginnt von vorne. Die neu synthetisierte DNA dient jetzt als Template. Die theoretische Verdopplung der DNA in einem Durchgang wird in der Praxis nicht erreicht, da das Ergebnis von vielen Faktoren abhängig ist. Unter anderem von Qualität und Menge der Template-DNA, vom pH-Wert des Puffers, vom exakten Zeitintervall bei Denaturierung und Elongation, sowie der passenden Nukleotidkonzentration und Primerkodierung. Bei den Versuchen wurde die Real Time PCR angewandt. Bei dieser Art der PCR wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I zugesetzt. Dessen Signalstärke wird detektiert, da sie mit der Menge der entstehenden PCR-Produkte korreliert. So kann man in Echtzeit deren Quantität erfassen.



**Abbildung 9: Ablauf der PCR**

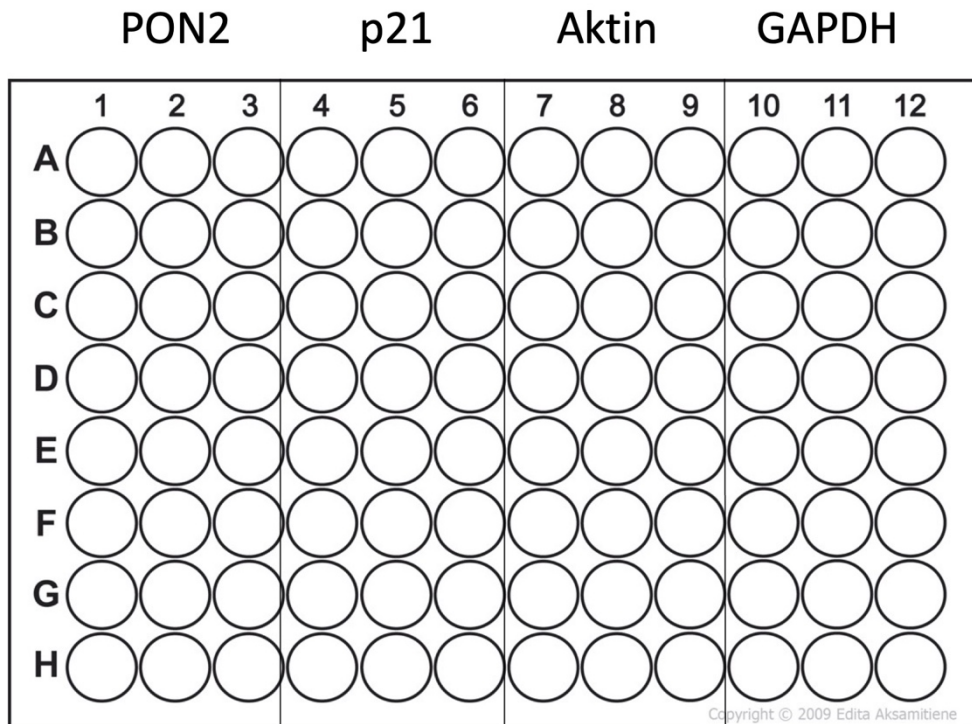
Quelle: <https://www.uni-bielefeld.de/teutolab/fachorientiert/biotechnologie/Arbeitsmaterial/PCR-Zyklus>

Zunächst wird der Mastermix für die PCR angesetzt. Pro *well* werden 18  $\mu\text{l}$  Mastermix + 2  $\mu\text{l}$  cDNA verwendet. Da je Probe 3 *well* beschickt werden sollen und es sich um 4 Proben handelt, wird für 15 *well* Mastermix berechnet. Damit ist sichergestellt, dass sich in jedem *well* das vorgesehene Volumen befindet.

Tabelle 10: Zusammensetzung Mastermix pro *well*

Komponente	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
iTaqUniversal SYBR Green Supermix	11 $\mu\text{l}$
RNase-freies Wasser	5 $\mu\text{l}$
Primer sense	1 $\mu\text{l}$
Primer antisense	1 $\mu\text{l}$

Die PCR wurde in Mikrotiterplatten mit 96 wells durchgeführt. Der Aufbau sah wie folgt aus:



**Abbildung 10: 96-well Platte**

Auf einer weiteren Mikrotiterplatte wurde die PCR mit p27, LC3B und CAV1 durchgeführt. Die Kontrolle erfolgte ebenfalls mit Aktin und GAPDH. Folgende Primersequenzen wurden genutzt:

Tabelle 11: Primersequenzen

Name	Sequenz (5'-3')
GAPDH s	5'-CAT GAC AAC TTT GGT ATC GTG-3'
GAPDH as	5'-GTC CAC CAC TGA CAC GTT G-3'
Aktin s	5'-GGA GCA ATG ATC TTG ATC TT-3'
Aktin as	5'-CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT-3'
PON2 s	5'-TCG TGT ATG ACC CGA ACA ATC C-3'
PON2 as	5'-AAC TGT AGT CAC TGT AGG CTT CTC-3'
p21 s	5'-GCA GAC CAG CAT GAC AGA TTT-3'
p21 as	5'-AAG ATG TAG AGC GGG CCT TT-3'
LC3B s	5'-CAG CGT CTC CAC ACC AAT CT-3'

LC3B as	5'-GCG GGT TTT GTG AAC CTG AA-3'
p27 s	5'-AGT GTC TAA CGG GAG CCC TA-3'
p27 as	5'-AAG AAT CGT CGG TTG CAG GT-3'
CAV1 s	5'-TAC GTA GAC TCG GAG GGA CAT-3'
CAV1 as	5'-GAA GCT GGC CTT CCA AAT GC-3'

### 3.2.2.5 MTT-Protokoll

Lebende Zellen können das gelbe Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) aufnehmen. Mittels einer mitochondrialen Dehydrogenase wird es zu einem stark blauen wasserunlöslichen Formazanfarbstoff umgesetzt. Die Zellen werden lysiert, damit sie diesen Farbstoff freisetzen. Bei einer Wellenlänge von 570 nm wird die Intensität der Blaufärbung gemessen. Sie korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen und bei gleicher Zellart auch mit deren Anzahl. Man geht dabei wie folgt vor:

Zuerst werden 200 mg MTT in 40 ml PBS gelöst. Im *well* soll eine Verdünnung von 1:10 vorliegen. Das heißt, bei 2 ml Medium müssen 200 µl MTT auf jedes *well* pipettiert werden. Danach erfolgt eine Inkubation über 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Das Medium wird dann abpipettiert und das *well* vorsichtig mit PBS gespült. Dann werden 2 ml Lysepuffer auf jedes *well* gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 30 min bei Raumtemperatur werden die photometrischen Messungen durchgeführt. Zu Beginn muss der Leerwert mit Hilfe des reinen Lysepuffers gemessen werden, dann folgen die Proben.

Tabelle 12: Stammlösung für MTT-Test

Komponente	Volumen
MTT	200 mg
PBS	40 ml

Tabelle 13: Lysepuffer

Komponente	Volumen
Isopropanol	49 ml
2 N HCl	1 ml

### 3.2.2.6 Proteinextraktion

Die Proteinextraktion ist Vorbereitung für proteinanalytische Verfahren wie den Western Blot. Zunächst werden die benötigten Zellen in 6-*well*-Platten kultiviert. Zu Beginn der Proteinextraktion werden die 6-*well* Platten auf Eis gestellt und das Medium abgekippt. Danach erfolgt eine zweifache Spülung mit kaltem PBS. Pro *well* werden 500 µl des Lysepuffers, bestehend aus RIPA-Puffer mit Inhibitoren (Tabelle 14), aufpipettiert. Die Zellen werden durch Schaben mit einem Cell Scraper gelöst. Nun wird das Lysat in das 2. *well*, das mit gleicher VPA-Konzentration behandelt wurde, überführt und der Vorgang wiederholt. So werden alle Zellen gepoolt, die der gleichen Konzentration ausgesetzt waren. Nach dem Ablösen der Zellen vom letzten *well* verbleibt das Lysat für 5 min auf Eis bevor man es in ein Eppendorf Gefäß überführt. Daraufhin werden die Eppendorf-Gefäße bei 10.000 U/min und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Inhalt wird dann in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, welches sofort mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und danach bei -80 °C gelagert wird.

Tabelle 14: Ansatz für die Proteinextraktion

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
RIPA Puffer	1000 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	10 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	10 µl
Protease Inhibitor Cocktail	100 µl

### 3.2.2.7 Messung der Proteinmengen

Zur Proteinquantifizierung wird das *Pierce BCA Protein Assay Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wird zunächst durch die Proteine  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert.  $\text{Cu}^{1+}$  wird dann kolorimetrisch durch Bicinchoninsäure nachgewiesen. In einer 96-well-Platte werden jeweils 25  $\mu\text{l}$  einer Proteinprobe zu 200  $\mu\text{l}$  Färbelösung gegeben. Die Färbelösung besteht aus zwei Reagenzien, A und B. Diese werden nach Herstellerangaben im Verhältnis 50 : 1 (Reagenz A : Reagenz B) angesetzt. Anschließend erfolgt eine Inkubation für 30 min bei 37 °C. Die Messung erfolgt nach Abkühlung auf Raumtemperatur bei 562 nm mit dem Microplate Reader Spectra-Max® iD5 in einer 96-well-Platte.

### 3.2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Gel-Elektrophoresetechnik SDS-PAGE werden die im Proteingemisch befindlichen Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an die Originalmethode von Laemmli (1970). Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bildet mit den Proteinen negativ geladene Komplexe. Die von einem Protein gebundene Menge SDS ist proportional zur Größe des Proteins. Daher besteht auch eine Proportionalität zwischen Größe des Proteins und der Ladung des Protein-SDS-Komplexes. Dies ist der Grund für die Auftrennung eines Gemischs im elektrischen Feld. Außerdem denaturiert SDS in Verbindung mit den reduzierenden Agenzien Dithiothreitol (DTT) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol die Proteine. Somit werden Protein-Protein-Wechselwirkungen verhindert. Die Polyacrylmatrix scheidet die Proteine nach ihrer Größe, wenn sie im elektrischen Feld zur Anode wandern.

Zunächst wird jede Proteinprobe mit Lämmli Puffer im Verhältnis 4 : 1 verdünnt. Danach erfolgt eine Denaturierung für 5 min bei 90 °C. Die Kammer wird zusammengebaut und der Elektrophoresepuffer eingefüllt. Als Kammer wird die *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* von *Bio-Rad* verwendet. Es werden vorgefertigte *Mini-PROTEAN® TGX™* Gele der Firma *Bio-Rad* benutzt. 10  $\mu\text{l}$  jeder Probe werden in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Zusätzlich werden zur Orientierung 10  $\mu\text{l}$  *Rainbow Marker* in eine weitere Tasche pipettiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgt für 10 min bei 20 mA und dann für 45 min bei 40 mA. Zur besseren Sichtbarkeit der Proteine kann das Gel anschließend mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt werden.

Tabelle 15: 5x Laufpuffer

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Tris-Base	150 g
Glycin	720 g
Aqua dest	ad 5000 ml

Tabelle 16: 1x Laufpuffer

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
5x Laufpuffer	100 ml
10% SDS	5 ml
Aqua dest	ad 500 ml

### 3.2.2.8 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Hierbei werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen und danach sichtbar gemacht. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde im vorherigen Abschnitt erläutert. Die Übertragung der Proteine vom Trenngel auf eine statische Matrix stellt den eigentlichen Vorgang des Blottens dar. Dazu wird ein elektrisches Feld angelegt, das senkrecht zum Polyacrylamid-Gel steht. So wandern die Proteine vom Gel auf die Membran. Die Anordnung der Proteinbanden bleibt dabei gleich und sie können nun sichtbar gemacht werden. Die Anfärbung geschieht mittels Antikörpersonden. Vorher wird allerdings noch die freie Oberfläche der Membran mit einer Proteinlösung abgesättigt, um die Oberfläche für die Antikörper zu blockieren. Die Visualisierung erfolgt mittels Chemilumineszenz. Zunächst wurde mittels Western Blot die basale Proteinexpression von PON2 in den Zelllinien CAL-27, SCC-9 und SCC-25 bestimmt. Des Weiteren wurde die Proteinexpression von PON2 und GRP78 nach Inkubation mit VPA für 48 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe untersucht.

Für die Übertragung wird die *semi-dry-transfer* Kammer von BioRad und ein diskontinuierliches Puffersystem genutzt. Das Puffersystem besteht aus drei verschiedenen Blotting-Puffern. Kathodenpuffer, Anodenpuffer I und Anodenpuffer II. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird das Gel aus der Kammer entfernt und für 15 min in Kathodenpuffer inkubiert. Das Gel wird dann auf eine PVDF-Membran gelegt, die vorher mit Methanol gereinigt wurde und für 5 min in Aqua dest. äquilibriert wurde. Nun erfolgt das Zuschneiden von 8 Whatman-Papieren entsprechend der Größe des Gels aus dem die Proteine auf die Membran transferiert werden sollen. Davon werden 4 im Kathodenpuffer, 2 im Anodenpuffer I und 2 im Anodenpuffer II für 10 min äquilibriert. Der Aufbau sieht wie folgt aus:

Tabelle 17: Aufbau der semi-dry-unit

<b>Oberseite</b>
4x Whatman-Papier Kathodenpuffer
Gel
Membran
2x Whatman-Papier Anodenpuffer II
2x Whatman-Papier Anodenpuffer I
<b>Unterseite</b>

Der elektrophoretische Transfer erfolgt für 20 min bei 300 mA. Unspezifische Bindungen von Antikörpern, an die in der Membran befindlichen Proteine, sollen vermieden werden. Dazu wird die Membran eine Stunde mit 5 % Milchpuffer in TBS-Puffer (Blocking Solution) blockiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem primären PON2 Antikörper (1 : 1000). Dies geschieht über Nacht bei 4 °C und unter *end-over-end* Rotation. Am Folgetag wird die Membran dreimal für 10 min mit TBS-Puffer gewaschen. Bei Raumtemperatur erfolgt dann für eine Stunde die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für PON2 (1 : 1000). Danach wird die Membran erneut dreimal 10 min mit TBS-Puffer gewaschen. Die Proteine werden durch den Einsatz des *ECL Western Blot Detection kits* sichtbar gemacht. Dabei werden die Reagenzien von der, am sekundären Antikörper gebundenen, Meerrettich-Peroxidase umgesetzt, wodurch Chemilumineszenz erzeugt wird. Die Membran wird auf einer Glasplatte platziert, mit der Detektionslösung inkubiert und die Chemilumineszenz mit dem *Fusion Solo S* gemessen. Anhand der Stärke des Signals kann die relative Proteinmenge bestimmt werden. Bei jedem Western Blot wurde zusätzlich ein immunologischer Nachweis von Aktin durchgeführt. Die Konzentrationen für den primären und sekundären Antikörper betragen 1 : 5000. Aktin ist Bestandteil des Zytoskeletts. Man nimmt an, dass Proteine des Zytoskeletts immer gleich stark exprimiert werden. Somit bedeuten gleichgroße Aktin-Mengen bei den Proben, dass gleichgroße Mengen Gesamtprotein verwendet wurden. Nach dem gleichen Schema wurde die Proteinexpression von GRP78 ermittelt. Die Konzentrationen für den primären und sekundären Antikörper betrug 1 : 1000.

Tabelle 18: Anodenpuffer 1

Komponente	Volumen
Tris-Base	18,1 g
Methanol	100 ml
Aqua dest	400 ml

Tabelle 19: Anodenpuffer 2

Komponente	Volumen
Tris-Base	1,5 g
Methanol	100 ml
Aqua dest	400 ml

Tabelle 20: Kathodenpuffer

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Tris-Base	18,1 g
Norleucin-DL	5,25 g
SDS 10%	2,5 ml
Aqua dest	1000 ml

Tabelle 21: 10x TBS

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
NaCl (1,4 M)	81,8 g
Tris-Base (0,1 M)	12,1 g
Aqua dest	ad 1000 ml

### 3.2.2.9 Stripping

Diese Methode ermöglicht eine Wiederverwendung der Membran, um unterschiedliche Proteine nachzuweisen. Dabei werden die primären Antikörper der vorausgegangenen Visualisierung entfernt. Die Membran wird zunächst 30 min in 25 mM Glycin (pH 2,0) und danach 30 min in 1 % SDS inkubiert. Danach wird sie zweimal mit TBS-Puffer gewaschen und für eine Stunde in Blocking Solution geschwenkt. Die Membran kann bis zur nächsten Verwendung bei -20 °C zwischengelagert werden.

Tabelle 22: 25 mM Glycin

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Glycin	1,877 g
Aqua dest	ad 1000 ml

Tabelle 23: 10% SDS

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
SDS	50 g
Aqua dest	ad 500 ml

Tabelle 24: Blocking Solution

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Milchpulver	10 g
TBS-W	200 ml

### **3.2.2.10 Die Messung von intrazellulären ROS-Spiegeln**

Die Menge an intrazellulären ROS kann mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden. Dazu wird das Luminolderivat L-012 genutzt. Es detektiert vornehmlich intrazelluläre ROS, kann aber auch extrazelluläre ROS messen. Am Vortag der Messung werden 5000 Zellen/*well* auf eine 96-*well*-Platte in 100 µl Medium ausgesät. Die Platte wird für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h erfolgt eine Spülung der Zellen mit PBS und die Inkubation mit L-012 für 15 min bei 37 °C. Die L-012 Konzentration beträgt 500 µmol/l. Die Zellen einer Platte werden mit drei verschiedenen Substanzen inkubiert. Dabei werden jeweils 24 *wells* genutzt, wobei zur Positivkontrolle mit DMNQ inkubiert wird. Ein weiteres, nur mit Medium gefülltes *well* dient als Negativkontrolle. Die anderen 24 *wells* werden mit VPA inkubiert. Dabei wird die vorher bestimmte, für die jeweilige Zelllinie spezifische, VPA-Konzentration verwendet (Siehe Kapitel 3.2.1.3). Danach wird die ROS-induzierte Chemilumineszenz für 60 min gemessen. Die Messungen erfolgen in Abständen von 5 min mit dem Mikroplatten Reader SpectraMax® iD5.

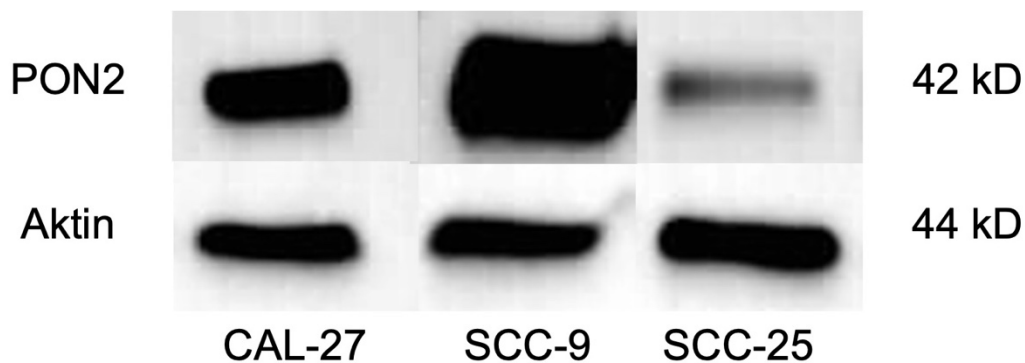
### **3.2.2.11 Durchführung der statistischen Analysen**

Die Grafiken aus Kapitel 4 wurden alle mittels der Programme GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software San Diego, CA, USA) und SPSS® (IBM, New York, USA) erstellt. Statistische Signifikanzen wurden mittels „students t-test“, „one- oder two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison post-test“ sowie Logrank-Test erstellt. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert  $\leq 0.05$  festgelegt. Die Berechnungen wurden ebenfalls mit der oben aufgeführten Software durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

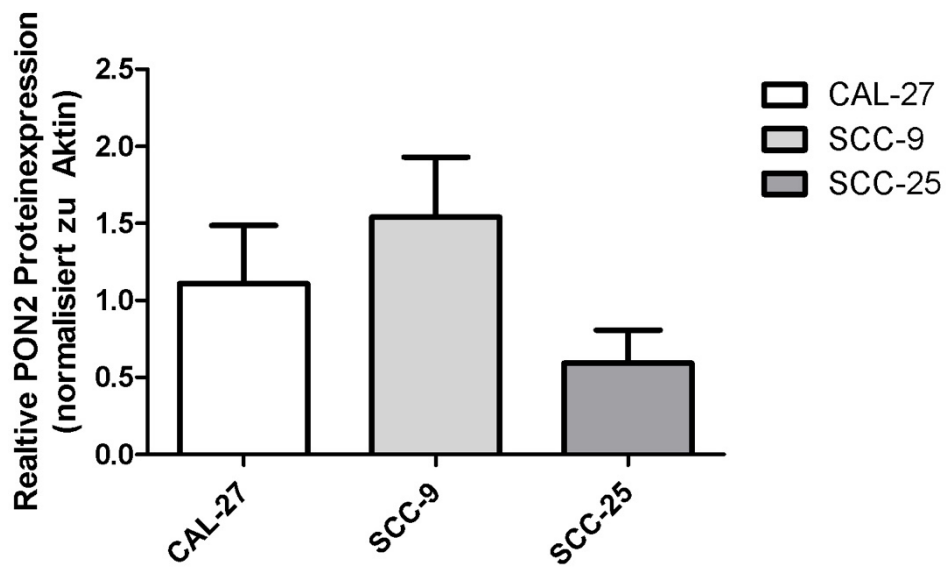
### 4.1 Bestimmung der basalen PON2 Expression

Zu Beginn der vorliegenden Studie erfolgte die Bestimmung der basalen PON2 Expression der drei Zelllinien, um festzustellen, ob sich diese voneinander unterscheiden und um dann Unterschiede im biologischen Verhalten zu analysieren. Die Bestimmung erfolgte mittels Western Blot. Hierzu wurden die PON2-Proteinbanden der Tumorzelllinien CAL-27, SCC-9 und SCC-25 nebeneinander visualisiert. Nach Verwendung der Antikörper gegen PON2 (1 : 1000) und Aktin (1 : 5000) wurde die optische Dichte der Proteinbanden mittels *ImageJ* erfasst und die relative PON2 Proteinmenge normalisiert zu Aktin gemessen. Abbildung 10 zeigt, dass die Intensität der Proteinbande von SCC-9 am stärksten und die von SCC-25 am schwächsten ist. Abbildung 11 zeigt die quantitative Analyse des Western blots. Die relative PON2 Proteinexpression von CAL-27 (MW:  $1,110 \pm 0,8431$ ) lag zwischen den Werten von SCC-9 (MW:  $1,541 \pm 0,8717$ ) und SCC-25 (MW:  $0,5930 \pm 0,4801$ ). Die basale PON2 Proteinexpression unterscheidet sich also zwischen den drei Zelllinien, wobei SCC-9 die höchste und SCC-25 die niedrigste Expression aufwies.



**Abbildung 11: Western Blot der basalen PON2 Proteinexpression**

Die Messung der optischen Dichte erfolgte normalisiert zu Aktin. Die Intensität der Proteinbanden zeigt bereits, dass SCC-9 die höchste und SCC-25 die niedrigste basale PON2 Expression aufweisen. Das Ergebnis der statistischen Auswertung zeigt Abbildung 11.

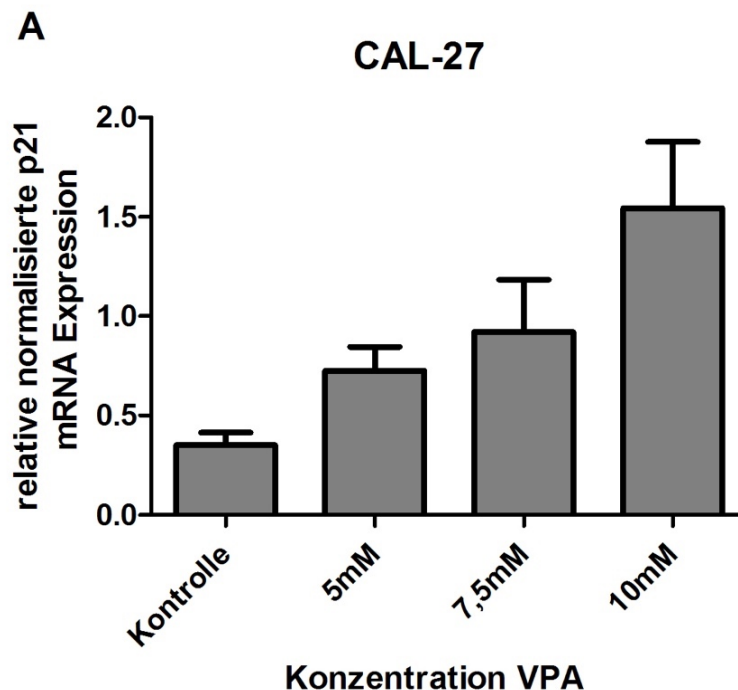


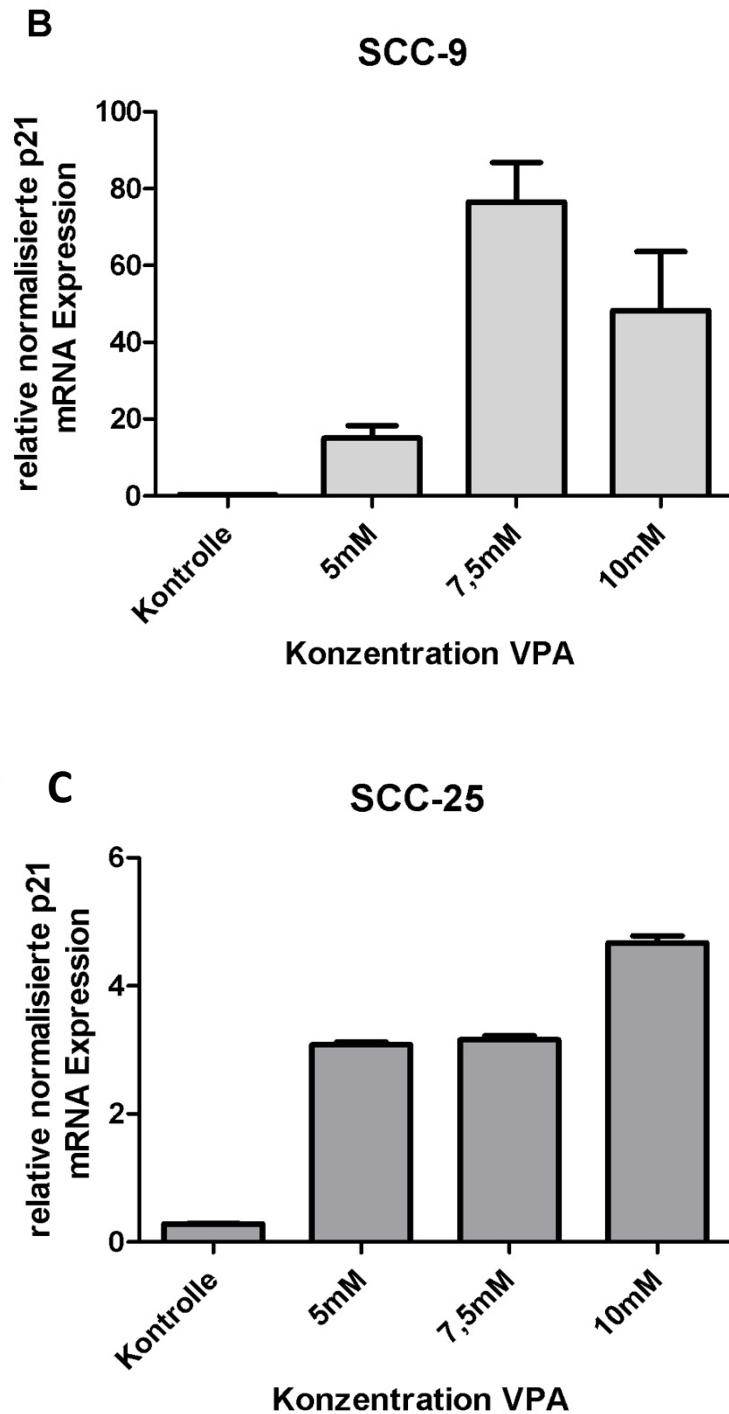
**Abbildung 12: Basale PON2 Proteinexpression**

Die Zelllinien weisen Unterschiede in ihrer basalen PON2 Expressionsrate auf. Während SCC-9 Zellen die höchste (MW: 1,541 ± 0,8717) und SCC-25 (MW: 0,5930 ± 0,4801) die geringste PON2 zeigen, liegt die Zelllinie CAL-27 (MW: 1,110 ± 0,8431) dazwischen.

## 4.2 Bestimmung der spezifischen VPA-Konzentration

Um einen durch VPA ausgelösten intrazellulären Effekt auf die untersuchten Tumorzelllinien darzustellen, wurde die Expression von p21 nach Inkubation mit VPA gemessen. VPA induziert den Zellzyklus Arrest über eine Erhöhung der p21-Expression (15). Zu Beginn der Versuchsreihen wurde daher die mRNA-Expression von p21 bei drei verschiedenen VPA-Konzentrationen mittels gRT-PCR untersucht. Es wurden 5 mM, 7,5 mM und 10 mM VPA eingesetzt. Abbildung 12 zeigt die Konzentrationsreihen für die einzelnen Zellen. Die Inkubation erfolgte über 48 Stunden. Dabei zeigten die drei Zelllinien CAL-27, SCC-9 und SCC-25 ein unterschiedliches Ansprechen: Im Fall von CAL-27 kam es bei 10 mM VPA zur vergleichsweise stärksten Expression von p21. Bei den SCC-9 Zellen zeigte sich die stärkste mRNA-Expression von p21 bei einer VPA-Konzentration von 7,5 mM. Die Zelllinie SCC-25 wies die stärkste p21 Expression bei einer VPA-Konzentration von 10 mM auf. Diese Konzentrationen an VPA bewirkten die stärkste mRNA-Expression von p21. Daher wurden die weiteren Versuche mit der in diesem Experiment ermittelten zelllinienspezifischen Konzentration an VPA (CAL-27: 10 mM; SCC-9: 7,5 mM; SCC-25: 10 mM) durchgeführt.





**Abbildung 13: Ermittlung der Arbeitskonzentration von VPA für die Zelllinien CAL-27, SCC-9 und SCC-25**

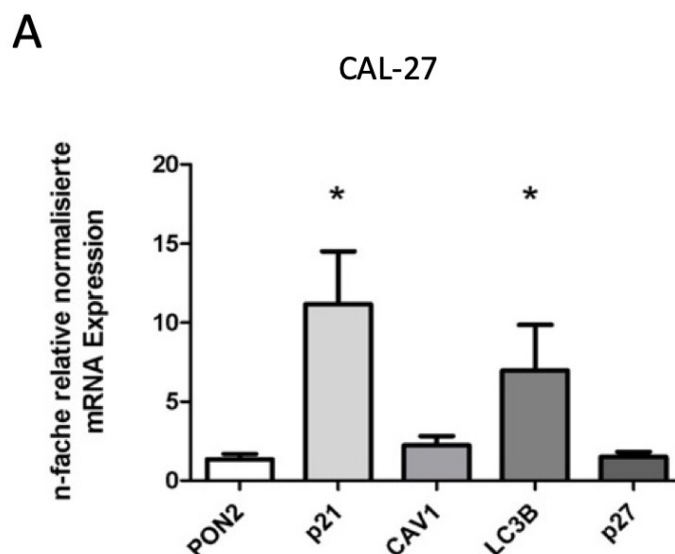
Die mRNA-Expression von p21 nach Inkubation mit VPA belegt einen Effekt durch VPA. A: Für die Zelllinie CAL-27 zeigte sich die stärkste VPA p21 Induktion bei 10 mM VPA. B: In der Zelllinie SCC-9 war der VPA-induzierte Effekt bei einer Konzentration von 7,5 mM am stärksten. C: Für SCC-25 wurde eine VPA-Arbeitskonzentration von 10 mM ermittelt.

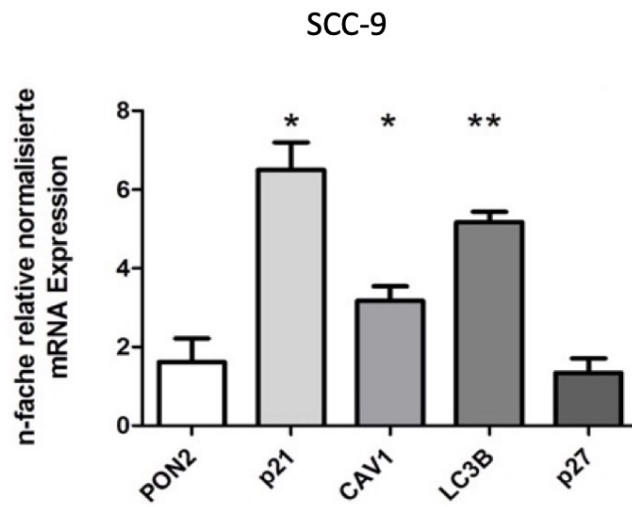
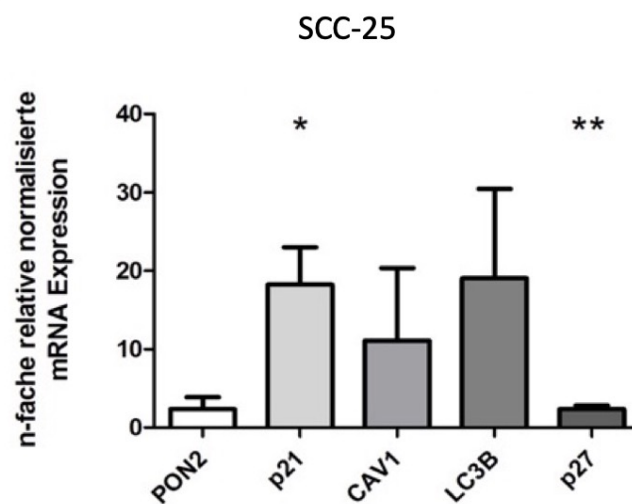
### 4.3 Einfluss von VPA auf die Genexpression von PON2, p21, CAV1, LC3B und p27

Für alle drei Zelllinien erfolgte eine Inkubation für 48 h mit der jeweils spezifischen VPA-Konzentration (Kapitel 4.2). Daraufhin wurde die mRNA-Expression der Gene PON2, p21, CAV1, LC3B und p27 gemessen, um einen potenziellen Einfluss von VPA auf deren Expression im oralen Plattenepithelkarzinom zu überprüfen. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten qRT-PCRs. Dargestellt ist jeweils der relative Anstieg der mRNA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD). Die Grafik zeigt das Ergebnis drei unabhängig durchgeführter Experimente ( $n=3$ ). Die statistische Signifikanz wurde mittels 2way-ANOVA berechnet. In CAL-27 ist der relative Anstieg der PON2 Expression (MW:  $1,363 \pm 0,65$ ;  $p > 0,05$ ), sowie der Expression von CAV1 (MW:  $2,241 \pm 1,004$ ;  $p > 0,05$ ) und p27 (MW:  $1,513 \pm 0,5441$ ;  $p > 0,05$ ) nicht signifikant. Die mRNA Expression von p21 (MW:  $11,18 \pm 6,655$ ;  $p < 0,05$ ) und LC3B (MW:  $6,982 \pm 4,992$ ;  $p < 0,05$ ) steigt hingegen signifikant an.

Nach Inkubation von SCC-9 Zellen mit VPA zeigt sich kein signifikanter Anstieg für PON2 (MW:  $1,614 \pm 1,482$ ;  $p > 0,05$ ) und p27 (MW:  $1,342 \pm 0,6423$ ;  $p > 0,05$ ). Hingegen steigt für p21 (MW:  $6,504 \pm 1,544$ ;  $p < 0,05$ ), CAV1 (MW:  $3,172 \pm 0,6405$ ;  $p < 0,05$ ) und LC3B (MW:  $5,173 \pm 0,4611$ ;  $p < 0,05$ ) die Expression signifikant an.

Ein ähnliches Bild ist bei SCC-25 Zellen zu beobachten. Der Anstieg der Expression von PON2 (MW:  $2,353 \pm 3,424$ ;  $p > 0,05$ ), CAV1 (MW  $11,09 \pm 18,52$ ;  $p > 0,05$ ) und LC3B (MW  $19,05 \pm 22,82$ ;  $p > 0,05$ ) war nicht signifikant. Allein die mRNA-Expression von p21 (MW:  $18,25 \pm 10,63$ ;  $p < 0,05$ ) und p27 (MW  $2,362 \pm 0,8895$ ;  $p < 0,05$ ) zeigt einen signifikanten Anstieg.



**B****C**

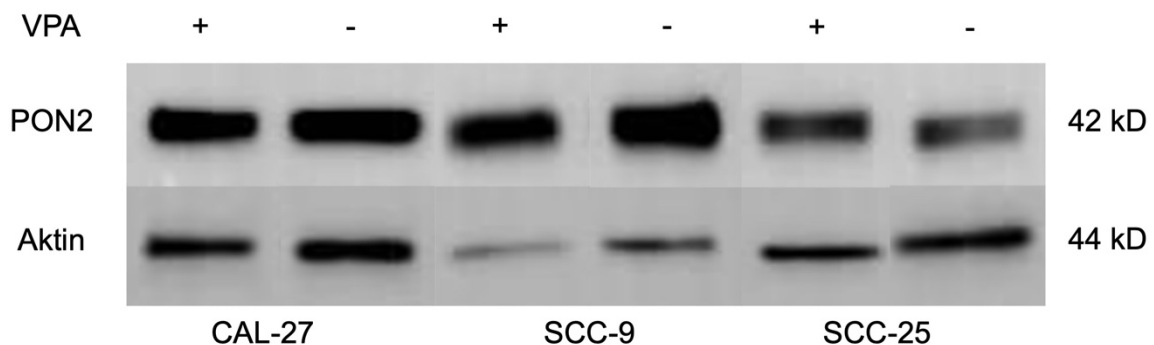
**Abbildung 14: mRNA-Expression nach Inkubation mit VPA**

Gezeigt ist die Expression der mRNA nach Inkubation mit VPA für 48h. A: In CAL-27 kommt es zu keiner signifikanten Erhöhung der Expression von PON2, CAV1 und p27 ( $p > 0,05$ ). p21 und LC3B sind hingegen signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). B: In SCC-9 ist die Expression von PON2 und p27 nicht erhöht ( $p > 0,05$ ), wohingegen die Expression von p21, CAV1 und LC3B signifikant zunimmt ( $p < 0,05$ ). C: In SCC-25 kommt es zu keiner vermehrten Expression von PON2 und CAV1 ( $p > 0,05$ ). p21 und p27 sind signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ).

## 4.4 Analyse der Proteinexpression

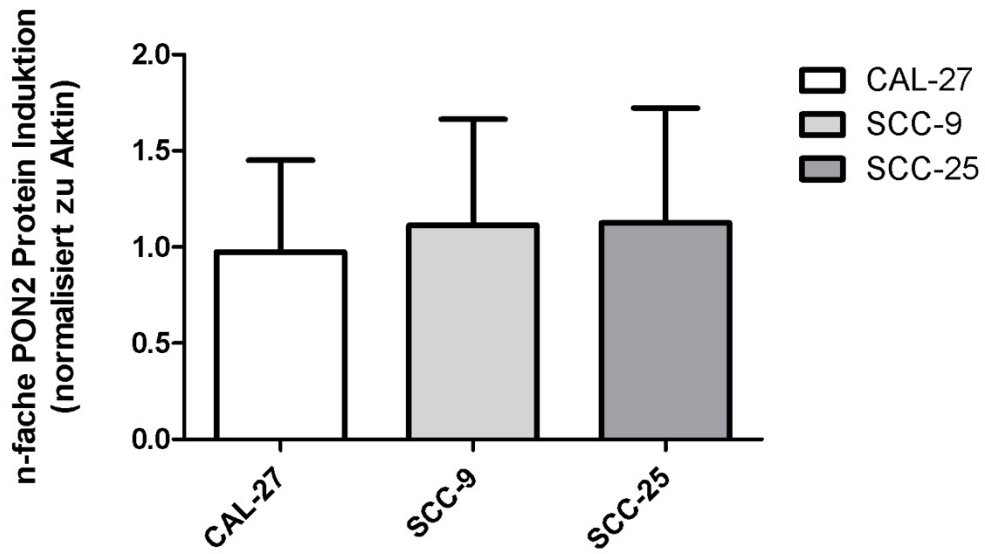
### 4.4.1 Analyse der PON2 Proteinexpression

Abbildung 14 zeigt den Western Blot der analysierten Zelllinien nach Inkubation mit 7,5 mM VPA (SCC-9) und 10 mM VPA (CAL-27, SCC-25), verglichen mit den unbehandelten Kontrollzelllinien. Die Relativierung erfolgte anhand von Aktin. Aufgrund der ähnlichen Signalstärke der Aktin-Banden kann von einer annähernd gleich aufgetragenen Proteinmenge ausgegangen werden. PON2 wird basal in den Tumorzellen exprimiert (siehe Kapitel 4.1). Die Banden von allen drei, mit VPA inkubierten Zelllinien zeigen keine stärkere Intensität als die unbehandelten Kontrollgruppen. Zur genaueren Bestimmung der PON2 Expression wurde die optische Dichte der Proteinbanden mittels *ImageJ* erfasst und die relative PON2 Proteinmenge im Vergleich zu Aktin berechnet. Abbildung 15 zeigt die relative PON2 Protein Induktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, normalisiert zu Aktin. Es kommt durch VPA bei CAL-27 (MW:  $1,082 \pm 0,8496$ ;  $p > 0,05$ ), SCC-9 (MW:  $1,714 \pm 1,641$ ;  $p > 0,05$ ) und bei SCC-25 (MW:  $0,6680 \pm 0,5756$ ;  $p > 0,05$ ) zu keinem Anstieg der PON2 Protein Induktion. Der Unterschied zur Kontrollgruppe war bei CAL-27 (MW:  $1,110 \pm 0,8431$ ;  $p > 0,05$ ), SCC-9 (MW:  $1,514 \pm 0,8717$ ;  $p > 0,05$ ) und SCC-25 (MW:  $0,5930 \pm 0,4801$ ;  $p > 0,05$ ) nicht signifikant.



**Abbildung 15: Western Blot der PON2 Proteinexpression nach Inkubation mit VPA**

Die Abbildung zeigt die PON2 Expression der Zelllinien CAL-27, SCC-9 und SCC-25 nach Inkubation mit VPA für 48 h und die Kontrollgruppe normalisiert zu Aktin. Es ist anhand der Intensität der Banden bei allen drei Zelllinien keine verstärkte PON2 Proteinexpression nach VPA Behandlung zu erkennen.

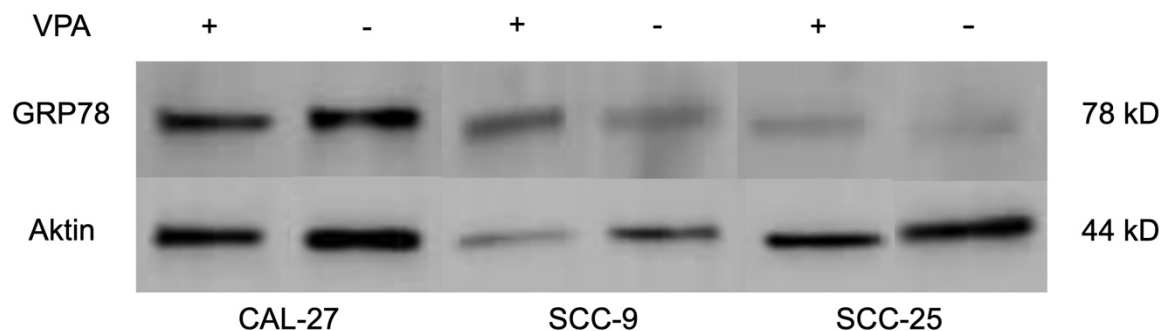


**Abbildung 16: PON2 Proteinexpression nach Inkubation mit VPA**

Die Messung der optischen Dichte der Proteinbanden zeigt, dass es durch die Inkubation der drei Zelllinien CAL-27, SCC-9 und SCC-25 mit VPA für 48 h zu keinem signifikanten Anstieg der PON2 Proteinexpression kommt ( $p > 0,05$ ). Die Expression wurde zu Aktin normalisiert.

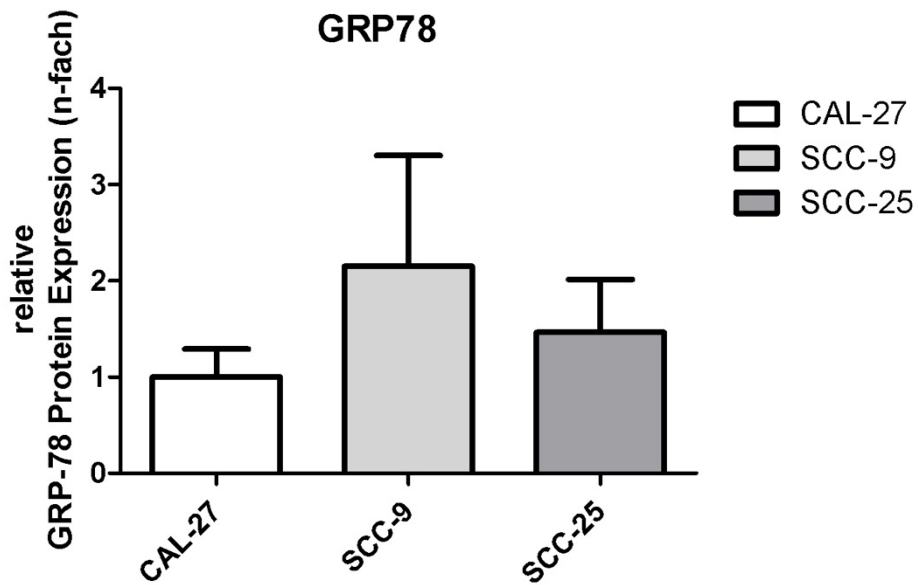
#### 4.4.2 Analyse der GRP78 Proteinexpression

Zur Überprüfung der Aktivierung des UPR-Signalwegs wurde die Proteinexpression von GRP78 mittels Western Blot analysiert. Abbildung 16 zeigt den Western Blot der analysierten Zelllinien nach Inkubation mit 7,5 mM VPA (SCC-9) und 10 mM VPA (CAL-27, SCC-25), verglichen mit den unbehandelten Kontrollzelllinien. Die Relativierung erfolgte anhand von Aktin. Die Konzentration der primären und sekundären Antikörper betrug für GRP78 1 : 1000 und für Aktin 1 : 5000. Aufgrund der ähnlichen Signalstärke der Aktin-Banden kann von einer annähernd gleich aufgetragenen Proteinmenge ausgegangen werden. Anhand der Grafik ist zu erkennen, dass es bei SCC-9 zu einer Zunahme der GRP78 Expression nach Inkubation mit VPA kommt. Zur genaueren Bestimmung der GRP78 Expression wurde die optische Dichte der Proteinbanden mittels *ImageJ* erfasst und die relative GRP78 Proteinmenge im Vergleich zu Aktin berechnet (Abbildung 17). Die Berechnung erfolgte mittels 1way-Anova ( $p < 0,05$ ). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von GRP78 nach Behandlung mit VPA im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $p > 0,05$ ). Allerdings wies die Zelllinie SCC-9 die höchste Expression von GRP78 auf verglichen mit CAL-27 und SCC-25.



**Abbildung 17: Western Blot der GRP78 Proteinexpression nach Inkubation mit VPA**

Zu sehen ist die Proteinexpression von GRP78 nach Inkubation mit VPA für 48 h. Die Expression wurde im Verhältnis zu Aktin gemessen. Aufgrund der ähnlich starken Intensität der Aktinbanden, ist eine verstärkte GRP78 Expression bei VPA-behandelten SCC-9 Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar.

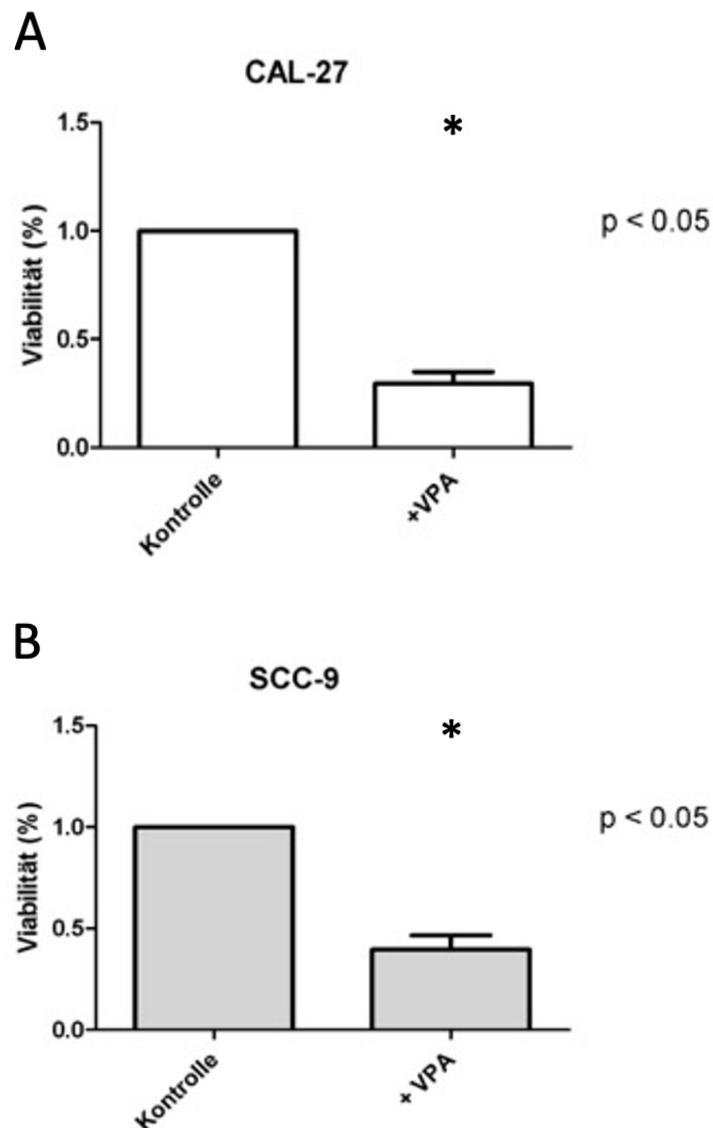


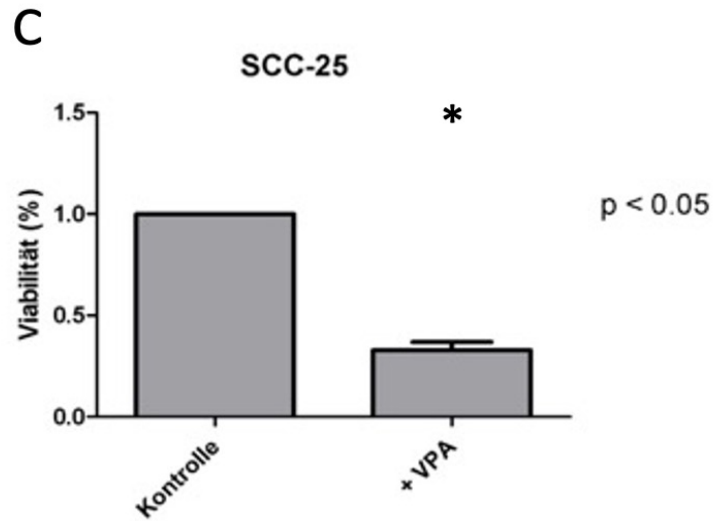
**Abbildung 18: GRP78 Proteinexpression nach Inkubation mit VPA**

Die Messung der optischen Dichte der Proteinbanden ergab keinen signifikanten Unterschied der GRP78 Proteinexpression nach Inkubation mit VPA für 48 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $p > 0,05$ ). SCC-9 zeigte jedoch eine doppelt so hohe GRP78 Expression nach VPA Behandlung. Die Expression in CAL-27 und SCC-25 war deutlich niedriger. Die Expression wurde zu Aktin normalisiert gemessen.

## 4.5 Ergebnisse Viabilitätsmessung

Um das Überleben der Tumorzellen nach VPA Behandlung zu quantifizieren, wurden alle drei Zelllinien für 48 h mit VPA inkubiert und eine Viabilitätsmessung mittels MTT-Assay durchgeführt. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis drei unabhängig voneinander durchgeführter Versuche (n=3). Die Zugabe von VPA wirkt sich negativ auf die Viabilität aller drei Zelllinien aus. Im Falle von CAL-27 zeigte die Kontrollgruppe (MW:  $0,8778 \pm 0,2126$ ;  $p < 0,05$ ) eine signifikant höhere Viabilität als die mit VPA behandelten Zellen (MW:  $0,3453 \pm 0,1565$ ;  $p < 0,05$ ). Auch bei SCC-9 Zellen führte die Zugabe von VPA zu einer signifikant niedrigeren Viabilität (MW:  $0,1618 \pm 0,04927$ ;  $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrolle (MW:  $0,3815 \pm 0,02536$ ;  $p < 0,05$ ). Die mit VPA inkubierten SCC-25 Zellen zeigten ebenfalls eine signifikant erniedrigte Viabilität (MW:  $0,1228 \pm 0,05152$ ;  $p < 0,05$ ), verglichen mit der Kontrollgruppe (MW:  $0,2912 \pm 0,07062$ ;  $p < 0,05$ ).



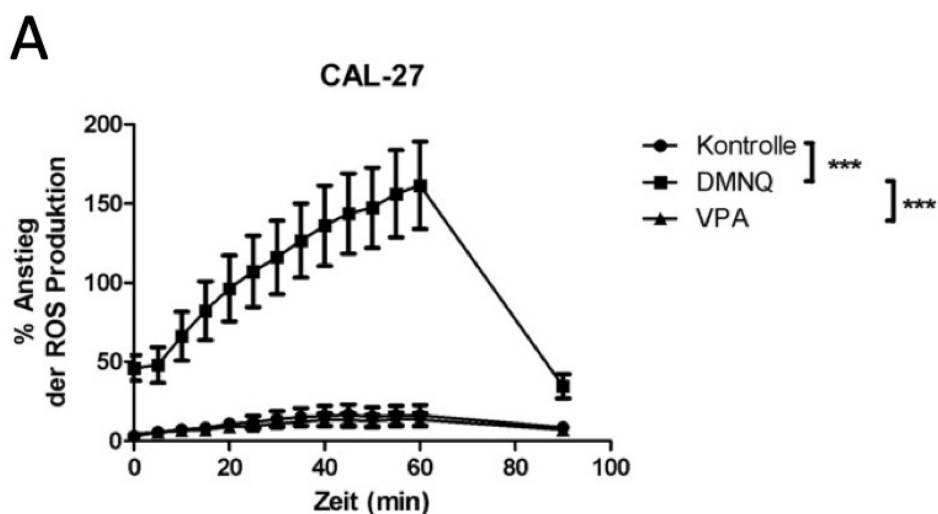


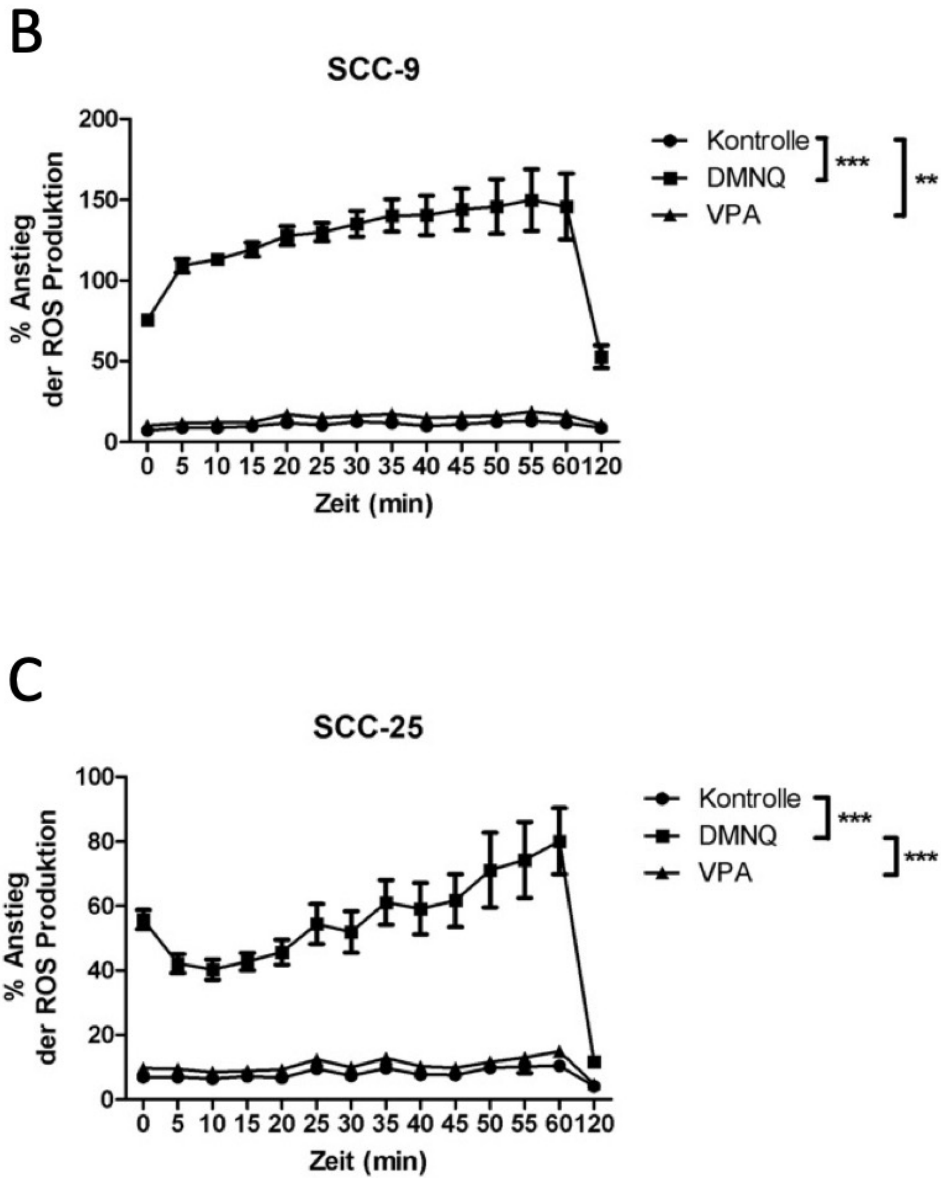
**Abbildung 19: Auswirkung von VPA auf die Zellviabilität**

Nach Inkubation mit VPA für 48 h zeigen die Zelllinien CAL-27 (A), SCC-9 (B) und SCC-25 (C) eine signifikant verminderte Viabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ).

## 4.6 Ergebnisse der intrazellulären ROS-Messung

Für die quantitative Bestimmung der intrazellulären ROS-Menge wurde das Luminolderivat L-012 genutzt. ROS reagieren mit L-012 wodurch Chemilumineszenz induziert wird. Diese wurde in Abständen von 5 min mit einem Fluometer gemessen. Ziel war es, den Einfluss von VPA auf die intrazelluläre ROS-Bildung zu untersuchen. Zum einen wurde die ROS Produktion durch Zugabe von VPA im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe gemessen. Zum anderen wurde eine weitere Kontrollgruppe mit DMNQ inkubiert. Dies induziert nachweislich ROS. Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (n=3). Die Berechnung erfolgte mittels 1way-ANOVA ( $p < 0,05$ ). Es kam in CAL-27 Zellen zu keinem signifikanten Anstieg der ROS-Spiegel bei Behandlung mit VPA im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $p > 0,05$ ). In den Zellen, die mit DMNQ behandelt wurden, war ein signifikanter Anstieg der ROS-Menge ( $p < 0,05$ ) im zeitlichen Verlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu den mit VPA behandelten Zellen zu beobachten. SCC-9 Zellen zeigten ein ähnliches Verhalten. Nach Behandlung mit VPA kam es zu keinem signifikanten Anstieg der ROS Produktion. DMNQ hingegen induzierte signifikant ROS ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe und den mit VPA inkubierten Zellen. Auch bei der Zelllinie SCC-25 zeigte sich keine signifikante Induktion von ROS durch VPA ( $p > 0,05$ ). DMNQ hingegen induzierte in SCC-25 signifikant ROS ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe und den mit VPA behandelten Zellen.





**Abbildung 20: Induktion von ROS durch VPA**

Nach Inkubation mit VPA wurde die Bildung von ROS für eine Stunde in Abständen von 5 min gemessen. In CAL-27 (A), SCC-9 (B) und SCC-25 (C) kommt es zu keiner Induktion von ROS durch VPA im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p > 0,05$ ). DMNQ hingegen induziert in allen drei Zelllinien signifikant ROS, verglichen mit der Kontrollgruppe und den VPA-behandelten Zellen ( $p < 0,05$ ).

## 5 Diskussion

### 5.1 Auswirkungen von Valproinsäure auf den Zellzyklus und die p21-Expression

Die Dysregulation des Zellzyklus stellt einen zentralen Punkt der Karzinogenese dar (4). Mitverantwortlich dafür ist eine gesteigerte Expression von Histon-Deacetylasen (HDAC). Deren vermehrte Expression korreliert bei malignen Tumoren mit fortgeschrittener Pathogenese und einer verschlechterten Prognose (5). HDAC wirken p21 antagonistisch entgegen, was zu einer unkontrollierten Zellproliferation führt (95). Die p21-Expression in Tumorzellen ist von klinischer Relevanz. Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, die erhöhte Werte p21 aufwiesen, hatten deutlich bessere Prognosen als Patienten mit niedrigen Werten (112). Der Einsatz von Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) erscheint daher sinnvoll, um eine therapeutische Erhöhung von p21 zu erreichen. So kann mittels körpereigener Regulationsmechanismen das Tumorwachstum gestoppt werden. In dieser Studie wurde VPA als HDACi eingesetzt und die Auswirkungen von VPA auf den Zellzyklus anhand der p21-Expression untersucht. Dies diente vor allem dazu, den Wirkungseintritt von VPA zu bestätigen. Da die Wirkung von VPA auf PON2 kaum untersucht ist, benötigten wir einen anderen Marker, um einen Wirkungseintritt verlässlich anzeigen zu können. Bei allen der drei verwendeten Zelllinien (SCC-9, CAL-27 und SCC-25) konnte eine signifikante Steigerung der p21-Expression durch VPA nachgewiesen werden (Kapitel 4.3). Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Studien, in denen die inhibitorische Wirkung von VPA auf das Zellwachstum von HNSCC-Zellen gezeigt werden konnte (13, 17). Gan et al. fanden heraus, dass es zu einer dosisabhängigen Steigerung der p21-Expression nach VPA-Behandlung kommt (17). Der Zellzyklus-Arrest wurde induziert, obwohl VPA deutlich geringer dosiert war als in der vorliegenden Studie. Die verwendeten VPA-Konzentrationen reichten von 0,25 mM bis 3 mM (17). Im Vergleich zur vorliegenden Studie zeigten sich also ein Zellzyklus-Arrest und eine p21-Expression bei VPA-Konzentrationen, die weniger als die Hälfte der von uns verwendeten betragen. Allerdings unterschieden sich auch die Zelllinien von den hier untersuchten. Neben SCC-15 wurden ORL-48, ORL-156, ORL-166, ORL-215, ORL-295N und ORL-310N Zelllinien untersucht (17). Die ORL-Zelllinien leiten sich wie SCC und CAL von Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches ab. Aufgrund dieser Abstammung ist zumindest eine gewisse Vergleichbarkeit möglich. Die Induktion von p21 durch VPA scheint aber nicht nur in Zelllinien von Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches eine Rolle zu spielen. Auch bei Zelllinien des multiformen Glioblastoms U87, GBM8401 und DBTRG-05MG GBM kam es zu einer dosisabhängigen p21-Expression nach Behandlung mit VPA (15). Die verwendeten Dosen betragen 5 mM, 10 mM und 20 mM. Erlich et al. untersuchten neben SCC-15 auch SCC-25 und CAL-27. Dort zeigte sich eine dosisabhängige p21-Expression bei

SCC-25 und CAL-27. Bei humanen Keratinozyten und SCC-15 konnte keine p21 Expression nachgewiesen werden (13). Bei SCC-25 und CAL-27 kam es bereits ab einer Konzentration von 3 mM VPA zur Expression von p21, die mit zunehmender Dosis anstieg (13). Bei der Versuchsreihe zur Bestimmung der spezifischen VPA-Konzentration, mit der alle weiteren Versuche durchgeführt wurden, konnte die dosisabhängige p21 Expression, bis auf eine Ausnahme, durch diese Arbeit bestätigt werden (Kapitel 4.2). Bei SCC-25 und CAL-27 wurde die höchste p21 Expression bei 10 mM VPA erreicht. Im Gegensatz dazu zeigte SCC-9 bei 7,5 mM VPA die stärkste p21 Expression. Hier muss erwähnt werden, dass die Induktion von p21 zur Bestimmung der Arbeitskonzentration auf Ebene der mRNA, nicht aber auf Proteinebene gemessen wurde. Bei den oben genannten Studien wurde die dosisabhängige p21 Expression stets auf Proteinebene mittels Western Blot ermittelt. Trotz dieses Unterschieds konnte in der vorliegenden Arbeit auch auf Proteinebene die Erhöhung der p21 Expression durch VPA in allen drei Zelllinien bestätigt und somit der Wirkungseintritt von VPA verifiziert werden. Unabhängig von der Zelllinie kommt es somit nach Behandlung von Tumorzellen mit VPA zu einem p21-induzierten Zellzyklusarrest. Die daraus resultierenden Möglichkeiten für die adjuvante Tumorthherapie werden im Folgenden diskutiert.

## 5.2 Auswirkung von Valproinsäure auf die Zellviabilität

Dass VPA in bestimmten Konzentrationen zytotoxisch wirkt, ist bereits seit längerer Zeit bekannt. Die vorliegende Studie konnte mittels MTT-Assay eine deutliche Verminderung der Zellviabilität nach Behandlung mit VPA nachweisen (Kapitel 4.5). Dabei war die Wirkung unabhängig von der Zelllinie. Sowohl CAL-27 als auch SCC-9 und SCC-25 reagierten mit einer signifikant verminderten Viabilität. Die vorliegende Arbeit bestätigt damit die Ergebnisse von Gan et al (17). Dies lässt vermuten, dass die inhibitorische Wirkung von VPA auf zwei Weisen zu Stande kommt: Zum einen über die gesteigerte Expression von p21 und dem damit einhergehenden Zellzyklus-Arrest. Zum anderen über eine direkte zytotoxische Wirkung, die ein Absinken der Zellviabilität zur Folge hat. Warum manche Zellen direkt absterben und manche nur in einen Zellzyklus Arrest übergehen muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Denkbar wäre, dass es innerhalb des Tumorzellverbandes Zellen gibt, die eine natürliche Resistenz gegenüber VPA aufweisen. Die bekannten Resistenzmechanismen sind vielfältig. Dazu gehören unter anderem ein gesteigerter Efflux und die Veränderung der Zielstruktur des Medikaments (1). Bei VPA liegt die Zielstruktur im aktiven Zentrum der HDAC. Durch kompetitive Hemmung unterbindet es die Aktivität der HDAC (97). Im Fall einer Resistenz wäre also eine Veränderung auf Ebene des aktiven Zentrums denkbar. Möglich wären Mutationen oder eine Änderung der Expression, die zu einer Veränderung auf molekularer Ebene führen. Als Grund für eine Resistenz von Tumorzellen gegenüber VPA ist ebenfalls ein gesteigerter Efflux denkbar. Dabei exprimiert die Zelle vermehrt Efflux-Pumpen, um VPA aus der Zelle auszuschleusen. Sie verhindert damit eine Akkumulation des Wirkstoffes, sodass keine toxische Wirkung eintritt. Hierfür ist häufig das Multidrug-Resistance-Protein 1 (MDR1) verantwortlich (152). In Zellen des Adenokarzinoms des Kolons konnte bereits gezeigt werden, dass durch längere Behandlung mit VPA eine Resistenz gegen VPA induziert wird (153). Der zugrundeliegende Mechanismus konnte dabei nicht erklärt werden. Die Resistenz erwies sich nämlich als unabhängig von MDR1. Fraglich ist, ob in der vorliegenden Arbeit tatsächlich von einer VPA-induzierten Resistenz ausgegangen werden kann. Die Inkubationszeit betrug immer 24 Stunden, wohingegen die resistenten Zellen des Kolonkarzinoms für 48 Stunden inkubiert wurden (153). Danach wurden sie noch weitere 6 Tage im Nährmedium gelagert, bis sie untersucht wurden. Die Zellen hatten somit viel länger Zeit, eine nachweisbare Resistenz zu entwickeln. Trotzdem ist im Falle unserer Arbeit auch eine Resistenz *a priori* nicht auszuschließen, die unabhängig von einer Behandlung mit VPA von vornherein besteht. Ob die Induktion von VPA-Resistenz durch VPA auch eine Rolle in Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms spielt und wie die grundlegenden Mechanismen dabei aussehen, wird in Zukunft untersucht werden müssen. Nichtsdestotrotz konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig eine direkt zytotoxische Wirkung von VPA auf die Zelllinien CAL-27, SCC-9 und SCC-25 nachgewiesen werden. VPA

bleibt daher auch weiterhin als potenzielles Therapeutikum in der adjuvanten Therapie interessant und rechtfertigt weitere Forschungsvorhaben in diese Richtung.

### 5.3 Auswirkung von Valproinsäure auf die Expression von Paraoxonase-2

Das Hauptaugenmerk dieser Versuche lag auf der Untersuchung von PON2. Da PON2 in verschiedenen Tumoren eine erhöhte Expressionsrate aufweist, stellt sie ein interessantes Forschungsobjekt für onkologische Fragestellungen dar. Beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, ist eine Korrelation zwischen erhöhter PON2 Expression und schlechterer Prognose für den Patienten zu beobachten (79). Es wurden in der Vergangenheit schon Versuche mit modifizierten HNSCC-Zellen durchgeführt, bei denen PON2 über- oder unterexprimiert wurde. Nach Upregulation waren HNSCC-Zellen resistent gegen Radiotherapie, wohingegen Zellen nach induziertem PON2-Knockdown ein deutlich schlechteres Überleben aufwiesen (10). Um ein besseres Ansprechen auf adjuvante Therapien zu erzielen, erscheint ein Knockdown von PON2 sinnvoll. Es stellt sich die Frage, welche Medikamente und Methoden dafür in Frage kommen. Valproinsäure wird seit Jahren erfolgreich in der Neurologie eingesetzt, wo es hauptsächlich der Behandlung von epileptischen Anfällen dient. Die Vorteile von VPA liegen auf der Hand: leichte Verfügbarkeit, gute Verträglichkeit und überschaubare Nebenwirkungen. Neben der oben beschriebenen Induktion von Zellzyklus-Arrest verbessert eine Kombination von VPA mit adjuvanten Therapeutika das Therapieansprechen deutlich (14, 103). Diese Studien untersuchen dabei allerdings nicht die Rolle von PON2. Die Wirkung von VPA auf PON2 ist bisher insgesamt wenig erforscht. Bei Zellen des multiformen Glioblastoms konnte eine Downregulation von PON2 durch VPA erzielt werden (15). In unserer Studie hingegen kam es zu keinem signifikanten Knockdown von PON2 durch VPA (Kapitel 4.4.1). Diese Diskrepanz zu bereits vorliegenden Studien könnte darin begründet sein, dass es sich um unterschiedliche Tumorarten handelt. Zellen des Glioblastoms könnten sich anders verhalten als Zellen des OSCC und PON2 könnte in den unterschiedlichen Zelllinien auf andere Weise reguliert werden. Auch waren die verwendeten VPA-Konzentrationen möglicherweise nicht ausreichend, um eine Downregulation von PON2 zu erzielen. Dagegen spricht allerdings, dass die Konzentrationen hoch genug waren, um Zellzyklus Arrest und eine verminderte Viabilität zu induzieren (Kapitel 4.3 und 4.5). Weiterhin wird in der Literatur von HNSCC-Zellen berichtet, deren Zellzyklus, beziehungsweise die p21 Expression, sich nach Abflachen der VPA-Wirkung wieder normalisiert (13). Ähnlich könnte es sich mit PON2 verhalten. Die PON2 Expression könnte sich kurzzeitig verringern, um danach jedoch wieder auf das basale Expressionsniveau anzusteigen. Dies könnte über Folgeversuche mit veränderten Untersuchungszeiträumen im Sinne verkürzter und prolongierter Zeitintervalle nach Inkubation mit VPA untersucht werden. Es wäre außerdem denkbar, dass es zu einer Auslese der VPA-sensitiven Zellen innerhalb des Tumorzellverbands kommt. Wie man an den Ergebnissen der Viabilitätsmessung erkennt (Kapitel 4.5), sterben viele Tumorzellen durch VPA ab. Allerdings überlebt auch ein gewisser Anteil. Dies könnte, wie bereits erörtert, an einer verminderten Sensitivität gegenüber VPA liegen.

Es wäre denkbar, dass es in den sterbenden Zellen zu einer verminderten PON2 Expression kommt, die für uns aber nicht mehr messbar ist. In den VPA-resistenten Zellen hingegen kommt es erst gar nicht zu einem PON2 Knockdown, da sie vorher die toxische Wirkung von VPA umgehen (Kapitel 5.2) und dadurch die PON2 Expression nicht signifikant vermindert ist (Kapitel 4.4.1). Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um diesen Fragen auf den Grund zu gehen.

## 5.4 Valproinsäure und die Induktion von oxidativem Stress

Es ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung einnehmen. Dabei sind ROS sowohl für die Entstehung des Tumors als auch für dessen Wachstumshemmung verantwortlich. Zum einen führt eine unphysiologisch hohe Menge an Radikalen zur Entstehung einer Neoplasie (63) und unterstützt die Tumorentwicklung (3). Zum anderen kommt es bei Überschreiten einer gewissen ROS-Menge, aufgrund der Induktion von Zellzyklus-Arrest, Seneszenz und Apoptose, zu einem Stopp des Tumorentstehens (3). Sowohl bei der Strahlentherapie als auch bei der Chemotherapie wird die therapeutische Wirkung durch die Produktion von Radikalen erzeugt (8, 66). Dass VPA eine inhibitorische Wirkung auf Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms hat, konnte in dieser Studie gezeigt werden (Kapitel 4.3 und 4.5). Hinsichtlich der Frage ob VPA auch bei der Entstehung von Radikalen eine Rolle spielt zeigten unsere Ergebnisse, dass VPA keine signifikante ROS-Induktion bei den von uns verwendeten Zelllinien hervorruft (Kapitel 4.6). Da die Entstehung von Radikalen üblicherweise eine Sofortreaktion ist, wurde deren Auftreten für eine Stunde direkt nach Zugabe von VPA untersucht. Es konnte in einer anderen Studie bereits gezeigt werden, dass 5 mM VPA in SCC-9 direkt nach Zugabe ROS induziert (154). Es wurden ebenfalls Reagenzien eingesetzt, die durch ROS oxidiert werden und mittels Fluoreszenz detektiert werden (154). Das grundsätzliche Vorgehen war also das gleiche wie in der vorliegenden Studie. Es stellt sich die Frage, wieso keine Induktion von ROS messbar war. Tseng et al. konnten bei Versuchen mit Zellen des multiformen Glioblastoms ebenfalls einen signifikanten Anstieg der ROS-Produktion nach Behandlung mit VPA zeigen (15). Die Inkubationszeit betrug dabei 24 und 48 Stunden. Die ROS-Produktion wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden stiegen ROS signifikant an, wobei nach 48 Stunden ein noch stärkerer Anstieg zu verzeichnen war (15). Die verwendeten VPA-Konzentrationen betrugen 5 mM und 10 mM. Möglicherweise wird VPA nicht sofort durch die Zelle verstoffwechselt. Dies würde erklären, wieso in der vorliegenden Arbeit kein Anstieg von ROS messbar war. Somit wäre eine Induktion von ROS zwar möglich, allerdings nicht in dem von uns untersuchten Zeitintervall, sondern erst danach. Weitere Versuche werden nötig sein, um diese Fragen zu klären.

## 5.5 Valproinsäure und die Induktion von Autophagie

Der intakte Autophagieprozess ist für das Überleben der Zelle obligat. Mittels Autophagie werden zum Beispiel überalterte Zellorganellen oder mutierte Proteine phagozytiert und abgebaut (23). Eine Dysregulation der Autophagie führt bekanntermaßen zu Erkrankungen wie Arteriosklerose oder Diabetes (140, 141). Physiologischerweise schützt eine intakte Autophagie also die Zelle vor Degeneration oder Entartung. Ist die Zelle jedoch bereits entartet und zu einer Tumorzelle mutiert, nutzt auch sie die Autophagie zu ihrem Schutz. Zum einen bietet sie der Tumorzelle eine alternative Energiequelle, zum anderen schützt sie diese vor Hypoxie und oxidativem Stress, der beispielsweise durch Chemo- und Strahlentherapie induziert wird (144). Studien zeigten, dass es bei oralen Plattenepithelkarzinomen zu einer gesteigerten Expression von LC3B kam, verglichen mit gesunder Mukosa (25). Bei malignen Erkrankungen scheint sich die Stärke der Autophagie negativ auf den Therapieerfolg bei adjuvanten Therapiemaßnahmen auszuwirken (155). Auf transkriptioneller Ebene zeigt die vorliegende Studie eine erhöhte Expression des Autophagiemarkers LC3B durch Inkubation mit VPA. CAL-27 und SCC-9 Zellen exprimierten nach Behandlung mit VPA signifikant höhere Mengen LC3B-mRNA, wohingegen es bei SCC-25 zu keinem signifikanten Anstieg kam (Kapitel 4.3). Wieso LC3B in SCC-25 nicht ansteigt, lässt sich aus den gewonnenen Daten nicht ableiten. Die Erhöhung in CAL-27 und SCC-9 nach Inkubation mit VPA deutet auf eine gesteigerte Autophagie hin, um die toxische Wirkung und den entstehenden Zellschaden zu kompensieren. LC3B könnte somit ein interessantes Ziel in der adjuvanten Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms sein. Es gibt bereits Studien, die eine Inhibition der Autophagie durch verschiedene Medikamente wie zum Beispiel 3-Methyladenin oder Wortmannin beschreiben (146). Es ist denkbar, dass zukünftig auch bei der Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms Inhibitoren der Autophagie eingesetzt werden.

## 5.6 Die Rolle von Caveolin-1

Caveolin-1 (CAV1) ist Bestandteil der Caveolae, flaschenförmigen Einstülpungen in der Plasmamembran. CAV1 ist unter anderem für die Mechanotransduktion in der Zelle verantwortlich, wobei physikalische Signale in intrazelluläre molekulare Prozesse umgewandelt werden (21). Des Weiteren spielt CAV1 eine wichtige Rolle beim Membrantransport und der Endozytose, ist aber auch an der Regulation des Calcium- und Lipidstoffwechsels beteiligt. Es ist also für die physiologische Funktion der Zelle unabdingbar. In der Onkologie nimmt CAV1 eine Sonderstellung ein, da es weder eindeutig den Tumorpromotoren noch eindeutig den Tumorsuppressoren zugeordnet werden kann. Man vermutet, dass CAV1 im Frühstadium der Tumorgenese als Tumorsuppressor fungiert und im zeitlichen Verlauf das Tumorstadium fördert, indem es antiapoptotisch wirkt (22). Weiterhin scheint die Expression von CAV1 mit der Resistenz gegen Chemotherapeutika vergesellschaftet zu sein. So zeigte sich in Gewebeproben des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus, dass eine höhere Expression von CAV1 mit einer stärker ausgeprägten multidrug resistance vergesellschaftet ist. In der vorliegenden Studie konnte für die Zelllinie SCC-9 eine signifikant verstärkte mRNA-Expression von CAV1 nach Behandlung mit VPA beobachtet werden (Kapitel 4.3). In den Zelllinien CAL-27 und SCC-9 kam es ebenfalls zu einem Anstieg, dieser ist jedoch nicht signifikant. Möglicherweise reagieren die Zellen auf das zytotoxische VPA mit einer erhöhten Expression von CAV1, um VPA aus der Zelle auszuschleusen. Bekanntermaßen ist verstärkter Efflux ein Eckpfeiler der Medikamentenresistenz in Tumorzellen (1). Ob dies mit der Expression von PON2 zusammenhängt, beziehungsweise ob die Expression von CAV1 und PON2 miteinander korreliert, muss in weiteren Studien untersucht werden.

## 5.7 Die Wirkung von Valproinsäure auf p27

Wie eingangs erläutert ist p27 ein Tumorsuppressor und ähnelt in seiner Funktion p21. Es ist ein universaler Inhibitor der CDKs und führt zu einem Zellzyklus-Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase (18). In proliferierenden Zellen ist p27 physiologischerweise erniedrigt, wohingegen es in ruhenden Zellen erhöht ist (116). Daher ist p27 auch innerhalb der Onkologie Gegenstand der Forschung. So ist eine niedrige Expression von p27 in malignen Tumoren mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet. So zum Beispiel bei Patienten, die an einem Nierenzellkarzinom erkrankt waren. Hier sind niedrige Werte p27 mit einem fortgeschrittenen TNM-Stadium assoziiert (117). Bei Patientinnen, die an Brustkrebs erkrankt waren, zeigten niedrigere Werte p27 eine verminderte krankheitsfreie Lebenszeit (119). In Tierversuchen führte ein Knockdown von p27 zu einem verstärkten Wachstum von Neoplasien der Mamma und der Speicheldrüsen (19). Es ist zu erkennen, dass p27 eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese zukommt. Wie aber verhält sich die p27 Expression dabei auf das Therapieansprechen? Dieser Frage wurde bereits nachgegangen. Plattenepithelkarzinome des Larynx und Hypopharynx wiesen bei hohen Werten an p27 ein verbessertes Ansprechen auf die Chemotherapeutika 5-Fluoruracil und Cisplatin auf (124). p27 zeigt also paradoxe Eigenschaften: Zum einen ist seine hohe Expression mit einer schlechteren Prognose verbunden. Zum anderen spricht der Tumor bei hohen Werten an p27 besser auf die adjuvante Therapie an. p27 scheint daher ein sinnvolles Target für die Tumorthherapie zu sein. Trichostatin A gehört, wie VPA, zu den HDACi. Wie VPA hemmt es die Zellproliferation und induziert Apoptose. Es wurde bereits gezeigt, dass Trichostatin A den Zellzyklus in der G1 Phase bei Zellen des Plattenepithelkarzioms des Ösophagus arretiert (125). Dies beruht auch auf der Induktion von p27. In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung von VPA auf die mRNA-Expression von p27 in den Zelllinien CAL-27, SCC-9 und SCC-25 untersucht (Kapitel 4.3). Dabei kommt es nur in SCC-25 Zellen zu einem signifikanten Anstieg der p27 Expression. Bei CAL-27 und SCC-9 war der Anstieg nicht signifikant. VPA scheint daher geeignet, neben p21, auch durch p27 einen Zellzyklus-Arrest zu induzieren. Ob und inwiefern die Expression von p21 und p27 korrelieren und ob die gleichzeitige Expression den Zellzyklus-Arrest verstärkt, muss noch geklärt werden.

## 5.8 Auswirkungen von Valproinsäure auf die Expression von GRP78

Das glucoseregulierte Protein 78 gehört zur Familie der Hitzeschockproteine (HSP). Als Chaperon ist es essenziell für die normale Funktion des ER. GRP78 sorgt dort für eine korrekte Faltung und Zusammensetzung der Proteine (26). Es ist dabei auch an der unfolded protein response (UPR) beteiligt. Fehlgefaltete Proteine lösen im ER eine *ER stress response* aus, die im äußersten Fall zum programmierten Zelltod führt (88). Der UPR ist mit Volkskrankheiten wie Morbus Parkinson und Arteriosklerose vergesellschaftet (88). Physiologischerweise scheint GRP78 also die Zelle zu schützen. Aktuelle Studien lassen allerdings vermuten, dass sich Tumorzellen diesen Schutz zunutze machen. So konnte in Zellen des Lungenkarzinoms eine vermehrte Expression von GRP78 gemessen werden, die mit einem fortgeschrittenen Tumorwachstum und einem schlechteren Differenzierungsgrad der Tumorzellen vergesellschaftet waren (149). GRP78 spielt offenbar auch eine entscheidende Rolle für das Ansprechen auf adjuvante Therapien. Der Knockdown von GRP78 in Gliomzellen führte zu einer verstärkten Induktion von Apoptose durch Chemotherapeutika (28). Es kam nach Knockdown zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber 5-Fluoruracil, wohingegen es bei Überexpression zu keinem Ansprechen der Tumorzellen auf 5-Fluoruracil kam. Auch sind bereits die Auswirkungen von VPA auf GRP78 untersucht worden. Shi et al. konnten zeigen, dass es in humanen embryonalen Nierenzellen nach Inkubation mit 1 mM VPA zu einer verstärkten Expression von GRP78 kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen keine signifikant veränderte Expression von GRP78 nach Inkubation mit VPA im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nachgewiesen werden, obwohl die Expression in SCC-9 Zellen doppelt so hoch war wie die der unbehandelten Kontrollgruppe (Kapitel 4.2.2). Es ist denkbar, dass die GRP78 Konzentration in den von uns verwendeten Zellen grundsätzlich erhöht ist. Hier wäre ein Vergleich mit anderen Zellen, beispielsweise Fibroblasten, sicher sinnvoll. Horke et al. konnten bereits zeigen, dass durch Aktivierung des UPR-Signalwegs neben GRP78 auch die Expression von PON2 induziert wird (29). Die fehlende Induktion von GRP78 und PON2 in der vorliegenden Arbeit erscheinen somit zumindest schlüssig. Dabei ist unklar, wieso es zu keiner Aktivierung des UPR-Signalwegs durch VPA in der hier durchgeführten Studie kam. Unabhängig davon lässt die aktuelle Studienlage vermuten, dass GRP78 aufgrund seiner Funktion und Überexpression in Tumorzellen einen Angriffspunkt für die adjuvante Therapie darstellen könnte. Über einen Eingriff in den UPR-Signalweg mit Aktivierung der proapoptotischen Subsignalwege könnte ein verbessertes Ansprechen auf Chemo- und Radiotherapie herbeiführbar sein, wenn die UPR-Aktivierung letztlich zugunsten der proapoptotischen Stimuli münden würde. Auch dieser Ansatz bleibt für künftige Versuchsreihen spannend.

## 5.9 Valproinsäure und PON2 in der adjuvanten Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms

Nach wie vor sind chirurgische Tumorentfernung, oftmals in Kombination mit einer Radio-(chemo)therapie die Maßnahmen der Wahl, um das orale Plattenepithelkarzinom zu behandeln (51). Dabei werden sie allein oder in Kombination eingesetzt. Trotz dieser Bandbreite an Behandlungsmöglichkeiten liegt die 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 50 % und 60 % (7). Es müssen daher unterstützende Maßnahmen gefunden werden, um die Wirkung der einzelnen Therapien zu verbessern. Die Erkenntnisse dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass HDACi wie VPA in das Therapieregime des oralen Plattenepithelkarzinoms mit einbezogen werden können. VPA ist in der Vergangenheit bereits in Kombination mit Chemo- und Radiotherapie eingesetzt worden. Im Gegensatz zu anderen HDACi zeigt VPA eine gute Verträglichkeit bei therapeutischer Dosierung. Zusammen mit VPA zeigten sowohl Cisplatin als auch Cetuximab synergistische antiproliferative und proapoptotische Eigenschaften bei Kopf-Hals-Karzinomen (14). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Zelllinien des ösophagealen Plattenepithelkarzinoms durch die Verbindung von VPA und Bestrahlung erzielt. VPA verstärkte die apoptotische Wirkung der Strahlung und verbessert somit das Therapieansprechen adjuvanter Therapieformen (103). Gerade im Rahmen einer Radiotherapie könnte VPA eine sinnvolle Ergänzung sein, da nur maligne Zellen erreicht werden, die im Feld der ionisierenden Strahlung liegen. VPA hingegen gelangt systemisch auch zu Tumorzellen, die nicht im direkten Strahlenfeld liegen. Unter den HDACi scheint VPA besonders gut geeignet, da es seit Jahren in der Neurologie eingesetzt wird. Bei einer Behandlung mit VPA kommt es weder zu starken Nebenwirkungen, noch ist die Anwendung besonders kompliziert. Dies ist ein wichtiger Umstand, da die Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms bereits mit einer massiven Einschränkung der Lebensqualität vergesellschaftet ist (11). Besonders in einem palliativen Setting kann dies von Vorteil sein. Gerade bei inoperablen Tumoren könnte VPA aufgrund seiner antiproliferativen Wirkung gegebenenfalls helfen, die Tumorprogression zu verlangsamen. Die von uns gezeigte proapoptotische (Kapitel 4.5) und wachstumshemmende Wirkung (Kapitel 4.3) wurde bereits bei geringen Dosen VPA erreicht. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass menschliche Fibroblasten nicht von der toxischen Wirkung betroffen waren (14). Hier werden jedoch weitere Untersuchungen nötig sein um dies genauer zu untersuchen. Möglicherweise könnte der Einsatz von VPA auch zu einer besseren Verträglichkeit von Radio- und Chemotherapie führen, indem man die Strahlendosis beziehungsweise die Konzentration verringern kann, im Sinne einer Deeskalation des Therapieregimes. Diese sind häufig mit massiven Nebenwirkungen vergesellschaftet und verringern die Lebensqualität der Patienten dramatisch (156). VPA könnte unterstützend in der adjuvanten Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen ein-

gesetzt werden, um Zytostatikaresistenzen auszuhebeln. So zeigten Retinoid-resistente leukämische Zellen eine Resensibilisierung für Retinsäure durch Behandlung mit HDACi (157). Jedoch bleibt die Frage offen, inwiefern PON2 dabei eine Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Abfall der PON2 Expression festgestellt werden. Dies gilt sowohl für mRNA (Kapitel 4.3) als auch auf Proteinebene (Kapitel 4.4.1). Die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies ist ein zentraler Wirkmechanismus der adjuvanten Therapien. Chemo- und Strahlentherapie führen nachweislich zu erhöhten intrazellulären Mengen ROS und wirken so zytotoxisch (8, 66). Antioxidativ wirkende Enzyme wie PON2 neutralisieren diese Radikale. In einer Studie konnte bei Glioblastomzellen ein Knockdown von PON2 und eine Induktion von ROS mittels VPA erzeugt werden (15). Bei unseren Versuchen konnten wir diese Wirkung jedoch nicht bestätigen. Es kam weder zu einem Abfall der PON2 Expression (Kapitel 4.4.1), noch zum Anstieg von ROS (Kapitel 4.6) Die möglichen Gründe sind hier bereits dargestellt worden (Kapitel 5.3 und 5.4). Trotzdem sollte PON2 weiterhin als „Target“ für die Tumorthherapie angesehen werden. Ein Ausschalten von PON2 führte bei verschiedenen Tumorzellen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber adjuvanten Therapiemaßnahmen (10, 82, 86). Auch wenn die VPA-Behandlung bei unseren Versuchen nicht zum PON2-Knockdown führte, so ist die Wirkung auf Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms insgesamt als vielversprechend zu bewerten. Zum einen sorgte VPA für einen Zellzyklus-Arrest mit erhöhter Expression von p21 (Kapitel 4.3). Dies würde zu einer verzögerten Progression des Tumorwachstums führen. Zum anderen wirkt VPA zytotoxisch und tötet Tumorzellen direkt, was durch die Messung der Zellviabilität gezeigt werden konnte (Kapitel 4.5). Diese Ergebnisse wurden in vitro allein durch die Behandlung mit VPA und ohne den Einsatz von Chemotherapeutika oder einer Bestrahlung erzielt. VPA könnte daher in Zukunft bei der adjuvanten Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen, insbesondere dem oralen Plattenepithelkarzinom, eingesetzt werden. Allerdings werden dafür noch weitere experimentelle und klinische Studien notwendig sein.

## 6 Zusammenfassung

Das orale Plattenepithelkarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Mundhöhle und steht weltweit an sechster Stelle aller Malignome (6). Trotz multidisziplinärer Therapiekonzepte aus chirurgischer Resektion, Chemo- und Strahlentherapie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate geschlechterabhängig zwischen 50 % und 60 % (7). Chemo- und Strahlentherapie basieren unter anderem auf der Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies, die eine irreversible Schädigung der Zelle und den Zelltod zur Folge haben (8). Oftmals kommt es durch eine Anpassung des Tumorstoffwechsels zum Versagen der adjuvanten Therapieformen (1). Daher ist in den letzten Jahren die Suche nach neuen unterstützenden Maßnahmen intensiviert worden.

Das körpereigene Enzym Paraoxonase-2 (PON2) ist für seine antiapoptotischen und antiinflammatorischen Eigenschaften bekannt, indem es reaktive Sauerstoffspezies eliminiert (9). Es zeigt sich jedoch, dass es in Tumorzellen zu einer Upregulation dieses Enzyms kommt (79). Dies ist ein Grund für die Entgleisung des Zellwachstums. Außerdem können Tumorzellen so die therapieinduzierte Apoptose durch ROS umgehen. In vitro zeigten Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms mit erhöhten Werten von PON2 ein schlechteres Ansprechen auf die adjuvante Bestrahlung (10).

Valproinsäure (VPA) wird seit vielen Jahren erfolgreich als Neuroleptikum in der Medizin eingesetzt (12). Es zeichnet sich durch eine gute Verfügbarkeit und Verträglichkeit aus. Es konnte bereits in Studien gezeigt werden, dass VPA auf Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms eine wachstumshemmende und proapoptotische Wirkung hat (13). In Studien wurde VPA bereits erfolgreich in Kombination mit Cisplatin und Cetuximab eingesetzt, was zu einem verbesserten Therapieansprechen der Tumorzellen führte (14). In Zellen des multiformen Glioblastoms führte VPA außerdem zu einer Downregulation von PON2 (15).

Diese Arbeit hatte zum Ziel, eine mögliche Downregulation von PON2 in Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms durch VPA zu untersuchen. Die Versuche konnten eine solche Wirkung nicht bestätigen. Es kam durch die Behandlung mit VPA in CAL-27, SCC-9 und SCC-25 zu keiner signifikanten Veränderung der PON2 Expression. Allerdings wurde die Wachstumshemmung der Tumorzellen bestätigt. Es kam in allen drei Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg von p21 und einem Zellzyklus-Arrest. Des Weiteren zeigten die Zellen durch Behandlung mit VPA eine verminderte Viabilität. Die Ergebnisse zeigen, dass VPA erfolgreich das Wachstum der Zellen inhibiert und zusätzlich zytotoxisch wirkt. VPA könnte daher in Zukunft zu einer wichtigen Säule der adjuvanten Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms werden. Zusätzlich konnte über den Autophagiemarker LC3B eine verstärkte Autophagie nach Behandlung mit VPA nachgewiesen werden. Die Hemmung der Autophagie könnte in Zukunft ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms spielen.

Die aktuelle Studienlage zeigt wie wichtig PON2 in Bezug auf Tumorprogression und Therapieresistenz ist, auch wenn in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss von VPA auf die Expression nachgewiesen werden konnte. Weitere Studien werden erforderlich sein, um die Bedeutung von PON2 therapeutisch nutzbar zu machen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*. 2014;6(3):1769-92.
2. Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol*. 2011;2011:603740.
3. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*. 2010;44(5):479-96.
4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
5. Li Y, Seto E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(10).
6. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):309-16.
7. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J, et al. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Robert Koch-Institut; 2021. p. 172.
8. Yang H, Villani RM, Wang H, Simpson MJ, Roberts MS, Tang M, et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):266.
9. Furlong CE, Marsillach J, Jarvik GP, Costa LG. Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? *Chem Biol Interact*. 2016;259(Pt B):51-62.
10. Krüger M, Pabst AM, Al-Nawas B, Horke S, Moergel M. Paraoxonase-2 (PON2) protects oral squamous cell cancer cells against irradiation-induced apoptosis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141(10):1757-66.
11. Viana TSA, Silva PGB, Pereira KMA, Mota MRL, Alves A, de Souza EF, et al. Prospective Evaluation of Quality of Life in Patients Undergoing Primary Surgery for Oral

Cancer: Preoperative and Postoperative Analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(8):2093-100.

12. Rahman M, Nguyen H. Valproic Acid. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.

13. Erlich RB, Rickwood D, Coman WB, Saunders NA, Guminski A. Valproic acid as a therapeutic agent for head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;63(3):381-9.

14. Iannelli F, Zotti AI, Roca MS, Grumetti L, Lombardi R, Moccia T, et al. Valproic Acid Synergizes With Cisplatin and Cetuximab in vitro and in vivo in Head and Neck Cancer by Targeting the Mechanisms of Resistance. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:732.

15. Tseng JH, Chen CY, Chen PC, Hsiao SH, Fan CC, Liang YC, et al. Valproic acid inhibits glioblastoma multiforme cell growth via paraoxonase 2 expression. *Oncotarget.* 2017;8(9):14666-79.

16. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* 1993;366(6456):701-4.

17. Gan CP, Hamid S, Hor SY, Zain RB, Ismail SM, Wan Mustafa WM, et al. Valproic acid: growth inhibition of head and neck cancer by induction of terminal differentiation and senescence. *Head Neck.* 2012;34(3):344-53.

18. Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell.* 1994;78(1):67-74.

19. Jackson RJ, Adnane J, Coppola D, Cantor A, Sefti SM, Pledger WJ. Loss of the cell cycle inhibitors p21(Cip1) and p27(Kip1) enhances tumorigenesis in knockout mouse models. *Oncogene.* 2002;21(55):8486-97.

20. Williams TM, Lisanti MP. The caveolin proteins. *Genome Biol.* 2004;5(3):214.

21. Tietze S, Hofmann A, Wolk S, Reeps C. Grundlagen der zellulären Mechanotransduktion. *Gefässchirurgie*. 2020;25(4):244-8.
22. Shatz M, Liscovitch M. Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer. *Int J Radiat Biol*. 2008;84(3):177-89.
23. Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature*. 2010;466(7302):68-76.
24. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006;10(1):51-64.
25. Liu JL, Chen FF, Lung J, Lo CH, Lee FH, Lu YC, et al. Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2014;111(5):944-54.
26. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci*. 2019;226:156-63.
27. Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(9):2307-16.
28. Pyrko P, Schönthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res*. 2007;67(20):9809-16.
29. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Krüger M, Strand D, Förstermann U. Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation*. 2007;115(15):2055-64.
30. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.

31. Heron M, Anderson RN. Changes in the Leading Cause of Death: Recent Patterns in Heart Disease and Cancer Mortality. *NCHS Data Brief*. 2016(254):1-8.
32. Zivile G, Janina D, Irina M, Saulius C, Raisa S, Aliaksandr Z. Prevalence of human papillomaviruses in patients with head and neck squamous cell carcinoma in Lithuania and Belarus. *Journal of Medical Virology*. 2014;86(3):531-5.
33. Wong T, Wiesenfeld D. Oral Cancer. *Australian Dental Journal*. 2018;63(S1):S91-S9.
34. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2008;122(1):155-64.
35. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*. 1988;48(11):3282-7.
36. Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer*. 2013;4(1):66-83.
37. Reidy J, McHugh E, Stassen LF. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon*. 2011;9(5):278-83.
38. Gupta PC, Murti PR, Bhonsle RB. Epidemiology of cancer by tobacco products and the significance of TSNA. *Crit Rev Toxicol*. 1996;26(2):183-98.
39. Tanaka TI, Alawi F. Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *Dent Clin North Am*. 2018;62(1):111-20.
40. Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol*. 2017;28(10):2386-98.
41. Valls-Ontañón A, Hernández-Losa J, Somoza Lopez de Haro R, Bellosillo-Paricio B, Ramón YCS, Bescós-Atín C, et al. Impact of human papilloma virus in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Med Clin (Barc)*. 2019;152(5):174-80.

42. Sritipho T, Pongsirivet S, Lertprasertsuke N, Buddhachat K, Sastraruji T, Iamaroon A. p16 - a Possible Surrogate Marker for High-Risk Human Papillomaviruses in Oral Cancer? *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(8):4049-57.
43. Huang J, He B, Chen F, Liu F, Yan L, Hu Z, et al. [Association between oral hygiene, chronic diseases, and oral squamous cell carcinoma]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2015;49(8):688-92.
44. Chung CH, Yang YH, Wang TY, Shieh TY, Warnakulasuriya S. Oral precancerous disorders associated with areca quid chewing, smoking, and alcohol drinking in southern Taiwan. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(8):460-6.
45. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
46. Califano J, Westra WH, Meininger G, Corio R, Koch WM, Sidransky D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res.* 2000;6(2):347-52.
47. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996;56(11):2488-92.
48. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002;52(4):195-215.
49. Silverman S, Jr., Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer.* 1984;53(3):563-8.
50. Shafer WG, Waldron CA. Erythroplakia of the oral cavity. *Cancer.* 1975;36(3):1021-8.
51. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.0, 2021, AWMF Registernummer: 007/100OL. 2021;3.0.

52. Oba MK, Innocentini L, Viani G, Ricz HMA, de Carvalho Reis T, Ferrari TC, et al. Evaluation of the correlation between side effects to oral mucosa, salivary glands, and general health status with quality of life during intensity-modulated radiotherapy for head and neck cancer. *Support Care Cancer*. 2021;29(1):127-34.
53. Lalla RV, Treister N, Sollecito T, Schmidt B, Patton LL, Mohammadi K, et al. Oral complications at 6 months after radiation therapy for head and neck cancer. *Oral Dis*. 2017;23(8):1134-43.
54. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2007;357(17):1695-704.
55. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, Mickiewicz E, Winkquist E, Gorbounova V, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2007;357(17):1705-15.
56. Pignon JP, le Maître A, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol*. 2009;92(1):4-14.
57. Mehra R, Cohen RB, Burtness BA. The role of cetuximab for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2008;6(10):742-50.
58. Hua X, Chi W, Su L, Li J, Zhang Z, Yuan X. ROS-induced Oxidative Injury involved in Pathogenesis of Fungal Keratitis via p38 MAPK Activation. *Sci Rep*. 2017;7(1):10421.
59. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*. 2005;122(2):221-33.
60. Sardaro N, Della Vella F, Incalza MA, D DIS, Lucchese A, Contaldo M, et al. Oxidative Stress and Oral Mucosal Diseases: An Overview. *In Vivo*. 2019;33(2):289-96.

61. Dikalov S, Itani H, Richmond B, Vergeade A, Rahman SMJ, Boutaud O, et al. Tobacco smoking induces cardiovascular mitochondrial oxidative stress, promotes endothelial dysfunction, and enhances hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019;316(3):H639-h46.
62. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015;30(1):11-26.
63. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*. 2004;266(1-2):37-56.
64. Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(8):599-612.
65. Marullo R, Werner E, Degtyareva N, Moore B, Altavilla G, Ramalingam SS, et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One*. 2013;8(11):e81162.
66. Ogawa Y, Kobayashi T, Nishioka A, Kariya S, Hamasato S, Seguchi H, et al. Radiation-induced reactive oxygen species formation prior to oxidative DNA damage in human peripheral T cells. *Int J Mol Med*. 2003;11(2):149-52.
67. Aggarwal V, Tuli HS, Varol A, Thakral F, Yerer MB, Sak K, et al. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules*. 2019;9(11).
68. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*. 1996;33(3):498-507.
69. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free radical biology & medicine*. 2005;38(2):153-63.
70. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, et al. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable

of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(48):44444-9.

71. Rajkovic MG, Rumora L, Barisic K. The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. *Biochem Med (Zagreb)*. 2011;21(2):122-30.

72. Devarajan A, Bourquard N, Hama S, Navab M, Grijalva VR, Morvardi S, et al. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(3):341-51.

73. Hagmann H, Kuczkowski A, Ruehl M, Lamkemeyer T, Brodesser S, Horke S, et al. Breaking the chain at the membrane: paraoxonase 2 counteracts lipid peroxidation at the plasma membrane. *Faseb j*. 2014;28(4):1769-79.

74. Altenhöfer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Pautz A, Li H, et al. One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity. *J Biol Chem*. 2010;285(32):24398-403.

75. Horke S, Witte I, Altenhöfer S, Wilgenbus P, Goldeck M, Förstermann U, et al. Paraoxonase 2 is down-regulated by the *Pseudomonas aeruginosa* quorumsensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone and attenuates oxidative stress induced by pyocyanin. *Biochem J*. 2010;426(1):73-83.

76. Teiber JF, Horke S, Haines DC, Chowdhary PK, Xiao J, Kramer GL, et al. Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun*. 2008;76(6):2512-9.

77. Levy D, Reichert CO, Bydlowski SP. Paraoxonases Activities and Polymorphisms in Elderly and Old-Age Diseases: An Overview. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(5).

78. Devarajan A, Shih D, Reddy ST. Inflammation, infection, cancer and all that...the role of paraoxonases. *Adv Exp Med Biol*. 2014;824:33-41.

79. Shakhparonov MI, Antipova NV, Shender VO, Shnaider PV, Arapidi GP, Pestov NB, et al. Expression and Intracellular Localization of Paraoxonase 2 in Different Types of Malignancies. *Acta Naturae*. 2018;10(3):92-9.
80. Devarajan A, Su F, Grijalva V, Yalamanchi M, Yalamanchi A, Gao F, et al. Paraoxonase 2 overexpression inhibits tumor development in a mouse model of ovarian cancer. *Cell Death Dis*. 2018;9(3):392.
81. Nagarajan A, Dogra SK, Sun L, Gandotra N, Ho T, Cai G, et al. Paraoxonase 2 Facilitates Pancreatic Cancer Growth and Metastasis by Stimulating GLUT1-Mediated Glucose Transport. *Mol Cell*. 2017;67(4):685-701.e6.
82. Fumarola S, Cecati M, Sartini D, Ferretti G, Milanese G, Galosi AB, et al. Bladder Cancer Chemosensitivity is Affected by Paraoxonase-2 Expression. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(2).
83. Wang X, Xu G, Zhang J, Wang S, Ji M, Mo L, et al. The clinical and prognostic significance of paraoxonase-2 in gastric cancer patients: immunohistochemical analysis. *Hum Cell*. 2019;32(4):487-94.
84. Bacchetti T, Salvolini E, Pompei V, Campagna R, Molinelli E, Brisigotti V, et al. Paraoxonase-2: A potential biomarker for skin cancer aggressiveness. *Eur J Clin Invest*. 2020:e13452.
85. Witte I, Altenhöfer S, Wilgenbus P, Amort J, Clement AM, Pautz A, et al. Beyond reduction of atherosclerosis: PON2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells. *Cell Death Dis*. 2011;2(1):e112.
86. Campagna R, Bacchetti T, Salvolini E, Pozzi V, Molinelli E, Brisigotti V, et al. Paraoxonase-2 Silencing Enhances Sensitivity of A375 Melanoma Cells to Treatment with Cisplatin. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(12).
87. Herceg Z. Epigenetic information in chromatin and cancer. *Eur J Cancer*. 2009;45 Suppl 1:442-4.

88. Müller-Esterl W. Biochemie : eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. 2. Aufl. ed. Heidelberg 2011.
89. Gregoretta IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol.* 2004;338(1):17-31.
90. Minamiya Y, Ono T, Saito H, Takahashi N, Ito M, Mitsui M, et al. Expression of histone deacetylase 1 correlates with a poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2011;74(2):300-4.
91. Minamiya Y, Ono T, Saito H, Takahashi N, Ito M, Motoyama S, et al. Strong expression of HDAC3 correlates with a poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung. *Tumour Biol.* 2010;31(5):533-9.
92. Fritsche P, Seidler B, Schüler S, Schnieke A, Göttlicher M, Schmid RM, et al. HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. *Gut.* 2009;58(10):1399-409.
93. Weichert W, Röske A, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, et al. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *Br J Cancer.* 2008;98(3):604-10.
94. Yamaguchi T, Cubizolles F, Zhang Y, Reichert N, Kohler H, Seiser C, et al. Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression. *Genes Dev.* 2010;24(5):455-69.
95. Zupkovitz G, Grausenburger R, Brunmeir R, Senese S, Tischler J, Jurkin J, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is a crucial target for histone deacetylase 1 as a regulator of cellular proliferation. *Mol Cell Biol.* 2010;30(5):1171-81.
96. Senese S, Zaragoza K, Minardi S, Muradore I, Ronzoni S, Passafaro A, et al. Role for histone deacetylase 1 in human tumor cell proliferation. *Mol Cell Biol.* 2007;27(13):4784-95.

97. Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*. 1999;401(6749):188-93.
98. Mei S, Ho AD, Mahlknecht U. Role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer (Review). *Int J Oncol*. 2004;25(6):1509-19.
99. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo j*. 2001;20(24):6969-78.
100. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem*. 2001;276(39):36734-41.
101. Balbi A, Sottofattori E, Mazzei M, Sannita WG. Study of bioequivalence of magnesium and sodium valproates. *J Pharm Biomed Anal*. 1991;9(4):317-21.
102. Lee SH, Nam HJ, Kang HJ, Samuels TL, Johnston N, Lim YC. Valproic acid suppresses the self-renewal and proliferation of head and neck cancer stem cells. *Oncol Rep*. 2015;34(4):2065-71.
103. Shoji M, Ninomiya I, Makino I, Kinoshita J, Nakamura K, Oyama K, et al. Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, enhances radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2012;40(6):2140-6.
104. Diyabalanage HV, Granda ML, Hooker JM. Combination therapy: histone deacetylase inhibitors and platinum-based chemotherapeutics for cancer. *Cancer Lett*. 2013;329(1):1-8.
105. He Y, Chen D, Yi Y, Zeng S, Liu S, Li P, et al. Histone Deacetylase Inhibitor Sensitizes ERCC1-High Non-small-Cell Lung Cancer Cells to Cisplatin via Regulating miR-149. *Mol Ther Oncolytics*. 2020;17:448-59.

106. Dutto I, Tillhon M, Cazzalini O, Stivala LA, Prosperi E. Biology of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A): molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Arch Toxicol.* 2015;89(2):155-78.
107. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992;358(6381):15-6.
108. Die Onkologie : Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie. In: Hiddemann W, Bartram CR, editors. 2nd ed. 2010 ed. Berlin, Heidelberg 2010.
109. Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, et al. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(8):4291-6.
110. Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(8):639-49.
111. Mohamed S, Yasufuku K, Hiroshima K, Nakajima T, Yoshida S, Suzuki M, et al. Prognostic implications of cell cycle-related proteins in primary resectable pathologic N2 nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2007;109(12):2506-14.
112. Shiozaki A, Nakashima S, Ichikawa D, Fujiwara H, Konishi H, Komatsu S, et al. Prognostic significance of p21 expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2013;33(10):4329-35.
113. Lincet H, Poulain L, Remy JS, Deslandes E, Duigou F, Gauduchon P, et al. The p21(cip1/waf1) cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2000;161(1):17-26.
114. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med.* 2002;8(10):1145-52.
115. Ale-Agha N, Goy C, Jakobs P, Spyridopoulos I, Gonnissen S, Dyballa-Rukes N, et al. CDKN1B/p27 is localized in mitochondria and improves respiration-dependent processes in

the cardiovascular system-New mode of action for caffeine. *PLoS Biol.* 2018;16(6):e2004408.

116. Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol.* 2000;183(1):10-7.

117. Migita T, Oda Y, Naito S, Tsuneyoshi M. Low expression of p27(Kip1) is associated with tumor size and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Cancer.* 2002;94(4):973-9.

118. Kouvaraki M, Gorgoulis VG, Rassidakis GZ, Liodis P, Markopoulos C, Gogas J, et al. High expression levels of p27 correlate with lymph node status in a subset of advanced invasive breast carcinomas: relation to E-cadherin alterations, proliferative activity, and ploidy of the tumors. *Cancer.* 2002;94(9):2454-65.

119. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med.* 1997;3(2):227-30.

120. Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, Samson E, Bink K, Höfler H, et al. Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(42):15558-63.

121. Wang Z, Sturgis EM, Zhang F, Lei D, Liu Z, Xu L, et al. Genetic variants of p27 and p21 as predictors for risk of second primary malignancy in patients with index squamous cell carcinoma of head and neck. *Mol Cancer.* 2012;11:17.

122. Kibel AS, Suarez BK, Belani J, Oh J, Webster R, Brophy-Ebbers M, et al. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(9):2033-6.

123. Zhuang Y, Yin HT, Yin XL, Wang J, Zhang DP. High p27 expression is associated with a better prognosis in East Asian non-small cell lung cancer patients. *Clin Chim Acta.* 2011;412(23-24):2228-31.

124. Moreno-Galindo C, Hermsen M, García-Pedrero JM, Fresno MF, Suárez C, Rodrigo JP. p27 and BCL2 expression predicts response to chemotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2014;50(2):128-34.
125. Ma J, Guo X, Zhang S, Liu H, Lu J, Dong Z, et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and promotes apoptosis of esophageal squamous cell lines. *Mol Med Rep.* 2015;11(6):4525-31.
126. Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, et al. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem.* 1996;271(25):15160-5.
127. Gupta R, Toufaily C, Annabi B. Caveolin and cavin family members: dual roles in cancer. *Biochimie.* 2014;107 Pt B:188-202.
128. Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, et al. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol.* 1992;118(5):1003-14.
129. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science.* 2001;293(5539):2449-52.
130. Williams TM, Hassan GS, Li J, Cohen AW, Medina F, Frank PG, et al. Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice. *J Biol Chem.* 2005;280(26):25134-45.
131. Quann K, Gonzales DM, Mercier I, Wang C, Sotgia F, Pestell RG, et al. Caveolin-1 is a negative regulator of tumor growth in glioblastoma and modulates chemosensitivity to temozolomide. *Cell Cycle.* 2013;12(10):1510-20.

132. Raja SA, Shah STA, Tariq A, Bibi N, Sughra K, Yousuf A, et al. Caveolin-1 and dynamin-2 overexpression is associated with the progression of bladder cancer. *Oncol Lett.* 2019;18(1):219-26.
133. Williams TM, Medina F, Badano I, Hazan RB, Hutchinson J, Muller WJ, et al. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem.* 2004;279(49):51630-46.
134. Yang J, Zhu T, Zhao R, Gao D, Cui Y, Wang K, et al. Caveolin-1 Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion of Human Colorectal Cancer Cells by Suppressing Phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor. *Med Sci Monit.* 2018;24:332-41.
135. Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem.* 1998;273(49):32380-3.
136. Zhang S, Cao W, Yue M, Zheng N, Hu T, Yang S, et al. Caveolin-1 affects tumor drug resistance in esophageal squamous cell carcinoma by regulating expressions of P-gp and MRP1. *Tumour Biol.* 2016;37(7):9189-96.
137. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.* 2004;6(4):463-77.
138. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 2000;290(5497):1717-21.
139. Guo F, Liu X, Cai H, Le W. Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy. *Brain Pathol.* 2018;28(1):3-13.
140. Mialet-Perez J, Vindis C. Autophagy in health and disease: focus on the cardiovascular system. *Essays Biochem.* 2017;61(6):721-32.
141. Sarparanta J, García-Macia M, Singh R. Autophagy and Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2017;13(4):352-69.

142. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res.* 2011;17(4):654-66.
143. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* 2007;21(11):1367-81.
144. Marinković M, Šprung M, Buljubašić M, Novak I. Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:8023821.
145. Wu DH, Jia CC, Chen J, Lin ZX, Ruan DY, Li X, et al. Autophagic LC3B overexpression correlates with malignant progression and predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.* 2014;35(12):12225-33.
146. Pasquier B. Autophagy inhibitors. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(5):985-1001.
147. Luo S, Mao C, Lee B, Lee AS. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol.* 2006;26(15):5688-97.
148. Daneshmand S, Quek ML, Lin E, Lee C, Cote RJ, Hawes D, et al. Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival. *Hum Pathol.* 2007;38(10):1547-52.
149. Wang Q, He Z, Zhang J, Wang Y, Wang T, Tong S, et al. Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance. *Cancer Detect Prev.* 2005;29(6):544-51.
150. Shi Y, Gerritsma D, Bowes AJ, Capretta A, Werstuck GH. Induction of GRP78 by valproic acid is dependent upon histone deacetylase inhibition. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007;17(16):4491-4.
151. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.

152. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:385-427.
153. Fedier A, Dedes KJ, Imesch P, Von Bueren AO, Fink D. The histone deacetylase inhibitors suberoylanilide hydroxamic (Vorinostat) and valproic acid induce irreversible and MDR1-independent resistance in human colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2007;31(3):633-41.
154. Kawai Y, Arinze IJ. Valproic acid-induced gene expression through production of reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2006;66(13):6563-9.
155. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab. *PLoS One.* 2009;4(7):e6251.
156. Mosel DD, Bauer RL, Lynch DP, Hwang ST. Oral complications in the treatment of cancer patients. *Oral Dis.* 2011;17(6):550-9.
157. Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH, Jr., Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature.* 1998;391(6669):811-4.

## 8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater xxx für die Möglichkeit danken, meine Dissertation an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie durchführen zu können. Bei Planung sowie Durchführung der Versuche ließ er mir stets freie Hand und stand mir mit professionellem Rat zur Seite. Die häufigen Nachfragen beantwortete er stets geduldig und ausführlich. Besonderer Dank gebührt der Laborleiterin der MKG Frau xxx für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung bei der Versuchsplanung. Gleiches gilt für die Labormitarbeiterinnen xxx und xxx, auf deren Hilfe ich mich bei der Versuchsdurchführung immer verlassen konnte. Alle drei sorgten mit ihrem rheinländischen Frohsinn auch bei missglückten Versuchen für gute Stimmung. Der größte Dank gilt meinen Eltern. Sie unterstützen mich seit jeher und ohne sie hätte ich das Studium und diese Promotion nicht realisieren können. Zuletzt danke ich meinem Kojen-Partner xxx, sowie xxx, xxx, xxx und xxx, deren Freundschaft ein großes Geschenk ist.

## 9 Tabellarischer Lebenslauf

**Name:** Moritz Koopmann

**Geburtsdatum:** 13.12.1996

**Familienstand:** ledig

**Schule:** 2003-2007 Grundschule, Manderbach  
2007-2015 Wilhelm-von-Oranien-Schule, Dillenburg

**Studium:** Oktober 2015 - November 2020: Studium der Zahnmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz  
November 2020: Zahnärztliche Prüfung (Note: *gut*)  
Seit April 2022: Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

**Beruf:** April 2021 - März 2022: Vorbereitungsassistent in der Zahnarztpraxis xxx, Dillenburg  
Seit April 2022: Weiterbildungsassistent für Oralchirurgie bei xxx, Herborn