

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

Einfluss der Paraoxonase 2 (PON2)
- Expression auf das Ansprechverhalten
oralen Plattenepithelkarzinomzellen
unter einer Chemotherapie

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

Vorgelegt von

Matthias Tkotz
aus Bad Soden am Taunus

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 18. Dezember 2025

Nachnutzungslizenz: CC-BY-ND-4.0

An meine
Freundin, Eltern, Verwandte, Bekannte & Freunde

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung / Ziel der Dissertation.....	1
1.1 Die Bedeutung des oralen Plattenepithelkarzinoms.....	1
1.2 Zielsetzung.....	2
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Das orale Plattenepithelkarzinom.....	3
2.2 Die Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms.....	6
2.2.1 Chirurgische Therapie.....	6
2.2.2 Strahlentherapie.....	7
2.2.3 Chemotherapie / Cisplatin.....	7
2.3 Apoptose (programmierter Zelltod und seine Rolle bei Tumoren).....	8
2.4 Paraoxonase (EC number: 3.1.8.1).....	9
2.4.1 Gruppe der Paraoxonasen.....	9
2.4.2 Paraoxonase 2.....	10
2.5 Reaktive Sauerstoffspezies.....	11
2.6 PON2 & ROS im Kontext der Tumorbilogie.....	12
3 Material und Methoden.....	14
3.1 Materialien.....	14
3.1.1 Chemikalien.....	14
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	15
3.1.3 Gebrauchsfertige Reagenzien.....	17
3.1.4 Enzyme, Standards und Antikörper.....	18
3.1.5 Zelllinien und Zellkulturmedien.....	18
3.1.6 Oligonukleotide.....	19
3.1.7 Reagenzien, Lösungen, Medien und Puffer.....	20
3.1.8 Geräte.....	22
3.1.9 Herstellernachweis.....	23
3.2 Methoden.....	26
3.2.1 Kultivierung und Behandlung der Tumorzelllinien.....	26
3.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	27
3.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	32
3.2.4 Messung von Caspase 3/7 Aktivität der Tumorzellen.....	36
3.2.5 Messung von intrazellulärer ROS-Spiegel in Tumorzellen.....	36
3.2.6 Durchführung statistischer Analysen.....	37

4	Ergebnisse.....	38
4.1	Basale PON2–Expressionsanalyse in verschiedenen OSCC (<i>in vitro</i>).....	38
4.1.1	PON2-Expressionsanalyse mittels proteinbiochemischer Methode (<i>in vitro</i>)..	38
4.1.2	PON2-Expressionsanalyse – Quantitative Analyse (<i>in vitro</i>)	39
4.2	Weiterführende Analysen in OSCC (SCC-9) (<i>in vitro</i>)	40
4.2.1	PON2-Expressionsanalyse auf RNA-Ebene in OSCC (SCC-9) (<i>in vitro</i>).....	40
4.2.2	PON2-Expressionsanalyse auf proteinbiochemischer Ebene in OSCC (SCC-9) (<i>in vitro</i>)	43
4.2.3	Analyse von Caspase 3/7 Aktivität in OSCC (SCC-9) (<i>in vitro</i>)	44
4.2.4	Analyse der intrazellulären ROS-Spiegel in OSCC (SCC-9) (<i>in vitro</i>)	47
5	Diskussion	49
5.1	Diskussion der eigenen Ergebnisse.....	49
5.1.1	Interpretation der eigenen Ergebnisse im Kontext anderer Studien	49
5.1.2	Bedeutung der basalen PON2-Expression in verschiedenen OSCC.....	50
5.1.3	PON2 schützt OSCC vor Cisplatin-induzierter Apoptose.....	51
5.1.4	PON2 schützt OSCC vor Cisplatin-induzierten ROS-Spiegeln	53
5.2	PON2 - potenzieller Marker oder therapeutischer Angriffspunkt	54
5.3	PON2 - Konklusion und Zukunftsausblick.....	55
6	Zusammenfassung	56
6.1	Zusammenfassung	56
6.2	Summary.....	58
7	Literaturverzeichnis.....	60
8	Anhang	69
9	Danksagung.....	70
10	Tabellarischer Lebenslauf.....	71

Abkürzungsverzeichnis

5FU	5-Fluoruracil
APS	chemisch: Ammoniumpersulfat
bzw.	beziehungsweise
BMI	engl.: Body Mass Index
CA	engl.: California
CAS	engl.: chemical abstracts service
ca.	circa
cDNA	engl.: complementary deoxyribonucleic acid
Cl	chemisch: Chlor
cm	Zentimeter
CO ₂	chemisch: Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nährstoffmischung F-12
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid
DTT	chemisch: Dithiothreitol
EC	engl.: enzyme commission
engl.	englisch
et al.	lat.: et alii / et aliae / et alia
etc.	lat.: et cetera
FCS	engl.: fetal calf serum
franz.	französisch
g	Masse: Gramm
ggf.	gegebenenfalls
Gy	Energiedosis, Kerma: Gray
h	Stunde
H	chemisch: Wasserstoff
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HDL	engl.: high-density lipoprotein
HNC	engl.: head and neck cancer
HPV	engl.: human papilloma virus

IL	engl.: Illinois
Inc.	engl.: Incorporated
kDa	Molekülmasse: Kilodalton
LDL	engl.: low-density lipoprotein
Ltd.	engl.: Limited
m	männlich
MA	engl.: Massachusetts
max.	maximal
min	Minute
MD	engl.: Maryland
mol	Stoffmenge: Mol
mRNA	engl.: messenger ribonucleic acid
N	chemisch: Stickstoff
ND	engl.: neck dissection
ng	Einheit: Nanogramm
OPML	engl.: oral potential malignant disorders
OR	engl.: Oregon
OSCC	engl.: oral squamous cell carcinoma
PBS	eng.: phosphate-buffered saline
PCR	engl.: polymerase chain reaction
PEK	Plattenepithelkarzinom
PON2	Paraoxonase 2
Pt	Platin
qRT-PCR	engl.: quantitative real time polymerase chain reaction
ROS	engl.: reactive oxygen species
rpm	engl.: revolutions per minute
s	Sekunden
SDS	engl. Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	eng.: small interfering ribonucleic acid
TEMED	chemisch: Tetramethylethylendiamine

UK	engl.: United Kingdom
UICC	franz.: Union internationale contre le cancer
UPR	engl.: unfolded protein response
USA	engl.: United States of America
VA	engl.: Virginia
vs.	lat.: versus
w	weiblich
WI	engl.: Wisconsin
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die orale Leukoplakie; MKG Universitätsmedizin Mainz

Abbildung 2: Das orale Plattenepithelkarzinom; MKG Universitätsmedizin Mainz

Abbildung 3: Cisplatin – Strukturformel

Abbildung 4: Paraoxonase 2 – schematische Darstellung, KI-generiert (Open-AI, 2025)

Abbildung 5: Antiapoptotischer Mechanismus von Paraoxonase 2 – Abbildung modifiziert nach Witte

Abbildung 6: Vorbehandlung der Tumorzellen in Zellkulturansätze

Abbildung 7: Zellkulturansätze für die Messung von Caspase 3/7 Aktivität und intrazellulärer ROS-Spiegel in Tumorzellen

Abbildung 8: Basale PON2-Expression in verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinomzellen

Abbildung 9: Quantitative Analyse der relativen PON2-Expression, normalisiert zu Aktin

Abbildung 10: PON2-Expressionsanalyse auf RNA-Ebene in OSCC (SCC-9)

Abbildung 11: PON2-Expressionsanalyse auf proteinbiochemischer Ebene in OSCC (SCC-9)

Abbildung 12: Caspase 3/7 Aktivität in OSCC (SCC-9)

Abbildung 13: Intrazelluläre ROS-Spiegel in OSCC (SCC-9)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Plattenepithelkarzinomzelllinien

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

1.1 Die Bedeutung des oralen Plattenepithelkarzinoms

Das orale Plattenepithelkarzinom ist definiert als invasive maligne Neoplasie und tritt an verschiedenen Lokalisationen, wie z.B. Zunge, Zahnfleisch, Mundboden, Wangeninnenseite, Lippeninnenseite retromolarem Dreieck und Gaumen, auf (1). Plattenepithelkarzinome stellen 90% der malignen Neoplasien der Mundhöhle und des Oropharynx dar und machen bei Frauen 2% und bei Männern 5% aller Tumorerkrankungen aus (2). Es tritt vorwiegend in der fünften und sechsten Lebensdekade auf (3). Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms sind Tabakkonsum, vor allem das Kauen von Areca- bzw. Betelnüssen, der übermäßige Konsum von Alkohol, genetische Prädisposition sowie eine Infektion des oberen Aerodigestivtrakt durch das humane Papillomavirus (HPV) (4). Die humanen Papillomaviren (HPV) sind in Nord-, Mittelosteuropa und Südamerika für einen Anstieg der Neuerkrankungen jüngerer Menschen mit Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs verantwortlich (5). Eine verspätete Diagnose beim Kopf-Hals-Karzinom ist oft der Grund für die hohe Sterblichkeit (6). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 62%, bei Patienten mit Metastasen nur bei 32% (7). Heutzutage ist die Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms eine Kombination aus chirurgischer Entfernung, Radio- und / oder Chemotherapie, wobei die Prognose durch die Größe des Tumors und den Status der Lymphknoten bestimmt wird (8, 9). Die Chemotherapie allein hat in der multimodalen Therapie des Mundhöhlenkarzinoms keinen Stellenwert und wird in der Regel additiv in Kombination mit einer Strahlentherapie appliziert (10). Dabei wirken Chemotherapeutika, wie z. B. Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil etc., zytostatisch bzw. zytotoxisch durch direkte DNA-Schädigung oder die Bildung reaktive Sauerstoffspezies (ROS), was letztlich das Absterben der Tumorzellen bewirkt (11). In der aktuellen Literatur konnte Paraoxonase 2 (PON2) die Wirksamkeit bestimmter Chemotherapeutika vermindern, was auf einen potenziellen Mechanismus der Chemoresistenz hindeutet (12). Des Weiteren wurde ebenfalls diskutiert, dass PON2 reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reduziert und somit die Tumorzellen vor oxidativen Stress schützt (13). Diese Erkenntnisse positionieren PON2 nicht nur als ggf. prognostischen Marker, sondern auch als möglichen therapeutischen Angriffspunkt bei der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen (14). Da die Inzidenz für Krebserkrankungen in Mundhöhle und Rachen insgesamt für Deutschland im Jahr 2022 13189 registrierte Neuerkrankungen betrug, stellt das orale Plattenepithelkarzinom auch weiterhin heutzutage eine relevante Erkrankung dar, die es gilt, erfolgreich zu therapieren (15, 16).

1.2 Zielsetzung

Durch biochemische Methoden sollen sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene Zusammenhänge in Bezug auf Expression, Aktivität und Funktion von Paraoxonase 2 (PON2) in Zellen oraler Plattenepithelkarzinome analysiert werden. Ziel ist es durch *in vitro* Experimente herauszufinden, ob PON2 die orale Plattenepithelkarzinomzellen vor der chemotherapeutisch induzierten Apoptose schützt. Da im Rahmen der Chemotherapie vorzugsweise platinhaltige Verbindungen zum Einsatz kommen, wird getestet, ob PON2 eine Wirkung auf die Resistenz in Bezug auf Cisplatin hat. Dies wird anhand von zwei Versuchsreihen untersucht:

Im ersten Versuchsteil soll in einem *in vitro* – Versuch die basale PON2 Expression in verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien (CAL-27, SCC-9, SCC-15 und SCC-25) auf Proteinebene durch Western blot untersucht werden. Im zweiten Versuchsteil soll durch ein Gen-knockout PON2 in einer Plattenepithelkarzinomzelllinie gezielt herunterreguliert werden, mit dem Chemotherapeutika Cisplatin inkubiert und danach Folgetests in Form von RealTimePCR, Westernblots, Caspase und ROS Analysen durchgeführt werden. Dabei soll auf folgende Fragestellung eingegangen werden:

- Variiert die PON2-Expression in unterschiedlichen oralen Plattenepithelkarzinomzellen?
- Wirkt sich eine Chemotherapie mit Cisplatin auf die Genexpression von PON2 aus?
- Schützt PON2 orale Plattenepithelkarzinomzellen vor Cisplatin-induzierter Apoptose?
- Schützt PON2 oralen Plattenepithelkarzinome vor Cisplatin-induzierter ROS-Produktion?

Durch Beantwortung dieser Fragestellungen könnte PON2 als potenziell therapeutischer Angriffspunkt in der Behandlung oraler Plattenepithelkarzinome charakterisiert werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das orale Plattenepithelkarzinom

Der Kopf- und Halskrebs („Head and neck cancer“, HNC) ist einer der wichtigsten bösartigen Erkrankungen und ist die siebthäufigste Krebsart weltweit (17). Das orale Plattenepithelkarzinom („oral squamous cell carcinoma“ – OSCC) gehört zu den Kopf- und Hals-Tumoren und ist ein maligner Tumor, der von der oralen Schleimhaut ausgeht (18, 19). Es kann sowohl im Mundraum, insbesondere an Zunge, Zahnfleisch, Mundboden, Wangeninnenseite, Lippeninnenseite, retromolarem Dreieck und Gaumen, als auch im Pharynx, Larynx sowie Nasen-(Neben)höhlen auftreten (20). Männer sind häufiger betroffen als Frauen, die Geschlechterverteilung wird sowohl in Deutschland als auch in den USA auf 2,5 zu 1 (Männer : Frauen) geschätzt (7) (21). Die Erkrankung tritt meist bei Männern zwischen 55 und 65 Jahren auf, bei Frauen hingegen zwischen 50 und 75 Jahren (22). Die jährliche weltweite Inzidenz beträgt 358.864 Neuerkrankungen bei einer jährlichen Mortalität von 177.384 Todesfällen (23). Die Ursachen oraler Plattenepithelkarzinome sind komplex und lassen sich sowohl auf intrinsische als auch extrinsische Faktoren zurückführen (24): Zu den intrinsischen Faktoren gehören genetische Prädisposition (25), Langzeit-Immunsuppression (26) oder Eisenmangel (27). Als extrinsische Faktoren werden Rauchen (28), Alkoholkonsum (29), Betelnusskonsum (30) und HPV (31) genannt. Besonders das Rauchen und der chronische Alkoholabusus gelten als Hauptrisikofaktoren, die sich gegenseitig potenzieren können (32). Wiederum kann bei einer ausgewogenen mediterranen Ernährung das Risiko für eine Entwicklung eines Mundhöhlenkarzinoms, nach Adjustierung des Nikotinkonsums und BMIs, deutlich gesenkt werden (33). Oft entsteht das orale Plattenepithelkarzinom aus einer Präkanzerose, eine Veränderung des Gewebes, die mit einem statistisch erhöhten Risiko für eine bösartige Entartung verbunden ist (34). Das orale Plattenepithelkarzinom entsteht durch einen mehrstufigen Prozess und benötigt einen langen Zeitraum von ca. 25 Jahren (35). Am Anfang der Krebsentstehung kommt es zu einer Veränderung des Genoms in einer oder mehreren Zellen, die über die niedrig-, mäßige und hochgradige Dysplasie zum Carcinoma in situ und abschließend zum malignen Plattenepithelkarzinom wird (36, 37). Die sogenannte Feldkanzerisierung, ein Begriff welcher durch Slaughter et al. 1953 definiert wurde, beschreibt den Bestand von präneoplastischen Prozessen, die mit einer hohen karzinogenen Potenz an mehreren Stellen eines Bereiches (Feld) einhergehen (38). Da das Tumorwachstum zunächst schmerzlos verläuft, stellen sich die Patienten oft erst mit Verzögerung vor (39). Die Früherkennung des oralen

Plattenepithelkarzinoms (OSCC) bleibt trotz moderner diagnostischer Möglichkeiten eine erhebliche Herausforderung in der klinischen Praxis (40). OSCC wird initial häufig durch asymptomatische oder unspezifische Läsionen auffällig und imponiert als Leukoplakie, Erythroplakie, persistierendes Ulkus oder eine indurierte Schleimhautveränderung (41, 42). Diese Veränderungen können in der primärärztlichen oder zahnärztlichen Versorgung oftmals als benigne Reizungen, chronisch-entzündliche Veränderungen oder druckbedingte Läsionen fehldiagnostiziert werden, was mitunter zu einer relevanten zeitlichen Verzögerung in der Diagnosestellung führt (43). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass sich zwischen dem erstmaligen Auftreten auffälliger oraler Läsionen und der definitiven Diagnosestellung häufig ein Zeitraum von mehreren Monaten erstreckt, wodurch die Erkrankung nicht selten erst in fortgeschrittenen Stadien entdeckt wird (44). Nach einer verspäteten Diagnosestellung erfolgt wiederum eine Verzögerung des Behandlungsbeginns (45-47). Die Inzidenz eines zeitgleichen Zweittumors oder von Fernmetastasen (Tochtergeschwülste, die in einem entfernteren Gewebe angesiedelt sind) in Bezug auf die Größe des Primärtumors, liegt bei oralen Karzinomen zwischen 4% und 33% (48, 49). Das Staging des oralen Plattenepithelkarzinoms erfolgt anhand der UICC- oder TNM-Klassifikation und umfasst die Größe des Primärtumors, das Vorhandensein von Metastasen in regionalen Lymphknoten und Fernmetastasen, die ggf. andere Organe betreffen können (50).



Abbildung 1: Die orale Leukoplakie; MKG Universitätsmedizin Mainz

Orale, potenziell maligne Läsionen sind klinische Veränderungen der Mundschleimhaut mit dem Risiko der Entwicklung eines Karzinoms. Dabei ist die Leukoplakie die häufigste orale, potenziell maligne Veränderung (OPML) der Mundschleimhaut. Die orale Leukoplakie erscheint klinisch als plane und scharf begrenzte Schleimhaut-Veränderung, die schmerzlos und nicht juckend ist. Ebenfalls typisch ist, dass die weißen Veränderungen nicht abwischbar sind. Durch regelmäßige Kontrolluntersuchungen können die potenziell bösartigen Gewebsveränderungen in einem frühen Stadium aufgedeckt werden.



Abbildung 2: Das orale Plattenepithelkarzinom; MKG Universitätsmedizin Mainz

Das orale Plattenepithelkarzinom zeigt sich klinisch typisch als zentrales Ulkus mit einem peripheren Randwall und leukoplakischen Auflagerungen, die aber auch fehlen können. Mit zunehmender Größe des Tumors können sowohl Schmerzen als auch Dysarthrie, Dysphagie und / oder Foetor ex ore auftreten. Das Staging des Tumors erfolgt anhand der UICC- oder TNM-Klassifikation.

2.2 Die Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms

Die Behandlung des oralen Plattenepithelkarzinoms erfolgt in Deutschland interdisziplinär und wird im entsprechenden Tumorboard mit den einzelnen an der Diagnostik und Therapie beteiligten Fachrichtungen Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Strahlentherapie, Onkologie, Pathologie und Radiologie abgestimmt (51). Die Therapie des Mundhöhlenkarzinoms soll individuell auf den Patienten angepasst werden (52). Dabei soll in der Patientenfallvorstellung eine Therapieempfehlung in Bezug auf die Lokalisation, Größe und Ausbreitung des Primärtumors (T-Stadium), das Fehlen oder Vorhandensein von örtlich oder benachbarten regionären Lymphknotenmetastasen (N-Stadium), das Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Status), den Allgemeinzustand und auch den Willen des Patienten, ausgesprochen werden (53, 54). Dabei gibt es grundsätzlich zwei Therapiestrategien, den kurativen und den palliativen Behandlungsansatz (55): Möglichkeiten einer kurativen Behandlung sind die alleinige chirurgische Therapie, die alleinige Strahlentherapie, die Strahlentherapie in Kombination mit einer Chemotherapie sowie eine Kombination aus chirurgischer, Strahlen- und Chemotherapie (51). Zu den „drei Pfeilern“ der klassischen Tumorthherapie zählen:

2.2.1 Chirurgische Therapie

Bei kurativ resektablen oralen Plattenepithelkarzinomen sollte die Operation, ggf. mit einer zeitnahen Rekonstruktion durchgeführt werden (51). Ziel der operativen Therapie ist das Erreichen von tumorfreien Absetzungsrandern des Operationspräparats, mit einem Sicherheitsabstand von mindestens 0,5cm (R0-Resektion) (56, 57). Bei fortgeschrittenen Karzinomen sollte eine zusätzliche postoperative Radio(-chemo)therapie im Anschluss erfolgen (58-60). In ca. 20-40% der Fälle kommt es bei OSCC zu einer nicht sichtbaren Metastasierung der Halslymphknoten, dabei sind meistens Level I – III betroffen (61). Es wird empfohlen bei klinisch unauffälligen Lymphknoten eine elektive Neck Dissection und bei Verdacht auf Lymphknotenbefall eine therapeutische in der Regel modifizierte radikale Neck Dissection durchzuführen (62, 63). Neben den Lymphknoten in Level I – III werden in der Literatur der Befall von Level IV mit 7-17% und Level V mit 0-6% Wahrscheinlichkeit angegeben (64, 65). Bei höherer T-Kategorie (T3/T4), knappen oder noch positiven Resektionsrändern, perineuraler, Gefäß und/oder Lymphknoteninvasion sollte eine postoperative Radio- oder Radiochemotherapie erfolgen (66, 67):

2.2.2 Strahlentherapie

Bei der Strahlentherapie (Radiotherapie) wird ionisierende Strahlung auf ein Zielvolumen (Tumor und sein Ausbreitungsgebiet) appliziert (68). Ziel der Radiotherapie ist eine maximale Zerstörung des Tumorgewebes bei gleichzeitig minimaler Schädigung des umgebenden gesunden Gewebes (69). Ein zeitnaher Beginn postoperativ und ein Therapieabschluss nach maximal elf Wochen werden angestrebt (70, 71). Die Gesamtdosis wird in der Regel in mehreren Einzeldosen entweder mit 1,8-2,0 Gy, täglich 5x/Woche konventionell fraktioniert appliziert. Andere Konzepte, welche Auswirkungen auf die Toxizität der Therapie haben, sind die akzelerierte Bestrahlung (>10 Gy/Woche) oder 1,1-1,2 Gy, 2x täglich als hyperfraktionierte Radiotherapie (72). Häufige Nebenwirkungen unter einer Strahlentherapie beim Mundhöhlenkarzinom sind Mukositis, (Pilz)Infektionen, Veränderung des Speichels, Fibrose, sensorische Störungen, Karies, Parodontitis und die Osteoradionekrose (73).

2.2.3 Chemotherapie / Cisplatin

Eine Chemotherapie wird als medikamentöse Therapie bei Tumorerkrankungen eingesetzt und kann entweder unter kurativen, adjuvanten oder palliativen Aspekten durchgeführt werden (74). In der Behandlung des Mundhöhlenkarzinoms kommen in der Regel die Platinderivate Cisplatin oder Carboplatin (75, 76) entweder in Kombination mit einer Strahlentherapie (primäre Radiochemotherapie) oder nach operativer Entfernung des Tumors in Kombination mit Bestrahlung (adjuvante Radiochemotherapie) zum Einsatz (77, 78). Beim Nachweis extrakapsulärer Lymphknotenmetastasen oder einem positiven Resektionsrand (R1-Resektion) wird ebenfalls Cisplatin als Mittel der Wahl angewendet. Bei Tumorrezidiven oder in der Palliation können weitere Chemotherapeutika (5-FU, Taxane) angewendet werden (79, 80).

Cisplatin (CAS registry number: 15663-27-1)

Bei Cisplatin ((SP-4-2)-Diammindichloroplatin(II)) handelt es sich um einen Arzneistoff aus der Gruppe der Zytostatika, die das Zellwachstum bzw. die Zellteilung hemmen (81). Cisplatin, mit der Summenformel $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$, ist ein anorganischer Schwermetallkomplex und hat eine Molekülmasse von 300,05 g/mol (82). Chemisch gesehen ist es ein planarer Komplex, der am zentralen Platinatom, zwei cis-ständige Chloridliganden und zwei Amminliganden gebunden hat (83). Cisplatin zählt zu den Platin-Komplex-Bildnern, dabei wird die DNA-Replikation durch

Vernetzung zweier Guaninbasen in einem DNA-Strang gehemmt (57). Die DNA-Struktur wird gestört, der Zellstoffwechsel hört auf und es wird in der Zelle die Apoptose (programmierter Zelltod) eingeleitet (84). Cisplatin hat einige Nebenwirkungen, unter anderem wirkt es stark emetisch und nephrotoxisch sowie stark ototoxisch und neurotoxisch (85). Heutzutage ist Cisplatin immer noch der Goldstandard und wird als Chemotherapeutikum der Wahl beim oralen Plattenepithelkarzinom, neben weiteren Anwendungsgebieten für das Hoden-, Ovarial, Bronchial-, Harnblasen- und Zervixkarzinom, eingesetzt (86, 87).

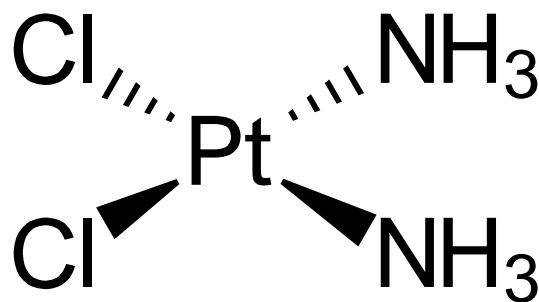


Abbildung 3: Cisplatin – Strukturformel

Cisplatin ist chemisch gesehen ein planarer Komplex, der am zentralen Platinatom zwei cis-ständige Chloridliganden und zwei Amminliganden gebunden hat. Die beiden Chloratome können gegen Wasserreste oder Hydroxygruppen ausgetauscht werden, dabei entstehen hochreaktive Aquo- und Hydroxykomplexe, die wiederum die DNA-Stränge vernetzen.

2.3 Apoptose (programmierter Zelltod und seine Rolle bei Tumoren)

Ziel der beiden adjuvanten Therapieformen Radio- und Chemotherapie ist die Induktion der Apoptose (88-91). Unter dem Begriff „Apoptose“ versteht man das physiologische, kontrollierte Absterben einer Zelle, welches auch als programmierter Zelltod definiert wird (92, 93). Der programmierte Zelltod ist für die normale Entwicklung und Funktion des Organismus wichtig und hat als Aufgabe unter anderem die Elimination potenziell schädlicher oder entarteter Zellen und die Kontrolle über die Zellanzahl (94). Der Apoptose-Mechanismus selbst besteht aus vielen komplexen Signalwegen und wird in eine Initiierungsphase und eine Effektorphase eingeteilt (95): Die Apoptose kann in der Zelle entweder über Caspase-vermittelte intrinsische

oder extrinsische Signalwege ausgelöst werden (96). Sogenannte Caspasen (EC number: 3.4.22.-) sind Enzyme aus der Gruppe der Cysteinendopeptidasen (Hydrolasen) und sind Bestandteile einer Enzymkaskade beim Ablauf des programmierten Zelltodes (97, 98). Die Caspasen befinden sich als inaktive Vorstufe (Procaspasen) im Zytoplasma, welche nach und nach aktiviert werden (99). Dabei treffen die beiden Signalwege (intrinsisch und extrinsisch) aufeinander, aktivieren die Effektor-Apoptose-Caspasen, die durch Aktivierung von Caspase 3, Caspase 6 und Caspase 7 die Endphase erreichen, und führen letztendlich sowohl zu morphologischen als auch zu biochemischen Zellveränderungen (100). Morphologisch zeichnet sich die Apoptose durch eine Schrumpfung der Zelle und des Zellkerns sowie eine Kondensation des Kernchromatins, die gegen die Kernmembranen eingegrenzt werden, aus (101). Im Anschluss kondensiert und bricht der Zellkern auf (Karyorrhexis) (102). Es lösen sich die Zellen vom umgebenden Gewebe und bilden Ausläufer, die mit dicht gepackten Zellorganellen und Zellfragmenten bestückt sind und letztendlich phagozytiert werden (103, 104). Auf biochemischer Ebene ist die Apoptose durch den Abbau von DNA durch endogene DNasen (EC number: 3.1.-.-) zu DNA-Fragmenten gekennzeichnet (105). Somit stellt der programmierte Zelltod einen essenziellen Prozess zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase dar, der ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelltod sicherstellt (106, 107).

In Tumorzellen ist dieses Gleichgewicht nicht nur durch eine ungebremste Zellteilung gestört, sondern auch durch eine Fehlsteuerung des programmierten Zelltodes (108). Dabei werden einerseits intrazelluläre Effektormoleküle mit antiapoptotischer Funktion aktiviert, andererseits kann die Genexpression geändert werden und es werden proapoptotische Signalwege inhibiert (109, 110).

2.4 Paraoxonase (EC number: 3.1.8.1)

2.4.1 Gruppe der Paraoxonasen

Zur Gruppe der Paraoxonasen gehören die drei Isoenzyme Paraoxonase 1 (PON1), Paraoxonase 2 (PON2) und Paraoxonase 3 (PON3) (111). Die drei Isotypen der Paraoxonase werden von den Genen PON1, PON2 und PON3 kodiert und befinden sich beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (112). Sie unterscheiden sich in ihrem Aufbau nur geringfügig, hingegen gibt es Unterschiede in ihrer Lokalisation und Aktivität (113). Während PON1 und PON3 hauptsächlich von der Leber synthetisiert werden und über HDL an andere

Organe verteilt werden, kommt PON2 ubiquitär intrazellulär vor (114). Alle drei Paraoxonasen haben eine Laktonaseaktivität und wirken antioxidativ, da sie ROS reduzieren können (115, 116):

Paraoxonase 1 ist ein Glykoprotein und Enzym aus 355 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 43.000 Dalton (117). PON1 wird hauptsächlich von der Leber sezerniert, kommt in fast allen Geweben vor und ist im Plasma mit dem HDL-Cholesterin assoziiert (118) (119). Es hat sowohl eine Esterase-, als auch eine Paraoxonaseaktivität (120). PON1 schützt sowohl die HDL- als auch die LDL-Cholesterin-Fraktion vor Oxidation, indem sie Organophosphate hydrolysiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen (121, 122).

Paraoxonase 3 ist ein Glykoprotein und Enzym aus 354 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 40.000 Dalton und wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert (123, 124). PON3 ist im Vergleich zu den anderen PON-Homologen das am wenigsten untersuchteste (123). Es unterscheidet sich zu PON1 und PON2 indem an Position 243 Histidin und an Position 281 Tryptophan durch Lysin bzw. Leucin ersetzt sind (125). PON3 ist ähnlich wie PON1 mit den Lipoproteinen höher Dichte (HDL) assoziiert und hat neben einer antioxidativen auch eine entzündungshemmende Eigenschaft (126). Die Regulation der Expression von PON3 verläuft unbeeinflusst von ROS und PON3 wird nicht von Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert (127-129). Außerdem wurde für PON3 eine Schutzfunktion für mitochondriales ROS in Bezug auf die intrinsische Apoptose nachgewiesen (127).

2.4.2 Paraoxonase 2

Paraoxonase 2 ist ein Glykoprotein und Enzym, das intrazellulär lokalisiert ist, und hat ein Molekulargewicht von ca. 44.000 Dalton (129). Intrazellulär befindet sich PON2 in den Membranen der Mitochondrien, der endoplasmatischen Retikula und in Plasmamembranen (130, 131). Es wird in allen Gewebearten außer Thymus, Fettgewebe, Auge und Unterkieferspeicheldrüse exprimiert (114). Paraoxonase 2 interagiert mit Coenzym Q10, das wiederum mit dem Komplex III in den Mitochondrien assoziiert ist, und fängt wahrscheinlich reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ab, die bei der oxidativen Phosphorylierung entstehen (13).

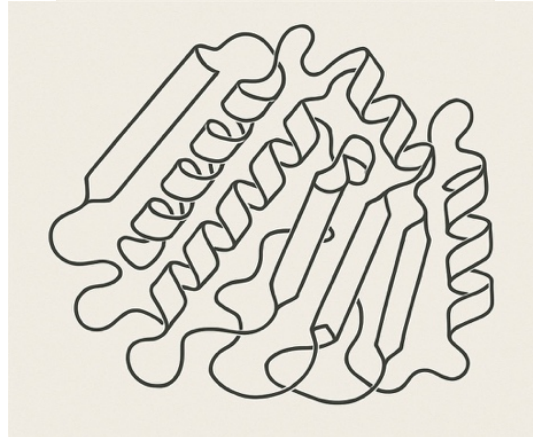


Abbildung 4: Paraoxonase 2 – schematische Darstellung, KI-generiert (Open-AI, 2025)

Die Paraoxonase 2 ist ein Enzym, das vom PON2-Gen kodiert wird. Es gehört neben Paraoxonase 1 und 3 zur Paraoxonase-Familie und ist intrazellulär lokalisiert.

2.5 Reaktive Sauerstoffspezies

Die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind Sauerstoff-enhaltende Moleküle, die eine große chemische Reaktionsbereitschaft aufweisen und eine wichtige Rolle beim oxidativen Stress spielen (132). Zur Gruppe der ROS gehören neben Radikalen wie z.B. Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxyl-Radikal ($HO\cdot$), Peroxylradikal ($ROO\cdot$) und Alkoxyradikal ($RO\cdot$) auch stabile Oxidantien wie z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroperoxid ($ROOH$), Ozon (O_3) und das Hypochlorit-Anion (OCl^-) (133). Als Nebenprodukt der Zellatmung, durch die Monoaminoxidasen und an Komplex I & III der Atmungskette, entstehen die reaktiven Sauerstoffspezies intrazellulär in den Mitochondrien (134). Ebenfalls sind ROS an der zellulären Signalübertragung beteiligt (135).

2.6 PON2 & ROS im Kontext der Tumorbilogie

Tumore, wie z.B. das orale Plattenepithelkarzinom, sind in der Lage sich einerseits durch die Hochregulierung antiapoptotischer Faktoren und andererseits durch eine höhere ROS-Resistenz einen Überlebensvorteil zu verschaffen um dem Vorgang der Apoptose entgegenzuwirken (136). Verschiedene Studien zeigten, dass PON2 sowohl eine antioxidative als auch eine antiapoptotische Funktion aufweist (137, 138). Die antiapoptotische Fähigkeit lässt sich darin begründen, dass PON2 innerhalb der mitochondrialen Atmungskette vor einer zu hohen ROS-Produktion schützt und daraufhin die Induktion der mitochondrial induzierten Apoptose hemmt (116, 131, 136, 139). Außerdem wird die PON2-Expression unter zellulären oxidativen Stress hochreguliert (140). Andere Tumorerkrankungen wie z.B. das Prostata-, Nieren-, Leber- und Harnblasenkarzinom zeigen eine erhöhte PON2-Expression (139, 141, 142). Zu den potenziellen Mechanismen, durch die das PON2 eine antiapoptotische Wirkung in den Tumorzellen entfalten könnte, zählt der unfolded protein response-Signalweg (UPR), ein zellulärer Signalweg, der infolge von Zellstress ausgelöst wird (116, 143). Horke et al. zeigten, dass in oralen Plattenepithelkarzinomzellen PON2 überexprimiert wird und vor UPR-vermitteltem Zelltod schützt (116). Bei vaskulären Endothelzellen kann die Hochregulierung von PON2 zu einem geringeren ER-assoziierten oxidativen Stresslevel führen, was wiederum in einer Inaktivierung der UPR-induzierten Apoptose resultiert (116). Andere Studien zeigen wiederum, dass eine erhöhte PON2-Expression in Bezug auf Tumore mit einer geringeren Ansprechrate auf Chemotherapie, erhöhter Aggressivität des Tumors sowie einer Herabsetzung der Prognose einhergeht (128, 144, 145).

Ebenfalls spielen reaktive Sauerstoffspezies eine zentrale Rolle in der zellulären Signaltransduktion und können in Tumorzellen des oralen Plattenepithelkarzinoms sowohl pro- als auch anti-tumorale Effekte auslösen (146, 147). Dabei sind die häufigen Merkmale von Krebszellen einerseits die Deregulierung der ROS-Produktion und andererseits eine Limitierung der ROS-Wege (148). Durch therapeutisch induzierten oxidativen Stress lassen sich zelluläre Redox-Gleichgewichte gezielt stören, was zu Aktivierung des programmierten Zelltods führen kann (149, 150). Dieser Mechanismus eröffnet potenzielle Ansätze zur selektiven Eliminierung maligner Zellen, insbesondere wenn antioxidative Schutzsysteme im Tumorgewebe bereits geschwächt sind (151).

Diese aufgezeigten Aspekte können ggf. einen Überlebensvorteil für Tumore sein. Die gezielte Modulation sowohl von PON2 als auch ROS können vielversprechende Ansätze bzw.

Angriffspunkte in der Tumorthherapie des oralen Plattenepithelkarzinoms darstellen: Während eine Erhöhung der ROS-Konzentration in Tumorzellen den Zelltod fördern kann, ist gleichzeitig die Rolle von antioxidativen und antiapoptotischen Enzymen wie z.B. das PON2 zu berücksichtigen, da deren Aktivität die Effektivität solcher Therapien beeinflussen kann (152, 153).

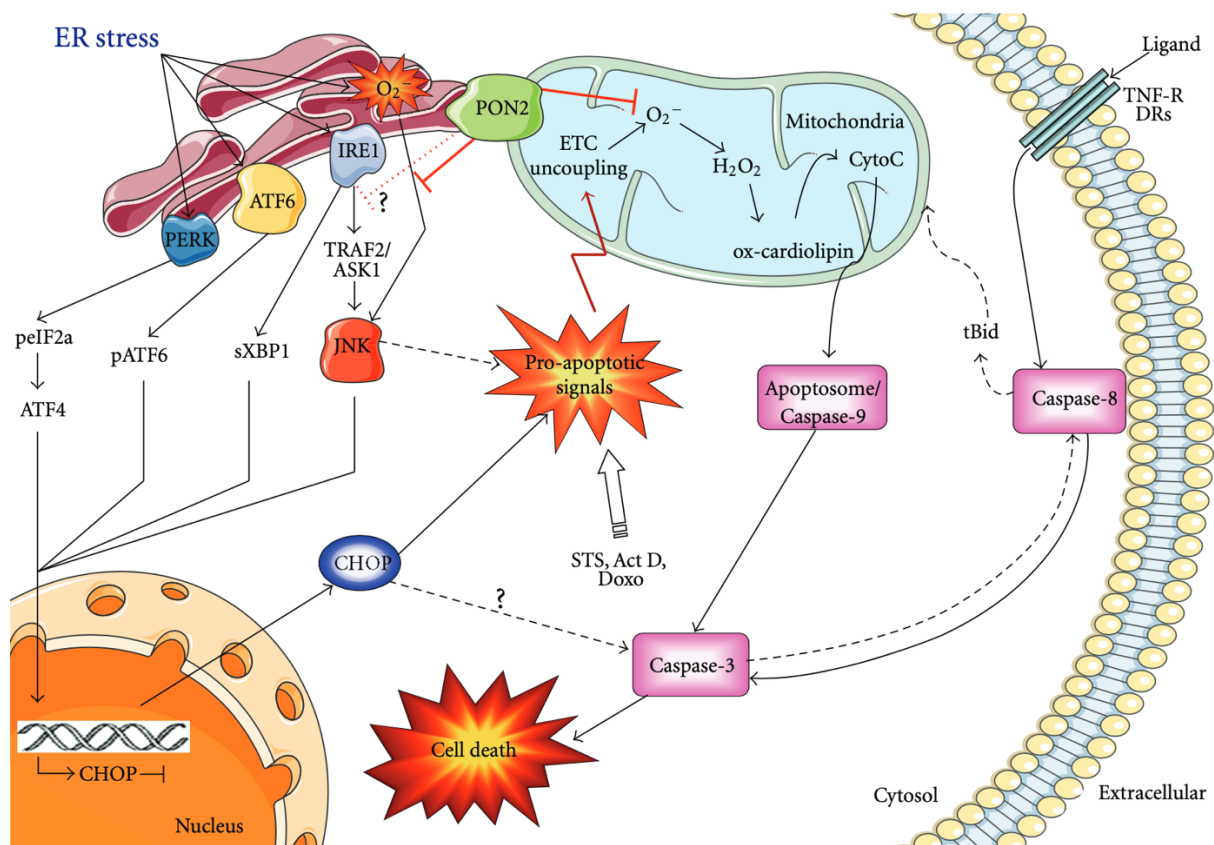


Abbildung 5: Antiapoptotischer Mechanismus von Paraoxonase 2 – Abbildung modifiziert nach Witte (141)

Die dargestellte Abbildung zeigt den vermuteten antiapoptotischen Mechanismus von Paraoxonase 2. Es verhindert die mitochondriale O₂-Bildung und beeinflusst einerseits die ER-Stress-induzierten Signalwege (über JNK und CHOP) und andererseits die mitochondrialen proapoptotischen Signale (verringerte Cardiolipinperoxidation und Cytochrom-C-Freisetzung). Dies führt zu einer ausgeprägten Apoptose-Resistenz. Somit versucht die Tumorzelle durch Erhöhung der PON2-Expression dem Zelltod zu entgehen (141).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Auflistung der verwendeten Chemikalien:

2-Mercaptoethanol, mind 98%, M3148	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2 N Salzsäure HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
4,6-Diamidin-2''-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Roche
5-(und -6)-carboxy-2',7'-dichlordihydro-fluoreszin-diacetat (Carboxy-H ₂ DCFDA)	Molecular Probes
Ampicillin	Roth
Bacto™ Tryptone	ThermoFisher Scientific GmbH
Bacto™ Yeast Extract	ThermoFisher Scientific GmbH
Cisplatin	Auftragssynthese Apotheke der Universitätsmedizin Mainz
Coomassie-Brillantblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO) D2650	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dulbecco's PBS	PAA
Ethanol 70%	AppliChem GmbH
Glycin 25mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin (HAT)	Invitrogen
HBSS	PAA
Isopropanol	Hedinger GmbH & Co. KG

L-Glutamine, G7513	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Methanol	Merck KG
Na ⁺ Pyruvat	PAA
Paraformaldehyd 4% (PFA)	Roth
Puromycin	MirusBio
SB 216763	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Triton-X-100 for molecular biology T8787	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypan-blau-Lösung 0,4%	Lonza

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien:

Bovines Serum Albumin (BSA), A7906	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Cellstar® Serologische Pipette; 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Zellkulturflaschen 550ml	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Zentrifugenröhrchen; 15ml, 50ml	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Zellkulturplatte farblos, steril, 6-well	Greiner Bio-One GmbH
DEPC-Wasser RNAse free water	VWR International GmbH
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dulbecco's Modified Eagles Medium/Nährmischung	
F12 Ham (DMEM/F-12, 1:1), D6421	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Immun-Blot® PVDF Membrane	BioRad
Falcon® Cell Scraper	Corning Science

Fluorescence Mounting medium, S3028	Agilent Technologies
Fötale Kälber Serum (FCS)	Gibco
Glutamax	Invitrogen
Hank's Balanced Salt Solution	PAA
Hard Shell® 96 well PCR plates	BioRad
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Life Science PCR 8er-Strips-Reaktionsgefäß 0,2ml; farblos	Brand GmbH & Co. KG
Life Science PCR 8er-Strips-Deckelstreifen	Brand GmbH & Co. KG
Milchpulver	Roth (Blotting Grade)
Opti-MEM™ (Minimal Essential Medium)	ThermoFisher Scientific GmbH
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Pipettenspitzen mit ART™ Barriere; 10, 100, 200, 1000µl	Thermo Fisher Scientific GmbH
Polypropylenröhrchen (PP Röhrchen) 1,3ml	Greiner Bio-One GmbH
Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran	Roth
Whatman-Papier 0,34; 13,3 x 10,2cm	Roth
Zellkulturflaschen T-75	Greiner / Sarstedt
Zellkulturplatten TC Plate 6-well (steril)	Cellstar / Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturplatten TC Plate 24-well (steril)	Cellstar / Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturplatten TC Plate 96-well (steril)	Greiner Bio-One GmbH

3.1.3 Gebrauchsfertige Reagenzien

Auflistung der verwendeten gebrauchsfertigen Reagenzien:

Accutase solution A6964	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Pierce BCA Protein Assay kit, Nr. 23227	Thermo Fisher Scientific GmbH
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
iScript™ cDNA Synthesis kit	Bio-Rad Laboratories
Mini-PROTEAN® TGX™ Gels	Bio-Rad Laboratories
Nanofektin™	PAA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1, P5726	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, P0044	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
PhosphoStop™ Phosphatase Inhibitor	Roche
Protease Inhibitor Cocktail, P8340	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
QIAprep Spin Miniprep kit	Qiagen GmbH
QIASHREDDER	Qiagen GmbH
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH
RNeasy® Mini kit	Qiagen GmbH
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories
Transfection Reagent SAINT RED	Synvolux Products & Therapeutics
Stealth small interfering RNA (PON2 mRNA)	Thermo Fisher Scientific GmbH
The MISSION® siRNA Universal negative control #1	Sigma-Aldrich
Turbofektin 8.0	Origene EU
Western lightning Chemiluminescent Reagent Plus	Perkin Elmer

3.1.4 Enzyme, Standards und Antikörper

Auflistung der verwendeten primären Antikörper, die gegen humane Proteine gerichtet sind:

Anti-PON2 Antikörper ab183710	Abcam
Benzonase (genetically engineered nuclease)	Novagen
Bisbenzimid	Invitrogen
ECL™ Prime Western Blot Detection Kit, RPN2232	GE Healthcare
ECL™ Rainbow™ Marker-Full Range, RPN800E	Cytiva
Monoklonaler α - α Tubulin Ab-2, Klon DM1A (Maus)	Dianova
WesternBright™ ChemiPen™	Advansta
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas Life Science
Peroxidase-konjugierter Kaninchen- α -Maus IgG	Sigma
Peroxidase-konjugierter Ziege- α -Kaninchen IgG	Sigma
Polyklonaler α -PON2-Peptidantikörper (Kaninchen)	Auftragssynthese Eurogentec, Belgium
Trypsin	PAA

3.1.5 Zelllinien und Zellkulturmedien

Die für die vorliegende Dissertation verwendeten Zelllinien CAL-27, SCC-9, SCC-15 und SCC-25 wurden kommerziell über die Firma ATCC®, USA erworben. Es handelt sich um immortalisierte Plattenepithelkarzinomzelllinien von Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches. CAL-27 sind isolierte Plattenepithelkarzinomzellen, aus einem Zungenkarzinom eines 56-jährigen weißen Mannes die im Jahr 1982 entnommen wurde (154). SCC-9 Zellen stammen aus dem Zungenkarzinom eines 25-jährigen männlichen Patienten (155). Die Tumorzelllinie SCC-15 geht ebenfalls auf einen 55-jährigen männlichen Patienten (155-157) und die Zelllinie SCC-25 auf einen 70-jährigen männlichen Patienten mit Zungenkarzinom zurück (155). Das Nährmedium für die CAL-27-Tumorzellen besteht aus DMEM, 1g Glucose, 10% FCS,

1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin. Das Medium der anderen Tumorzelllinien SCC-9, SSC-15 und SCC-25 besteht das aus DMEM/F-12, 10% FCS, 1% Hydrocortison und 1% L-Glutamin. Die Komplementfaktoren, welche im fötalen Kälberserum enthalten sind, wurden durch Erhitzung im Wasserbad bei 56°C für 30min inaktiviert. Nach Aliquotierung wurde das fötale Kälberserum bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Die beiden verschiedenen Nährmedien-Lösungen wurden bei 4° im Kühlschrank gelagert und wurde vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt. Um die adhärenen Zellen zur weiteren Verwendung abzulösen, wurde Accutase-Lösung (pH 6,8 – 7,8; Konzentration 400 – 600 units/ml) benutzt. Dabei wirkt Accutase bei der Zellablösung im Vergleich zu Trypsin schonender.

Zelllinie (ATCC Number)	Alter	Geschlecht	Gewebe	Organismus	Krankheit
CAL-27 (CRL-2095™)	56	m	Zunge	Homo sapiens	PEK
SCC-9 (CRL-1629™)	25	m	Zunge	Homo sapiens	PEK
SCC-15 (CRL-1623™)	55	m	Zunge	Homo sapiens	PEK
SCC-25 (CRL-1628™)	70	m	Zunge	Homo sapiens	PEK

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Plattenepithelkarzinomzelllinien

Die Tumorzelllinien CAL-27, SCC-9, SCC-15 und SCC-25 sind jeweils mit ihren Eigenschaften zu Alter, Geschlecht, Gewebe, Organismus und Krankheit in der Tabelle aufgelistet.

3.1.6 Oligonukleotide

Auflistung der verwendeten Primersequenzen:

PON2 – Primersequenzen:

PON2 S: 5'-TCG TGT ATG ACC CGA ACA ATC C-3'

PON2 AS: 5'-AAC TGT AGT CAC TGT AGG CTT CTC-3'

Aktin-Primersequenzen:

Aktin S: 5'-GGA GCA ATG ATC TTG ATC TT-3'

Aktin AS: 5'-CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT-3'

Primer sind kurze DNA-Oligonukleotide, die an eine spezifische DNA-Sequenz binden und als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienen. Die Abkürzung „S“ steht für sense primer (Vorwärtsprimer), welcher an den Antisense-Strang bindet und von 5' Richtung 3' läuft. Die Abkürzung „AS“ für Antisense (Rückwärtsprimer), dieser Primer bindet an den Sense-Strang und läuft von 3' Richtung 5'.

3.1.7 Reagenzien, Lösungen, Medien und Puffer

Auflistung der verwendeten Reagenzien, Lösungen, Medien und Puffer:

Blocking-Puffer	TBS-Puffer: 10mM Tris/HCl pH 7,6, 100mM NaCl, 0,18% Tween-20, 5% Milchpulver
DNA-Ladepuffer, 6x	1x TAE-Puffer, 0,01% Bromphenolblau, 40% Glycerin
Laemmli Puffer, 10x	Tris 0,25M, Glycin 1,92M, SDS 1%, pH 8,4-8,9
Passive lysis puffer	200mM NaCl, 100mM Tris/HCl pH 7,4, 2% Triton X-100, 1mM DTT, 1x Proteaseinhibitor
PBS-Puffer	137mM NaCl, 3mM KCl, 10mM Na ₂ HPO ₄ , 2mM KH ₂ PO ₄ , pH7,4
PBS-T-Puffer	PBS-Puffer mit zusätzlich 0,1% Triton X-100
RIPA-Puffer R 0278	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RIPA-Puffer	250mM NaCl, 2mM EDTA, 200mM Tris pH7,4, 1% Triton X-100, 1% Na-Deoxycholat, 0,1% SDS, 4% Complete Protease Inhibitor, 5mM PMSF, 0,8% Benzonase, alles gelöst in H ₂ O

SDS-Laufpuffer I, 1x	25mM Tris/HCl, pH8,3, 250mM Glycin, 0,1% SDS
SDS-Laufpuffer II, 1x	25mM Tris/HCl, pH8,3, 192mM Glycin, 0,1% SDS
SDS-Laufpuffer I, 5x	0,4M Tris/HCl pH6,8, 0,5M DTT, 40% Glycerin, 10% SDS
SDS-Laufpuffer II, 5x	Tris Base 150g, Glycin 720g, Aqua dest. ad 5000ml
Stripping-Puffer	12,5% 0,5m Tris pH 6,8, 2% SDS, 0,007% β -Mercaptoethanol
TBS-Puffer	10mM Tris/HCl pH7,6, 100mM NaCl, 0,18% Tween-20
Wasser	das in diesen Versuchen verwendete Wasser wurde vor Gebrauch destilliert, mittels einer Millipore-Anlage deionisiert und autoklaviert
Western blot Anodenpuffer I	300mM Tris/HCl pH 10,4, 20% Methanol
Western blot Anodenpuffer II	25mM Tris/HCl pH10,4, 20% Methanol
Western blot Kathodenpuffer	25mM Tris/HCl pH9,4, 40mM DL-Norleucin, 0,05% SDS

3.1.8 Geräte

Auflistung der verwendeten Geräte:

ChemiDoc™ XRS+ Gel Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Fusion Solo S	Vilber Lourmat GmbH
Inkubator Function Line BB16	Heraeus Function Line
Eismaschine AF80	Frimont S.P.A., Mailand, Italien
Fluostar Optima Fluometer	BMG Labtechnologies
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr GmbH
Gefrierschrank (-80°C)	Liebherr GmbH
Heraeus Megafuge 16	Heraeus Instruments
Kühl-Gefrier-Kombination	Liebherr GmbH
Lichtmikroskop DM 2000	Leica DMIL Microsystems
Microplate Reader SpectraMax® iD5	Molecular Devices
Mini-PROTEAN® Tera Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH
NanoDrop™ One Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific GmbH
PCR Real-Time, CFX Connect™	Bio-Rad Laboratories GmbH
PCR Workstation Pro	Peqlab Biotechnologie GmbH
Pipette Pipetman® 0,1-1000µl	Gilson S.A.S.
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG
Polytron®System PT1200 E	Kinematica AG
Power Pac Basic 300	Bio-Rad Laboratories GmbH
Sicherheitswerkbank Herasafe HS12	Heraeus Instruments GmbH
SDS-PAGE Kammer Model: 45-1614-i	PeqLab

Thermocycler PeqStar	PeqLab Biotechnologie GmbH
Tischzentrifuge Fresco 21	Heraeus Instruments GmbH
Transblot SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories GmbH
Vortex	PAA Laboratories GmbH
Automatisierter Zellzähler LUNA-II™	Logos Biosystems
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH

3.1.9 Herstellernachweis

Abcam, Cambridge, UK

Advansta, Menlo Park, CA, USA

Agfa, Köln, Deutschland

Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, USA

Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA

Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main, Deutschland

Cytiva, Global Life Sciences Solutions Operations UK Ltd, Buckinghamshire, UK

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

Eurogentec, Köln, Deutschland

Dianova, Hamburg, Deutschland

GE Healthcare, Chicago, IL, USA

Gibco BRL / Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland

Gilson S.A.S. Frankreich

Greiner, Frickenhausen, Deutschland

Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan

Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, Deutschland

Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland

Invitrogen, Waltham, MA, USA

Keyence, Osaka, Japan

Kinematica AG, Luzern, Schweiz

Leica DMIL, Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Logos Biosystems, Villeneuve d'Ascq, Frankreich

Lonza, Wakersville, MD, USA

Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland

Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA

Molecular Devices, San Jose, CA, USA

Molecular Probes, Eugene, OR, USA

Mølgaard Medical, Risø, Dänemark

New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland

OriGene Technologies GmbH, Herford, Deutschland

PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau, Deutschland

Promega GmbH, High-Tech-Park, Mannheim, Deutschland

Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Roche, Eppstein, Deutschland

Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Synvolux Products & Therapeutics, Leiden, Niederlande

Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland

Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Deutschland

VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland

Whatman plc, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung und Behandlung der Tumorzelllinien

Kultivierung, Ablösung und Zellzählung

Die Tumorzelllinien CAL-27, SSC-9, SCC-15 und SCC-25 wurden mit den passenden Zellkulturmedien (siehe Kapitel 3.1.5 Zelllinien und Zellkulturmedien) bei 37°C und 10% CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Die Kultivierung der einzelnen Tumorzelllinien erfolgte jeweils in separaten Zellkulturflaschen (550ml) mit je 20ml Nährmedium. Ein Wechsel der Nährmedien erfolgte nach 48h sowie eine Kontrolle des Zellwachstums mit dem Mikroskop. Damit man die Zellen, die sich adhären am Zellkulturflaschenboden befanden, ablösen konnte, musste vorab das Zellkulturmedium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und danach zweimal mit je 10ml PBS gewaschen werden. Daraufhin wurden die Zellen mit 5ml Accutase-Lösung 5min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dies führt dazu, dass sich die Tumorzellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche ablösen. Abschließend wurde noch ein serumhaltiges Medium hinzugefügt, welches die enzymatische Aktivität der Accutase stoppt. Durch Zugabe von weiterem 10ml Nährmedium und durch das mehrfache Auf- und Abziehen, welche noch weitere adhären Zellen löste, entstand eine Zell-Suspension. Diese Zell-Suspension wurde in ein steriles 15ml – Falcon-Röhrchen überführt und anschließend erfolgte die Zellzählung. Die Zellzählung erfolgte entweder durch eine Neubauer-Zählkammer oder den automatisierten Zellzähler LUNA-II™. Bei der Neubauer Zählkammer wurden 10µl Zell-Suspension auf die Kammer transferiert und vier Großquadrate ausgezählt. Durch die Multiplikation des Durchschnittswertes mit dem Faktor 1000 (abhängig durch die Art der Zählkammer), erhielt man die Zellzahl pro Milliliter. Hingegen erfolgte bei dem Zellzähler LUNA-II™ eine automatische Zellzählung, indem man 50µl Zellsuspension mit 50µl Trypan-blau-Lösung 0,4% in ein Eppendorf-Tube mischte und in den Zellzähler überführte. Durch die Zellzählung konnte die entsprechend benötigte Zellmenge für die weiteren geplanten Experimente entnommen werden.

Behandlung der Tumorzelllinien mit Cisplatin

Die Tumorzelllinie SSC-9 wurde für weitere Testungen verwendet und wurde vor der Inkubation mit Cisplatin mit siRNA behandelt. Danach erfolgte die eigentliche Behandlung mit Cisplatin. Die Tumorzellen wurden in 6-well-Platten verteilt und bis zu einer 60-80% Konfluenz

kultiviert. Es erfolgte ein Tag davor noch die Behandlung mit PON2- und Kontroll-siRNA. Für die Inkubation mit Cisplatin wurde eine Konzentration von 4µg/ml Cisplatin im Zellkulturmedium gewählt. Das Cisplatin wurde durch die Apotheke der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt. Das vorhandene Medium wurde abgesaugt und anschließend durch das platinhaltige Medium ersetzt. Nach jeweils 24h und 48h wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und weiter für die Protein- bzw. RNA-Extraktion, die Messung der Aktivität von Caspase 3/7 und die Messung von intrazellulären ROS-Spiegel verwendet.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

Extraktion von Proteinen aus Tumorzellen

Nachdem die Tumorzellen in den 6-well-Platten verteilt und bis zu einer 60-80% Konfluenz kultiviert wurden, wurden die Platten auf Eis gestellt, das Nährmedium entfernt und wie folgt behandelt: Zweimalige Spülung mit kaltem PBS-Puffer (137mmol/l NaCl, 3mmol/l KCl, 10mmol/l Na₂HPO₄, 2mmol/l KH₂PO₄, pH7,4), danach gekühlter RIPA-Puffer (250mM NaCl, 2mM EDTA, 200mM Tris pH7,4, 1% Triton X-100, 1% Na-Deoxycholat, 0,1% SDS, 4% Complete Protease Inhibitor/Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2,5mM PMSF, gelöst in H₂O) hinzu und die Tumorzellen bei 4°C für 20min schüttelnd lysiert. Die Zellen wurden mit einem Cell Scraper gelöst und mit 50U/ml Benzonase (EC number: 3.1.30.2) zum DNA-Auflösen hinzugegeben. Somit wurde vermieden, dass die freigesetzte DNA aus den Zellen die Lysate viskös werden ließ. Das Lysat wurde für weitere 5min auf Eis belassen, danach wurde es in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Eppendorf-Gefäße wurden bei 10.000U/min bei 4°C für 10min zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Diese wurden wiederum in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C im Gefrierschrank gelagert oder für die Quantifizierung der Proteinkonzentration weiterverwendet.

Quantifizierung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BCA-kit (siehe 3.1.3 Gebrauchsfertige Reagenzien) gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Proteine reduzieren Cu²⁺ zu Cu¹⁺ und durch Bicinchoninsäure (BCA) kann dies kolorimetrisch nachgewiesen werden.

Im Vergleich zur Bradford-Methode in Bezug auf die Bestimmung der Proteinkonzentration werden bei der Verwendung des BCA-kit's die Ergebnisse der Messung nicht durch Detergenzien verfälscht. Da PON2 ein eher lipophiles Protein ist, müsste keine zusätzliche Zugabe von Detergenzien erfolgen. Für die Analyse wurde in eine 96-well-Platte pro well 25µl Proben- und 200µl Färbelösung gegeben. Die Färbelösung wurde laut Angaben des Herstellers aus den Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 ((v/v) Reagenz A : Reagenz B) angesetzt. Auch wurde bei jeder Bestimmung der Konzentration eine Eichreihe angesetzt, in der bekannte Proteinmengen (0 – 5µg) an BSA als Dreifachwert mit demselben Reagenz mitangesezt wurde. Danach erfolgte eine Inkubation der 96-well-Platte bei 37°C für 30min im Brutschrank. Anschließend, nach Abkühlen der 96-well-Platte auf Raumtemperatur, wurde mittels Microplatte Reader SpectraMax® iD5 (siehe 3.1.8 Geräte) bei einer Wellenlänge von 562nm gemessen. Die bestimmten optischen Dichten der verschiedenen Proben wurden graphisch gegen die im Test vorkommenden bekannten Proteinkonzentrationen aufgetragen, somit war es möglich die Berechnung des Proteingehalts der Proben aus der entstandenen Kurve zu ermitteln.

Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine analytische Methode, die es ermöglicht einzelne Proteine aus einem Proteingemisch nach ihrem spezifischen Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Dies erfolgt in abgeleiteter Form entsprechend der Originalmethode von Laemmli (158). Die Proteinlösung wird mit dem anionischen Detergenz SDS behandelt und es entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe, die ein konstantes Ladung-Masse-Verhältnis aufweisen. Die Menge an SDS, welche an Proteine gebunden ist, ist proportional zur Größe der Proteine (Proportionalität zwischen Proteingröße und Ladung des SDS-Protein-Komplexes). Durch weitere Chemikalien wie DTT oder β-Mercaptoethanol werden Proteine denaturiert und somit ein Protein-Protein-Wechselwirkung verhindert. Die Proteine weisen gleiche hydrodynamische Eigenschaften, aber Unterschiede in ihrer Masse auf. Die SDS-Protein-Komplexe wandern in der SDS-PAGE im elektrisch angelegten Spannungsfeld von Kathode zur Anode. Dabei dient die Polyacrylamidmatrix als molekulares Sieb und die Proteine werden nach Stokes-Radius aufgetrennt. Für die SDS-PAGE wurde eine Gelkammer (siehe Kapitel 3.1.8 Geräte) benutzt. Das Trenngel hatte eine Konzentration von 12% und das Sammelgel von 5%. Für beide Gele wurde eine Stammlösung aus 30% Acrylamid-/Bisacrylamidlösung benutzt. Die Endkonzentration im Trenngel war 375mM Tris/HCl pH8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,001% (v/v) TEMED und 0,001% (w/v) APS. Zuerst wurde das Trenngel gegossen. Dabei wurde durch

Zugabe von APS und TEMED die Polymerisierung initiiert. Danach wurde das Sammelgel gegossen und durch das Hinzufügen von 30µl Bromphenolblau wurden die Sammeltaschen im Gel besser dargestellt. Vorab wurden die Proben mit ¼ Vol. des Probenvolumens mit 5x SDS-Ladepuffer gemischt, bei 90°C für 5min denaturiert und dann in die Taschen des Sammelgels hineinpipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung lief mit 100mA/Gel für 4h oder mit 10mA/Gel für 16h unter Kontrolle der Temperatur. Außerdem kam die Mini-PROTEAN® Tetra Cell Gelkammer mit den Mini-Protean® TGX™ Gele von der Firma Bio-Rad zum Einsatz. Die verschiedenen Proteinproben wurden mit dem Laemmli-Puffer im Verhältnis 4:1 angesetzt und bei 90°C für 5min denaturiert. Sowohl 10µl Probengemisch als auch 10µl Rainbow Marker (Bestimmung des Molekulargewichts) wurden in die Sammelgeltaschen hineinpipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung lief mit 20mA für 10min, dann mit 40mA für 45min. Um die Proteinbanden besser sichtbar zu machen, wurde im Anschluss das Gel mit Coomassie-Brillantblau angefärbt.

Western blot – Immunologischer Proteinnachweis

Der Western blot, auch Immunoblot genannt, ist ein Verfahren, das zum Nachweis von Proteinen durch Übertragung auf eine Trägermembran benutzt wird. Neben dem Nachweis spezifischer Proteine kann der Western blot auch zur Quantifizierung des Proteingehalts verwendet werden. Somit konnte in dieser Studie der PON2-Gehalt der Tumorzelllinien CAL-27, SSC-9, SCC-15 und SCC-25 untersucht und untereinander verglichen werden. Nach der Durchführung der SDS-PAGE werden die Proteine, welche sich im Gel befinden, durch das Blotting auf eine Trägermembran übertragen. Nachdem eine Spannung angelegt wurde und ein elektrisches Feld vorlag, wurden die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf die Trägermembran transferiert. Dabei ist die Position der Proteine auf der Membran die gleiche wie im Polyacrylamid-Gel. Durch Verwendung spezifischer Antikörper konnten die Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Vorab wurde die freie Membranoberfläche mit einer Proteinlösung abgesättigt, damit es nicht zu einer unspezifischen Antikörper-Bindung kommt. Durch einen weiteren, sekundären Antikörper und durch Chemilumineszenz konnte man die Proteinbanden anschaulich machen. Da diese Methode eine hohe Sensitivität aufweist, konnte das endogene PON2 noch in geringen Zellextrakten (bis zu 5µg) nachgewiesen werden.

In einer semi-dry-transfer Kammer von BioRad wurde der gelelektrophoretische Transfer mit einem diskontinuierlichen Puffersystem, welches aus drei verschiedenen Blotting-Puffern (siehe Kapitel 3.1.7 Reagenzien, Lösungen, Medien und Puffer) besteht, durchgeführt. Nach

der Auftrennung in der SDS-Page wurde das Polyacrylamid-Gel für 15min in Kathodenpuffer inkubiert. Eine PVDF-Membran wurde mit Methanol gereinigt, für 5min in aqua dest. und für 10min in Anodenpuffer II gelegt. Anschließend wurde das Gel auf die vorbehandelte PVDF-Membran gelegt. Acht Whatman-Papiere wurden passend auf die Gel- und PVDF-Größe zugeschnitten. Vier Papiere wurden in Kathodenpuffer und jeweils zwei Papiere in Anodenpuffer I und Anodenpuffer II für je 10min gelegt. Ein geschichteter Ansatz, bestehend aus auf der Unterseite der semi-dry-unit gelegten zwei Whatman-Papiere aus Anodenpuffer I, darauf zwei weitere Whatman-Papiere aus Anodenpuffer II, die Membran mit dem darauf befindlichen Gel und abschließend noch die vier Whatmann-Papiere aus Kathodenpuffer, wurde erstellt. Der gelelektrophoretische Transfer erfolgte bei $3\text{mA}/\text{cm}^2$ Fläche des Gels in 4° gekühlten Transferpuffer für 20min. Im Anschluss wurde die PVDF-Membran mit Blocking Puffer (siehe Kapitel 3.1.7 Reagenzien, Lösungen, Medien und Puffer) bei Raumtemperatur für 1h unter Schütteln inkubiert, damit es nicht zu unspezifischen Bindungen von Antikörpern an Proteine, welche an der Membran verankert sind, führt. Die weitere Behandlung der Membran erfolgte entweder durch Schütteln bei Raumtemperatur oder durch über Nacht-Inkubation bei 4°C mittels einem End-Over-End-Mixer. Der primäre α -PON2 Antikörper wurde im Verhältnis 1:3000 in Blocking-Puffer angesetzt und für mindestens 2h oder über Nacht mit der Membran inkubiert. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen der Membran mit TBS-Puffer für je 10min. Die Membran wurde mit einem weiteren sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in Blocking-Puffer für mindestens 1h inkubiert. Es erfolgte noch ein weiterer, abschließender Waschvorgang, ebenfalls dreimalig mit TBS-Puffer für je 10min. Die durch die Antikörperreaktion detektierten Proteine wurden mittels ECL Western Blot Detection kit (siehe Kapitel 3.1.3 Gebrauchsfertige Reagenzien) sichtbar gemacht. Die Meerrettich-Peroxidase, welche am sekundären Antikörper angeheftet ist, setzt das Substrat, das sich in der Lösung befindet, um und es entsteht ein Chemilumineszenz-Signal. Die Signalstärke korreliert mit der Proteinmenge, somit lässt sich ein relatives Mengenverhältnis berechnen. Es wurde bei den Western blots neben der PON2-Bestimmung noch zusätzlich ein Nachweis von Aktin durchgeführt. Da Aktin ein Zytoskelett-Bestandteil ist, sollte die Expression von Zytoskelett-Anteilen konstant sein und keinen Schwankungen unterliegen. Gleiche Mengen an Aktin im Reaktionsansatz geben an, dass auch gleiche Mengen an Gesamtprotein aufgetragen wurde (gleichgroße Chemilumineszenz-Signalstärke). Der primäre Aktin-Antikörper wurde jeweils im Verhältnis 1:2000 in Blocking-Puffer angesetzt und für mindestens 2h oder über Nacht mit der Membran inkubiert. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen der Membran mit TBS-Puffer für je 10min. Die Membran wurde mit einem weiteren sekundären Antikörper in einer Verdünnung

von 1:5000 in Blocking-Puffer für mindestens 1h inkubiert. Es erfolgte noch ein weiterer, abschließender Waschvorgang, ebenfalls dreimalig mit TBS-Puffer für je 10min. Die durch die Antikörperreaktion detektierten Proteine wurden mittels ECL Western Blot Detection kit sichtbar gemacht. Nach Abschluss des Nachweises wurden die Membranen entweder bei 4°C in TBS mit 0,1% NaN₂ oder bei -20°C asserviert.

Western blot – Stripping

Beim Stripping eines Western blots wird die Membran von primären und sekundären Antikörpern befreit und es können weitere andere Proteine auf demselben Blot untersucht werden. Die an der Membran anheftenden Antikörper werden durch den im Stripping-Puffer enthaltendes β -Mercaptoethanol biochemisch entfernt. Eine Wiederverwendung ist durch anschließende Behandlung der Membran mit Blocking-Puffer möglich. In der Regel kann der Strippingvorgang bis zu fünfmal durchgeführt werden. Dabei wurde die Membran bei 50°C für 30min in Stripping-Puffer (siehe Kapitel 3.1.7 Reagenzien, Lösungen, Medien und Puffer) unter geringer Rotation im Brutschrank inkubiert. Es erfolgte ein fünfmaliges Waschen der Membran mit TBS-Puffer bei Raumtemperatur für je 10min. Durch diesen Vorgang wurde das β -Mercaptoethanol annähernd vollständig entfernt. Entweder konnte man nun die Membran bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahren oder eine erneute Testung auf andere Proteine auf der Membran durchführen.

Western blot – Quantifizierung der Proteinmenge

Bei der Proteinquantifizierung misst man die Konzentration der Proteine in einer Probe. Dabei kann man eine genaue Bestimmung der Konzentration sowohl der absoluten als auch der relativen Proteinmenge im Verhältnis zu Aktin über die Chemilumineszenz-Messung ermitteln. Das Western lightning Chemiluminescent Reagent Plus wurde nach der SDS Page und dem Western blot eingesetzt. Die Messung und Bestimmung der Proteinmenge auf der Membran wurden dann anschließend mit dem ChemiDoc™ XRS+ System durchgeführt. Nach der Durchführung des Western blots wurde die Membran dreimal für je 10min mit TBS-Puffer gereinigt und auf eine Messunterlage umgebettet. Danach wurde der Western blot mit dem Western lightning Chemiluminescent Reagent Plus benetzt und für 1min inkubiert. Da neben den Proben auch noch „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ und / oder „ECL™ Rainbow™

Marker-Full Range“ aufgetragen wurde, konnte man die Membran bei 48kDa mit einem Westernbright™ ChemiPen™ markieren. Um eine Kontamination der Messkammer mit dem Reagenz zu verhindern, wurde die Membran mit einer Klarsichtfolie bedeckt. Danach wurde die Messunterlage mit der Membran in die Messkammer des ChemiDoc™ XRS+ Systems gelegt. Durch die Analysekamera wurde sowohl die Ausrichtung als auch die Zentrierung und die Fokussierung optimal eingestellt. Die Belichtungszeit betrug eine Zeitspanne von 15sec bis max. 10min und während der Aufnahmen konnte eine Kontrolle bzw. Adaptation der Einstellung erfolgen. Es entstanden unter verschiedenen Belichtungszeiten verschiedene Aufnahmen, die durch die Analysekamera in der Messkammer aufgenommen wurden. Durch die Auswertungs-Software „Quantinty One 1-D Analysis Software“ wurde neben der Detektion der Proteinbanden auch anhand der Chemilumineszenz-Signalstärken die Quantifizierung der Proteine ermittelt. Im Vergleich zwischen den Signalstärken des zu untersuchenden Proteins mit Aktin konnte man dann auf die relative Proteinmenge der Proben rückschließen (relative Menge nach Normalisierung zu Aktin).

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

Ribonukleinsäure-Interferenz-Behandlung (RNAi) von Tumorzellen

Eine RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Mechanismus in der Zelle, der die Genexpression zielgerichtet abschaltet. Diese Methode funktioniert durch Behandlung der Zellen mit kurzen doppelsträngigen Ribonukleinsäuren (siRNAs). Diese siRNAs lagern sich zielgerichtet an die entsprechende mRNA an und es kommt zu einer Zersetzung der mRNA. Dabei wurde das „si Transfection Reagent SAINT RED“ gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet. Neben dem siRNA-Ansatz gab es noch zwei weitere Ansätze, eins mit unbehandelt belassenen Zellen und eins mit einer zusätzlichen Kontroll-siRNA. Bei der Kontroll-siRNA wurde zwar eine zelluläre Reaktion auf Basis des Transfektionsmechanismus ausgelöst, aber es fand keine Degradation statt, da diese nicht komplementär zur bekannten Gensequenz ist. Nach Durchführung mehrere Kontrollversuche zeigte sich, dass das gezielte Ausschalten der PON2-Genexpression am stärksten an Tag 3 nach der Behandlung mit siRNA war. Somit wurde die Behandlung der Zellen mit siRNA zeitlich bei der Kultivierung der Tumorzellen mitberücksichtigt.

Vor der eigentlichen Behandlung mit siRNA wurden die Tumorzellen (siehe Kapitel 3.2.1 Kultivierung und Behandlung der Tumorzelllinien – Kultivierung, Ablösung und Zellzählung)

mit PBS gewaschen, mit Accutase-Lösung gelöst und in der Zellsuspension gezählt. Im Anschluss wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen in 1ml Nährmedium gelöst, in mehreren 6-well-Platten ausgesät und bis zu einer 60-80% Konfluenz kultiviert. Nach Kontrolle der Zelldichte wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit einem Nährmedium-Reaktionsansatz (700µl Nährmedium und 100µl Reaktionsansatz) inkubiert. Der Reaktionsansatz wiederum bestand einerseits aus 98µl Puffer und 2µl PON2-siRNA bzw. Kontroll-siRNA. Dann wurden noch weitere 3,6µl RNAinfect, welches sich ebenfalls im Kit befand, dazugegeben, gemischt und bei Raumtemperatur für 20min inkubiert. Nach dem Hinzufügen des Reaktionsansatzes wurden die Zellen 24h im Brutschrank kultiviert und dann wurde das Nährmedium gewechselt. Anschließend konnten die nun vorbehandelten Tumorzellen für die als nächstes anstehenden Testungen weiterverwendet werden.

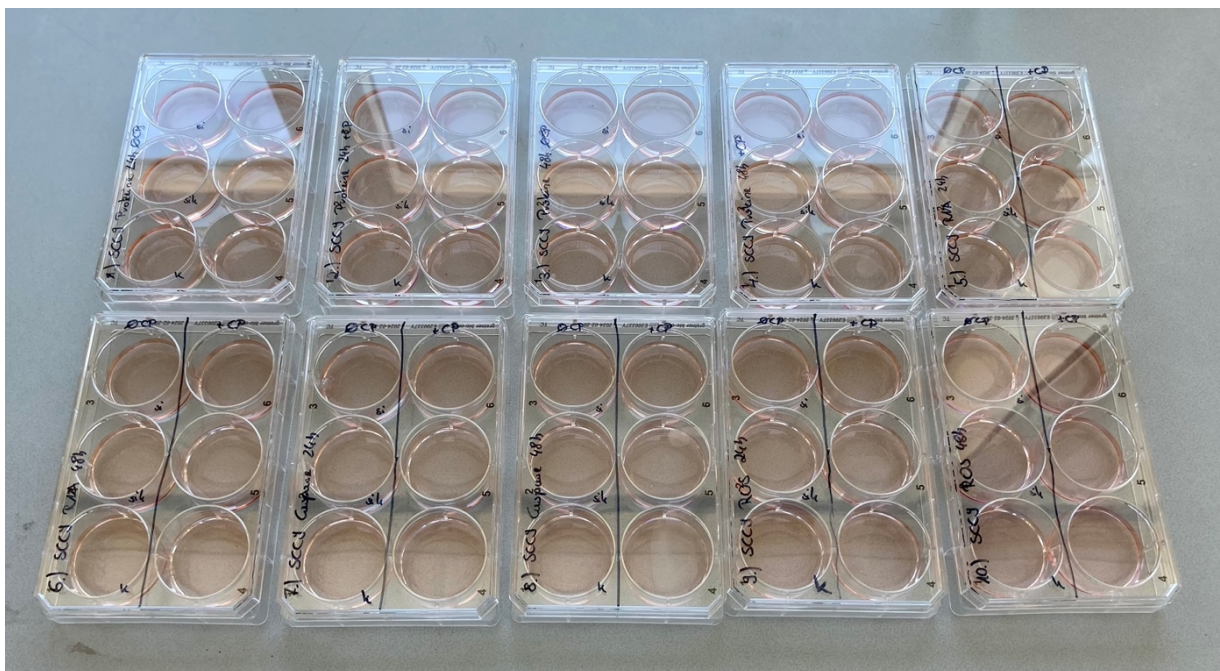


Abbildung 6: Vorbehandlung der Tumorzellen in Zellkulturansätze

Die Tumorzellen wurden in mehreren 6-well-Plattten ausgesät und bis zu einer 60-80% Konfluenz kultiviert. Nach Kontrolle der Zelldichte wurden jeweils drei Zellgruppen erstellt und mit einem Reaktionsansatz behandelt und inkubiert: 1. si: Reaktionsansatz mit PON2-siRNA; 2. sik: Reaktionsansatz mit Kontroll-siRNA; 3. k: Unbehandelt belassene Zellen. Anschließend konnten die vorbehandelten Tumorzellen für die nächsten anstehenden Testungen weiterverwendet werden.

Extraktion von Ribonukleinsäure (RNA) aus Tumorzellen

Zur Extraktion von Ribonukleinsäure (RNA) aus den Tumorzellen wurde das von der Firma Qiagen RNeasy® Mini Kit gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet. Es wird ein Lysat hergestellt und diesem Ansatz Ethanol hinzugefügt, das die selektive Bindung von RNA an die RNeasy-Membran fördert. Die Probe wird auf die RNeasy Mini-Spinsäule aufgetragen und die RNA bindet an die Membran, welche in der Mini-Spinsäule verankert ist. Durch anschließende Waschvorgänge werden Verunreinigungen herausgewaschen. Zum Schluss wird die RNA von der Membran gelöst und in eine RNase-freiem Wasser eluiert. Im nächsten Schritt konnte eine Konzentrationsbestimmung der isolierten Ribonukleinsäure erfolgen. Die RNA-Proben konnten bei -20°C bzw. -80°C im Gefrierschrank für die weitere Verwendung gelagert werden.

Konzentrationsbestimmung von Ribonukleinsäure (RNA)

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die aus den Tumorzellen extrahierte Ribonukleinsäure (RNA) mit dem NanoDrop™ (siehe Kapitel 3.1.8 Geräte) gemessen. Das NanoDrop™ Spektralphotometer ist eine Messeinheit indem die Konzentration und Reinheit von Desoxyribonukleinsäure, Ribonukleinsäure und Proteinen ermittelt werden kann. Zur Messung wird nur eine geringe Probenmenge (Probenvolumen 1 bis 2µl) benötigt. Der in dem Kit enthaltene EB-Puffer wurde zur Leerwert-Messung verwendet.

Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) – Bestimmung der Genexpression

Die Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ist ein molekularbiologisches Verfahren, das die reverse Transkription mit quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion kombiniert, um die RNA-Expression zu quantifizieren. Es dient zur Messung der RNA-Menge in einer Probe und kann auch zum Nachweis spezifische RNA-Ziele eingesetzt werden. Die Quantifizierung gelingt durch die Verwendung von Sonden, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I gekoppelt sind. Die Messung erfolgt in Echtzeit, wobei die Fluoreszenz-Signale proportional zur Nukleinsäure-Menge, die durch die PCR amplifiziert werden, ist. Vorab muss die extrahierte RNA mit Hilfe der reversen Transkription in eine stabilere cDNA umgewandelt werden.

Das Enzym reverse Transkriptase (EC number: 2.7.7.49) schreibt aus einer einzelsträngigen RNA eine doppelsträngige cDNA. Damit die reverse Transkriptase starten und umwandeln kann, wird zum Start ein DNA-Primer benötigt. Vom 3'-Ende des Primers wird die cDNA, die komplementär ist, erstellt. Damit eine Replikation und eine Transkription stattfinden kann, wird der neu entstandene Strang mit RNAsen versetzt, um den RNA-Strang abzubauen. Die verbleibenden RNA-Sequenzteile dienen bei der DNA-Polymerase I als Primer um den cDNA-Strang in eine doppelsträngige DNA umzuwandeln. Somit kann die resultierende DNA weiterverwendet oder gelagert werden.

Zur Herstellung der komplementären Desoxyribonukleinsäure wurde das von der Firma Bio-Rad iScript™ cDNA-Kit gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet. 100ng RNA pro Probe wurde eingesetzt, um sie von RNA in cDNA umzuschreiben. Die Proben wurden entsprechend mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15µl verdünnt. Eine 96-well-Platte wurde verwendet und pro well ein Ansatz von 20µl Gesamtvolumen hinein pipettiert. Der Ansatz von 20µl Gesamtvolumen bestand aus 5µl Mastermix (1µl iScript Reverse Transkriptase und 4µl 5x iScript Reaction Mix) und 100ng RNA in 15µl RNase-freiem Wasser. Danach wurde die 96-well-Platte mit einer durchsichtigen Klebefolie abgedeckt und die PCR im Thermocycler gestartet. Die entstandene cDNA konnte nun weiter verwendet werden oder bei -20°C im Gefrierschrank gelagert werden.

Für die qRT-PCR wurde das von der Firma Biorad iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix System gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet. Ebenfalls wurde eine 96-well-Platte verwendet und die Pipettierung der einzelnen Lösungskomponenten wurde auf Eis durchgeführt. Pro well wurde ein Ansatz von 20µl Gesamtvolumen hinein pipettiert. Der Ansatz von 20µl Gesamtvolumen bestand aus 2µl cDNA und 18µl Mastermix (11µl iTaq Universal SYBR Green Supermix, 5µl RNAase-freies Wasser und je 1µl der entsprechenden Sense- und Antisense-Primer). Neben dem PON2-Primer wurde noch ein Aktin-Primer verwendet (Normalisierung der Werte). Danach wurde die 96-well-Platte mit einer durchsichtigen Klebefolie abgedeckt und die PCR im Thermocycler gestartet. Das PCR-Programm war wie folgt: 1x (50°C 3min, 95°C 15min); 40x (95°C 30sec, 60°C 30sec, 60°C 30sec). Nach Abschluss der PCR wurde die Menge an amplifizierte RNA anhand des Fluoreszenz-Signals gemessen und berechnet.

3.2.4 Messung von Caspase 3/7 Aktivität der Tumorzellen

Zur Messung der Apoptoserate wurde der Caspase-Glo® 3/7 Assay von der Firma Promega (siehe Kapitel 3.1.3 Gebrauchsfertige Reagenzien) gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet. Der homogene Assay misst die Caspase 3/7 Aktivität und basiert auf Chemilumineszenz-Verfahren. Die Zugabe des Caspase-Glo® 3/7-Reagenzes führt zur Lyse der Zellen und dabei werden die in den Zellen enthaltenen Caspase 3/7 freigesetzt. Wiederum setzen die freigesetzten Caspasen ein luminogenes Substrat in Licht um. Die Menge des leuchtenden Lumineszenzsignal, die umgesetzt und erzeugt wird, ist proportional zur Caspaseaktivität und kann mittels eines Luminometer gemessen werden. Somit lassen sich die Apoptoseraten innerhalb der untersuchten Tumorzellen analysieren. Im Versuchsaufbau wurden 5000 Zellen/well in eine weiße 96-well-Platte überführt und bei 37°C für 24h im Brutschrank kultiviert. Für die Messung wurde die 96-well-Platte aus dem Brutschrank entnommen und auf Raumtemperatur gebracht. 75µl Caspase Glo Reagenz wurde pro well hinzugegeben, die 96-well-Platte verschlossen und für 30s bei 300-500rpm gemischt. Nach einer 60min Inkubationszeit erfolgte dann das Auslesen und die Lumineszenz-Messung mittels Microplate Reader Spectramax® iD5 (siehe Kapitel 3.1.8 Geräte).

3.2.5 Messung von intrazellulärer ROS-Spiegel in Tumorzellen

Mit dieser Methode lässt sich der intrazelluläre ROS-Spiegel in den oralen Plattenepithelkarzinomzellen bestimmen. Die Testung erfolgte mit ROS-Reporter Carboxy-H₂DCFDA, da dieser durch intrazelluläre Esterasen (EC number: 3.1.1.-) aktiviert wird und somit nur intrazelluläre ROS analysiert werden. Mit einem Fluometer wurde kontinuierlich der intrazelluläre ROS-Spiegel über einen Zeitraum von 30min gemessen. Im Versuchsaufbau wurden ein Tag vor der Messung jeweils $2,5 \times 10^4$ Zellen pro well in eine 96-well-Platte überführt und bei 37°C für 24h im Brutschrank kultiviert. Am Tag der Messung wurden die Zellen vorab in den wells mit HBSS gewaschen und dann mit 2,5nmol/l Carboxy-H₂DCFDA für die Dauer von 30min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde nochmal mit HBSS gewaschen und dann der Versuchsansatz mit 10µmol/l DMNQ zur Kontrolle versetzt. Abschließend wurde das Fluoreszenzsignal bei 480nm/510nm mittels Fluometer Fluostar optima (siehe Kapitel 3.1.8 Geräte) bei 37°C gemessen.

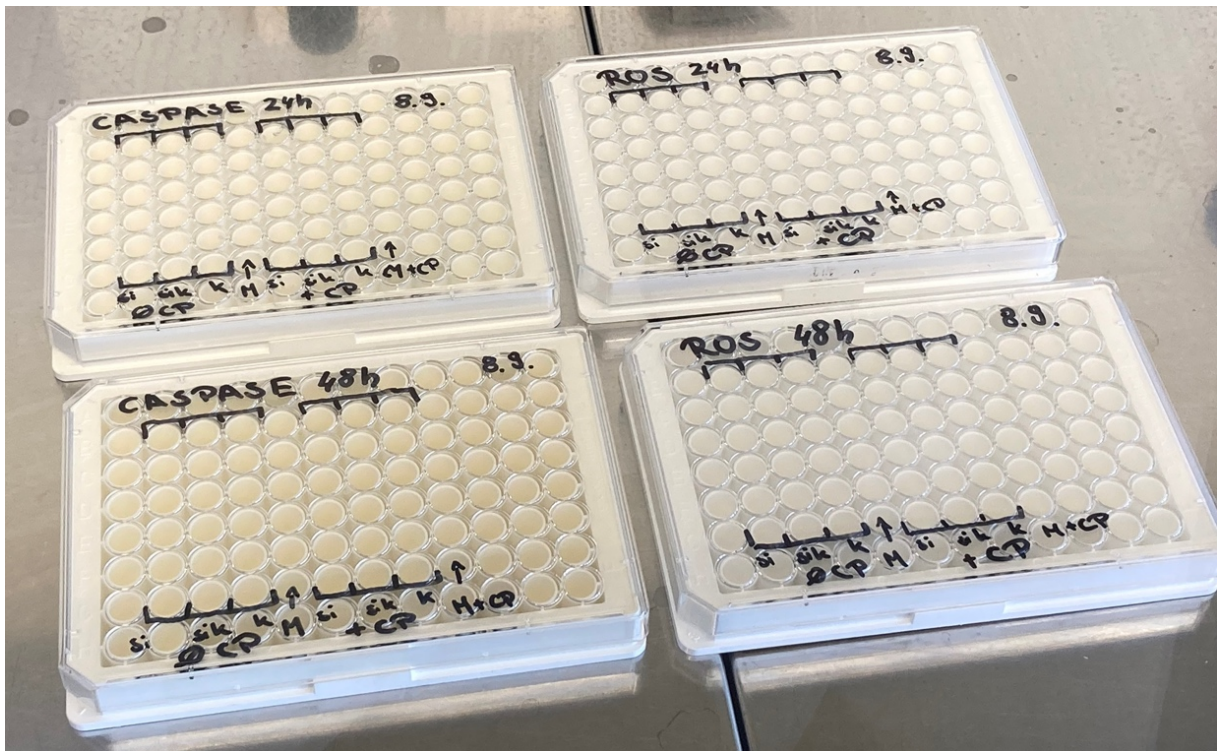


Abbildung 7: Zellkulturansätze für die Messung von Caspase 3/7 Aktivität und intrazellulärer ROS-Spiegel in Tumorzellen

Die Tumorzellen wurden in weiße 96-well-Platten überführt und bei 37°C für 24h im Brutschrank kultiviert. Die vorbehandelten Tumorzellen wurden von den 6-well-Platten in weiße 96-well Platten überführt und bei 37°C für 24h und 48h kultiviert. Danach erfolgten die Messungen sowohl der Caspase 3/7 Aktivität sowie der intrazellulären ROS-Spiegel in den Tumorzellen.

3.2.6 Durchführung statistischer Analysen

Die Graphiken, die in Kapitel 4 Ergebnisse gezeigt werden, wurden mit der Software *graph pad prism 6.0* und *SPSS®* erstellt. Die Berechnung der statistischen Signifikanzen erfolgte mittels „students t-test“ bzw. „one- oder two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison post-test“ (siehe entsprechende Legenden). Ein p-Wert von 0.05 wurde als statistisch signifikant festgelegt. Die Berechnungen wurden ebenfalls mit der oben aufgeführten Softwares durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Basale PON2-Expressionsanalyse in verschiedenen OSCC (*in vitro*)

Im ersten Versuchsteil wurde in einem *in vitro* – Versuch die basale PON2 Expression in verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien (CAL-27, SCC-9, SCC-15 und SCC-25) auf Proteinebene durch Western blot untersucht:

4.1.1 PON2-Expressionsanalyse mittels proteinbiochemischer Methode (*in vitro*)

Die basale PON2-Expression der oralen Plattenepithelkarzinomzellen wurden mittels Western blot analysiert. Dabei wurden die vier verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien untersucht: CAL-27, SCC-9, SCC-15 und SCC-25. Es wurden Antikörper gegen Paraoxonase 2 sowie Aktin verwendet.

Abbildung 8 zeigt den Western blot der entsprechenden Zellen. Dabei wurden in den einzelnen Tumorzelllinien jeweils Paraoxonase 2 und Aktin nachgewiesen. Paraoxonase 2 erscheint bei den einzelnen Tumorzelllinien mit unterschiedlich starken Signalen. Einige Tumorzelllinien zeigten eine erhöhte, andere eine geringere PON2-Expression. Dabei erscheinen die Banden breit und lassen höchstwahrscheinlich auf die bekannten PON2-Isoformen PON2-iso1 und PON2-iso2 schließen (116). Das optisch schwächste Signal weist SCC-25 auf. Das optisch stärkste Signal weist die SCC-9-Tumorzelllinie im Vergleich mit den anderen Zellen auf. Da Aktin in allen vier Tumorzelllinien als gleichstarke Banden bei 42 kDa erscheint, kann man davon ausgehen, dass überall gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. Eine quantitative Proteinmengenanalyse erfolgte anschließend.

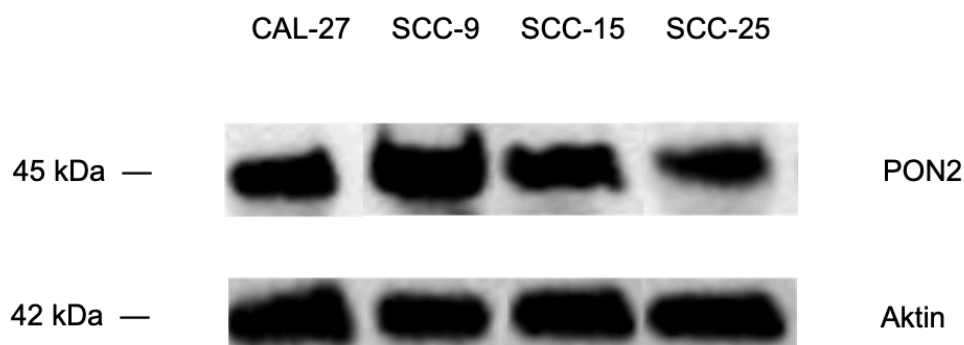


Abbildung 8: Basale PON2-Expression in verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinomzellen

Die Abbildung zeigt den Western Blot der Tumorzelllinien CAL-27, SSC-9, SCC-15 und SCC-25, anhand dessen die basale PON2-Expression untersucht wurde. Bei allen untersuchten Zelllinien konnte eine PON2-Expression (45 kDa) nachgewiesen werden, jedoch unterschiedlich stark. Dabei erscheint SCC-9 am stärksten und SCC-25 am schwächsten. Ebenfalls wurde noch Aktin (42 kDa) visualisiert. Da Aktin in allen vier Tumorzelllinien als annähernd gleichstarke Banden erscheinen, kann man davon ausgehen, dass überall gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

4.1.2 PON2-Expressionsanalyse – Quantitative Analyse (*in vitro*)

Abbildung 9 zeigt die quantitative Analyse der relativen Paraoxonase 2-Proteinexpression anhand des Western blots und Normalisierung zu Aktin. Die Zelllinie SCC-25 weist die am niedrigste basale PON2-Proteinexpression (MW: 0,87) auf im Vergleich zu CAL-27 (MW: 1,08) und SCC-15 (MW: 1,6). Die Zelllinie SCC-9 weist die höchste basale PON2-Proteinexpression (MW: 2,29) auf und eine mehr als doppelt so hohe Expression im Vergleich zu der Tumorzelllinie mit der niedrigsten Expression. Somit zeigt diese Analyse eine variable PON2-Expressionen (normalisiert zu Aktin) in den verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien.

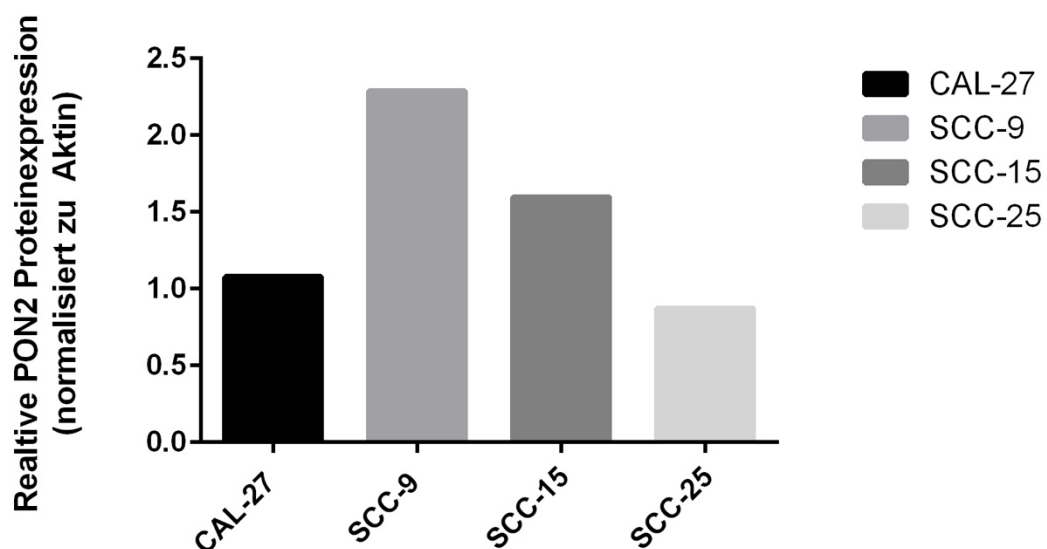


Abbildung 9: Quantitative Analyse der relativen PON2-Expression, normalisiert zu Aktin

Die quantitative Analyse der relativen PON2-Expression, normalisiert zu Aktin, wurde mit Hilfe von ChemiDoc™ bestimmt. Die Zelllinie SCC-25 weist die niedrigste basale PON2-Proteinexpression auf im Vergleich zu CAL-27, SCC-9 und SCC-15. Die Zelllinie SCC-9 wies die höchste basale PON2-Expression auf.

4.2 Weiterführende Analysen in OSCC (SCC-9) (*in vitro*)

Für weitere funktionelle Analysen wurde mit der Tumorzelllinie SCC-9 gearbeitet, da diese die höchste basale PON2-Expression aufwies. Im zweiten Versuchsteil wurde durch ein Genknockout PON2 in der SCC-9-Plattenepithelkarzinomzelllinie gezielt herunterreguliert und mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin (4µg/ml) inkubiert. Jeweils nach 24h und 48h erfolgten weiterführende Analysen in Form von RealTimePCR, Westernblots, Caspase- und ROS-Analysen:

4.2.1 PON2-Expressionsanalyse auf RNA-Ebene in OSCC (SCC-9) (*in vitro*)

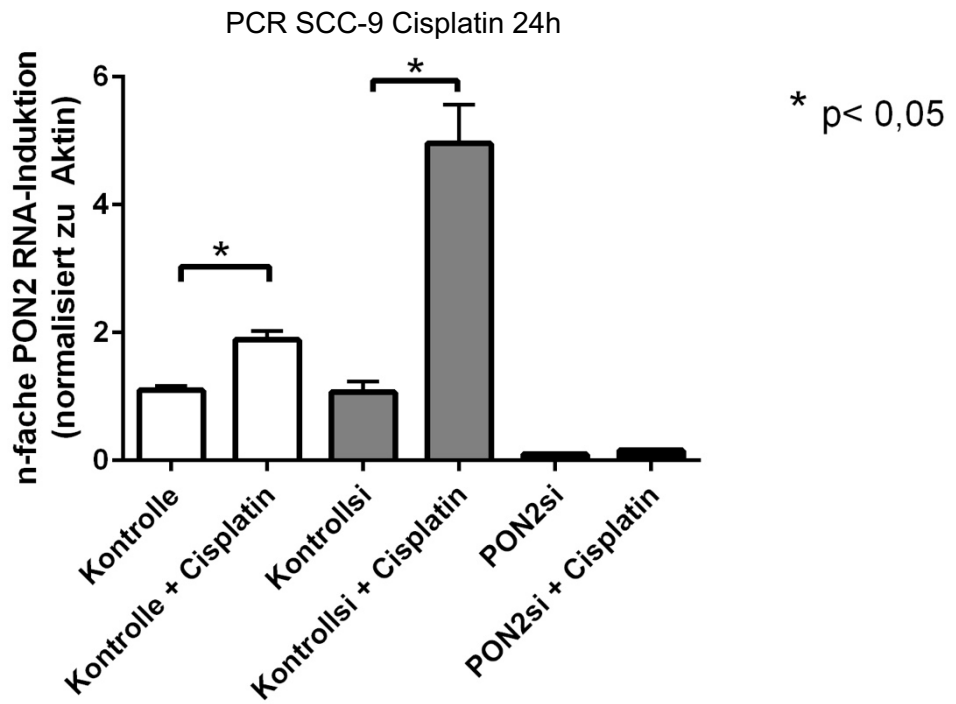
Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR der SCC-9 Tumorzellen. Die SCC-9 Tumorzellen wurden sowohl mit PON2-spezifischer als auch mit unspezifischer RNAi behandelt oder unbehandelt belassen. Nach der RNAi-Behandlung wurde ein Teil der SCC-9 Zellen mit 4µg/ml Cisplatin inkubiert. Die Ribonukleinsäure (RNA) wurde jeweils nach 24h und 48h aus den Tumorzellen extrahiert. Anschließend erfolgte die qRT-PCR, normalisiert zu Aktin.

Abbildung 10.1 zeigt die Ergebnisse für die SCC-9 Tumorzellen, die sowohl mit PON2-spezifischer als auch mit unspezifischer RNAi behandelt oder unbehandelt belassen wurden. Ein Teil der Tumorzellen wurde mit Cisplatin inkubiert und nach 24h ausgewertet. Als Ergebnis wird die Paraoxonase 2 RNA-Induktion, normalisiert zu Aktin, angezeigt. Für die PON2-si-behandelten Zellen war die PON2-RNA-Expression ohne Cisplatin mit einem MW von 0,096 ($\pm 0,004$) und mit Cisplatin mit einem MW von 0,156 ($\pm 0,019$) verglichen zu Aktin deutlich vermindert. Das Ergebnis der Analyse deutet auf eine erfolgreiche Herunterregulation der PON2-mRNA durch die si-RNA-Behandlung hin, wobei die Cisplatin-Inkubation keine relevante Änderung der PON2-RNA-Expression zu Folge hatte.

Die Kontroll-si-RNA-behandelten Zellen zeigten bei der PON2-RNA-Expression ohne Cisplatin einen MW von 1,069 ($\pm 0,169$) und mit Cisplatin einen MW von 4,956 ($\pm 0,605$). Die Cisplatin-Inkubation zeige eine statistisch signifikante Änderung der PON2-RNA-Expression (* $p < 0,05$). Die unbehandelt belassenen Zellen zeigten bei der PON2-RNA-Expression ohne Cisplatin einen MW von 1,10 ($\pm 0,065$) und mit Cisplatin einen MW von 1,89 ($\pm 0,132$). Die Cisplatin-Inkubation zeige eine statistisch signifikante Änderung der PON2-RNA-Expression (* $p < 0,05$). Sowohl bei den Kontroll-si-RNA-behandelten als auch bei den unbehandelt belassenen Zellen führte die Cisplatin-Inkubation zu einer Zunahme der Paraoxonase 2 RNA-Induktion.

Abbildung 10.2 zeigt die Ergebnisse für die SCC-9 Tumorzellen, die sowohl mit PON2-spezifischer als auch mit unspezifischer RNAi behandelt oder unbehandelt belassen wurden. Ein Teil der Tumorzellen wurde mit Cisplatin inkubiert und nach 48h ausgewertet. Als Ergebnis wird die Paraoxonase 2 RNA-Induktion, normalisiert zu Aktin, angezeigt. Für die PON2-si-behandelten Zellen war die PON2-RNA-Expression ohne Cisplatin mit einem MW von 0,11 ($\pm 0,008$) und mit Cisplatin mit einem MW von 0,163 ($\pm 0,034$) verglichen zu Aktin deutlich vermindert. Das Ergebnis der Analyse deutet auf eine erfolgreiche Herunterregulation der PON2-mRNA durch die si-RNA-Behandlung, wobei die Cisplatin-Inkubation keine relevante Änderung der PON2-RNA-Expression zu Folge hatte. Die Kontroll-si-RNA-behandelten Zellen zeigten bei der PON2-RNA-Expression ohne Cisplatin einen MW von 1,452 ($\pm 0,216$) und mit Cisplatin einen MW von 16,304 ($\pm 4,440$). Die Cisplatin-Inkubation zeige eine statistisch signifikante Änderung der PON2-RNA-Expression (* $p < 0,05$). Die unbehandelt belassenen Zellen zeigten bei der PON2-RNA-Expression ohne Cisplatin einen MW von 1,343 ($\pm 0,101$) und mit Cisplatin einen MW von 9,382 ($\pm 3,061$). Die Cisplatin-Inkubation zeigte eine statistisch signifikante Änderung der PON2-RNA-Expression (* $p < 0,05$). Sowohl bei den Kontroll-si-RNA-behandelten als auch bei den unbehandelt belassenen Zellen führte die Cisplatin-Inkubation zu einer Zunahme der Paraoxonase 2 RNA-Induktion. Der Vergleich zwischen den 24h und 48h Werten zeigt ebenfalls eine PON2-RNA-Expressionszunahme.

10.1



10.2

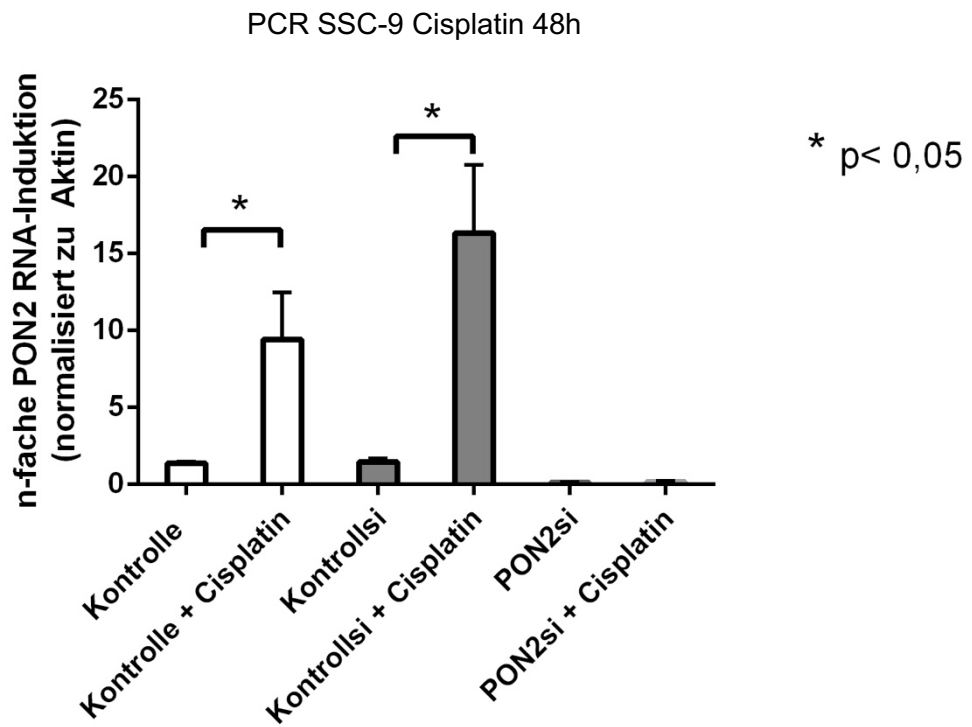
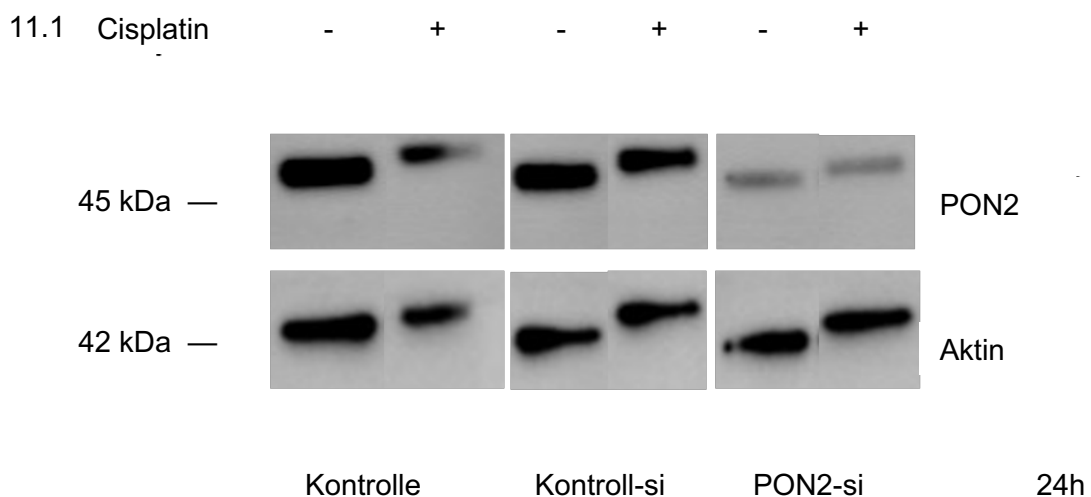


Abbildung 10: PON2-Expressionsanalyse auf RNA-Ebene in OSCC (SCC-9)

Nach Vorbehandlung der SCC-9-Zellen (PON2-si-RNA-behandelt, Kontroll-si-RNA-behandelt und unbehandelt belassen) wurden diese entweder unbehandelt belassen oder mit 4µg Cisplatin inkubiert. Jeweils nach 24h und 48h wurde RNA extrahiert und damit eine qRT-PCR durchgeführt. Die PON2-mRNA Expressionsergebnisse wurden zu Aktin normalisiert. Abbildung 10.1 zeigt die Ergebnisse nach 24 Stunden Cisplatin-Inkubation, während Abbildung 10.2 die Resultate nach 48 Stunden darstellt. Die Säulen in den einzelnen Diagrammen stellen Mittelwerte \pm SEM dar. Die Analyse der statistischen Signifikanz der unterschiedlichen Säulen in den Diagrammen erfolgte mittels „t-test“ (* $p < 0,05$).

4.2.2 PON2-Expressionsanalyse auf proteinbiochemischer Ebene in OSCC (SCC-9) (*in vitro*)

Abbildung 11 zeigt die proteinbiochemische Analyse von PON2 der SCC-9 Tumorzellen mittels Western blot. Die SCC-9 Tumorzellen wurden sowohl mit PON2-spezifischer als auch mit unspezifischer RNAi behandelt oder unbehandelt belassen. Nach der RNAi-Behandlung wurden die SCC-9 Zellen mit 4µg/ml Cisplatin inkubiert und die Proteine wurden jeweils nach 24h und 48h aus den Tumorzellen extrahiert. Anschließend erfolgte die proteinbiochemische Auftrennung und die Darstellung mittels Western blot. Die Inkubation mit Antikörper gegen PON2 und Aktin zeigt, dass die Menge an PON2 in den PON2-si-behandelten Zellen deutlich niedriger ist als in den Kontroll-si-RNA-behandelten Zellen und unbehandelt belassenen Zellen. Da die Signale für Aktin in allen Ansätzen annähernd gleich stark waren, kann man davon ausgehen, dass überall gleiche Proteinmengen aufgetragen wurde. Durch den Genknockout (Behandlung mit siRNA) wurde PON2 erfolgreich gezielt herunterreguliert, was in einer Reduktion der PON2-Protein-Menge spiegelt.



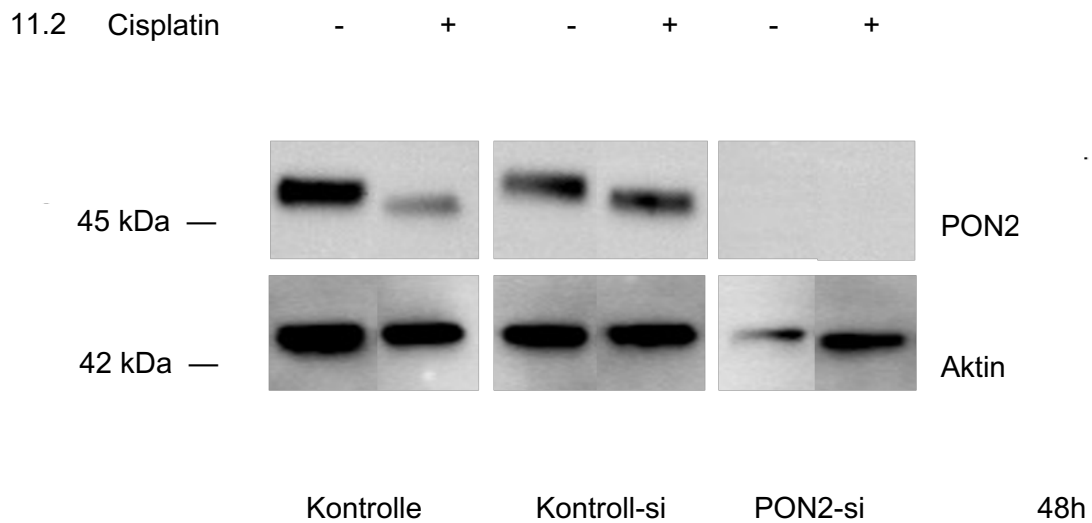


Abbildung 11: PON2-Expressionsanalyse auf proteinbiochemischer Ebene in OSCC (SCC-9)

Die Zellen der Tumorzelllinie SCC-9 wurden sowohl mit PON2-spezifischer als auch mit unspezifischer RNAi behandelt oder unbehandelt belassen. Nach der RNAi-Behandlung wurden die SCC-9 Zellen mit Cisplatin inkubiert und nach jeweils 24h und 48h wurde ein Western blot mit Antikörper gegen PON2 sowie Aktin angefertigt. Abbildung 11.1 zeigt den Western blot nach 24 Stunden Cisplatin-Inkubation, während Abbildung 11.2 den Western blot nach 48 Stunden darstellt. Die Menge an PON2 in den PON2-si-behandelten Zellen ist deutlich niedriger als in den Kontroll-si-RNA-behandelten Zellen und unbehandelt belassenen Zellen.

4.2.3 Analyse von Caspase 3/7 Aktivität in OSCC (SCC-9) (*in vitro*)

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Analyse von Caspase 3/7 Aktivität in SCC-9 Tumorzellen. Die SCC-9 Tumorzellen wurden sowohl mit PON2-spezifischer als auch mit unspezifischer RNAi behandelt oder unbehandelt belassen. Nach der RNAi-Behandlung wurden die SCC-9 Zellen mit 4µg/ml Cisplatin inkubiert und jeweils nach 24h und 48h auf Caspase 3/7 Aktivität getestet. Die Ergebnisse zeigen die relative Caspase 3/7 Aktivität verglichen zur jeweiligen korrespondierenden unbehandelten Tumorzelllinie.

Abbildung 12.1 zeigt die Ergebnisse für die PON2-si-RNA-behandelten SCC-9 Zellen: Nach 24h lag die Caspase 3/7 Aktivität in den siRNA behandelten Zellen etwa um das 1,3fache höher (MW: 1,32 ±0,26) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Nach 48h lag die Caspase 3/7 Aktivität um ca. 42% höher (MW: 1,87 ±0,32). Während sich die Aktivität der Caspase 3/7

zwischen den mit Cisplatin inkubierten und unbehandelten Zellen nach 24h nicht statistisch signifikant unterschied, war dieser Unterschied nach 48h mit $*p < 0,05$ statistisch signifikant.

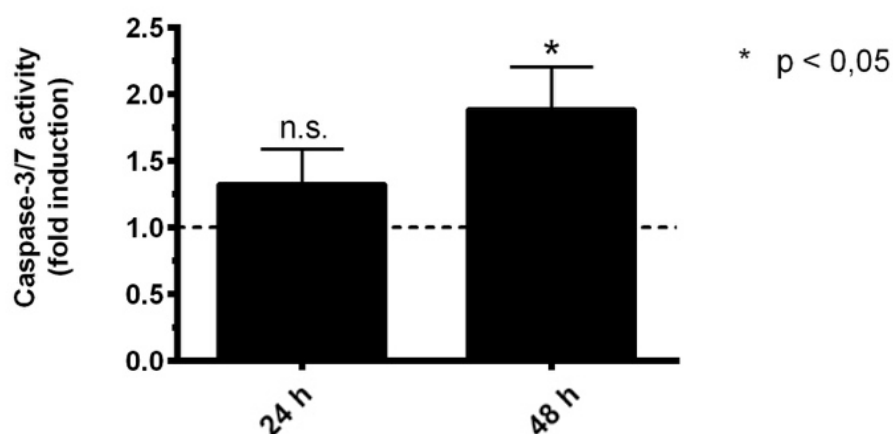
Abbildung 12.2 zeigt die Ergebnisse für die Kontroll-si-RNA-behandelten SCC-9 Zellen: Nach 24h lag die Caspase 3/7 Aktivität in den Kontroll-si-RNA-behandelten Zellen etwa um das 1,5fache höher (MW: $1,55 \pm 0,28$) und nach 48h doppelt so hoch (MW: $2,09 \pm 0,28$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Während sich die Aktivität der Caspase 3/7 zwischen den mit Cisplatin inkubierten und unbehandelten Zellen nach 24h nicht statistisch signifikant unterschied, war dieser Unterschied nach 48h mit $*p < 0,05$ statistisch signifikant.

Abbildung 12.3 zeigt die Ergebnisse für die unbehandelt belassenen SCC-9-Zellen: Nach 24h lag die Caspase 3/7 Aktivität in den unbehandelt belassenen Zellen etwa um das 1,5fache höher (MW: $1,51 \pm 0,19$) und nach 48h etwa um das 2,6fache höher (MW: $2,64 \pm 0,26$). Während sich die Aktivität der Caspase 3/7 zwischen den mit Cisplatin inkubierten und unbehandelten Zellen nach 24h nicht statistisch signifikant unterschied, war dieser Unterschied nach 48h mit $*p < 0,05$ statistisch signifikant.

Die Caspase 3/7 Aktivität war in allen drei SCC-9-Zellgruppen nach 24h nicht signifikant erhöht und nach 48h signifikant erhöht ($*p < 0,05$) verglichen mit den unbehandelten Zellen. In allen drei SCC-9-Zellgruppen führte die Inkubation mit Cisplatin zu einer Erhöhung der Caspase 3/7 Aktivität. Im zeitlichen Verlauf erhöhte sich ebenfalls die Caspase 3/7 Aktivität (24h vs 48h). Die statistische Analyse auf signifikante Unterschiede in den Ergebnissen erfolgte mittels „two-way ANOVA“ ($*p < 0,05$).

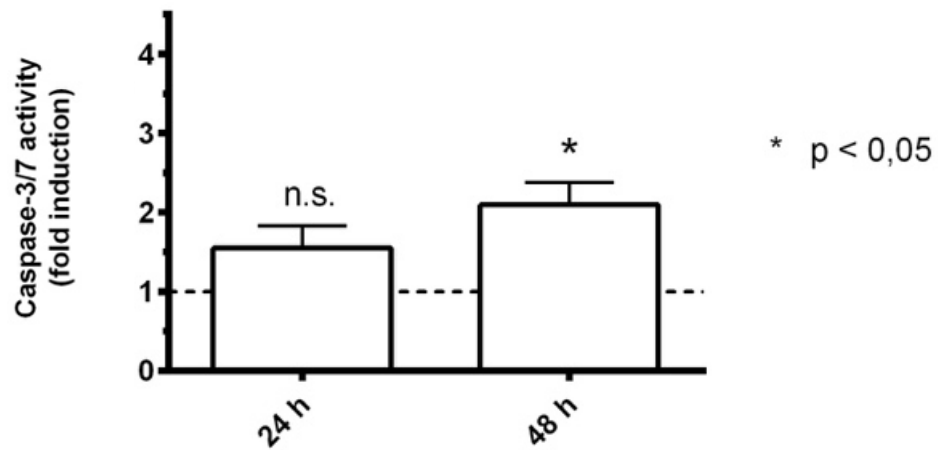
12.1

PON2si + Cisplatin



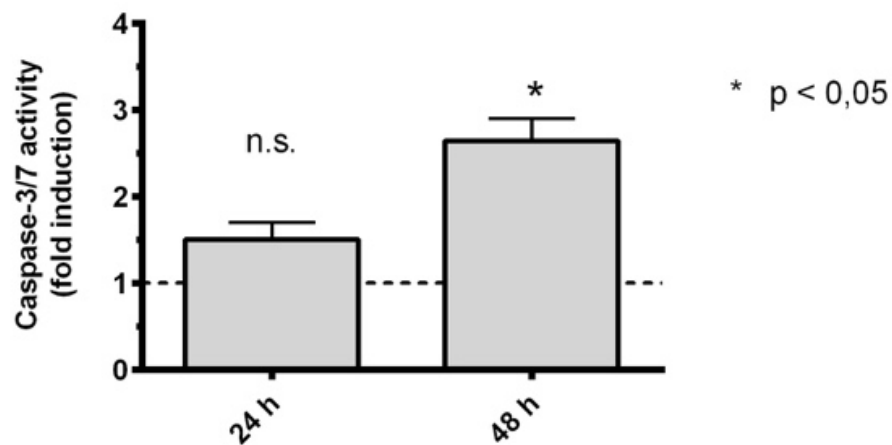
12.2

Kontroll-si + Cisplatin



12.3

Kontrolle + Cisplatin

**Abbildung 12: Caspase 3/7 Aktivität in OSCC (SCC-9)**

Nach der Vorbehandlung der SCC-9-Zellen (1: PON2-si-RNA-behandelt (Abbildung 12.1), 2: Kontroll-si-RNA-behandelt (Abbildung 12.2) und 3: unbehandelt belassen (Abbildung 12.3)) mit Cisplatin, wurde die Aktivität der Caspase 3/7 jeweils nach 24h und 48h analysiert. Die Caspase 3/7 Aktivität war in allen drei SCC-9-Zellgruppen nach 24h nicht signifikant erhöht und nach 48h signifikant erhöht (* $p < 0,05$)

verglichen mit den unbehandelten Zellen. In allen drei SCC-9-Zellgruppen führte die Inkubation mit Cisplatin zu einer Erhöhung der Caspase 3/7 Aktivität. Im zeitlichen Verlauf erhöhte sich ebenfalls die Caspase 3/7 Aktivität (24h vs. 48h). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels „two-way ANOVA“ berechnet (* $p > 0,05$).

4.2.4 Analyse der intrazellulären ROS-Spiegel in OSCC (SCC-9) (*in vitro*)

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der intrazellulären ROS-Spiegel in SCC-9 Tumorzellen. Die SCC-9 Tumorzellen wurden sowohl mit PON2-spezifischer als auch mit -unspezifischer RNAi behandelt oder unbehandelt belassen. Nach der RNAi-Behandlung wurden die SCC-9 Zellen mit 4 μ g/ml Cisplatin inkubiert und auf intrazelluläre ROS getestet. Die Tumorzellen wurden mit der Substanz DMNQ, das ROS freisetzt, inkubiert und dann die intrazelluläre ROS-Menge über einen kontinuierlichen Zeitraum von 30min gemessen. Mittels Fluometer konnte die ROS-induzierten Fluoreszenz, die nach der intrazellulären Aktivierung von Carboxy-H₂DCFDA entsteht, gemessen werden. Abbildung 13 zeigt den Verlauf der intrazellulären ROS-Produktion (y-Achse) der drei vorbehandelten SCC-9-Zellen (1: PON2-si-RNA-behandelt, 2: Kontroll-si-RNA-behandelt und 3: unbehandelt belassen) in Abhängigkeit der Zeit (x-Achse). Ein weiterer Anteil an Zellen wurde als Negativkontrolle mit DMSO behandelt. Jede dargestellte Kurve zeigt den Verlauf von intrazellulär freigesetzten ROS in den drei vorbehandelten Plattenepithelkarzinomzellen nach Zugabe von DMNQ, normalisiert zu DMSO. Nach der Zugabe von 10 μ mol/l DMNQ zeigten sich im Vergleich zur Zugabe mit DMSO höhere ROS-Spiegel. Sowohl beim Ansatz ohne und mit Cisplatin weisen die PON2-si-RNA-behandelten SCC-9 Zellen höhere ROS-Werte im Vergleich zu den Kontroll-si-RNA-behandelten und den unbehandelt belassenen SCC-9-Zellen. Bei den PON2-si-RNA-behandelten SCC-9 Zellen zeigte sich sowohl ohne als auch mit Cisplatin ein Anstieg der ROS-Produktion. Ohne Cisplatin waren die ROS-Spiegel in den PON2-si-RNA-behandelten SCC-9 Zellen im Vergleich zu den Kontroll-si-RNA-behandelten und den unbehandelt belassenen SCC-9-Zellen statistisch signifikant erhöht (* $p < 0,05$). Mit Cisplatin waren die ROS-Spiegel in den PON2-si-RNA-behandelten SCC-9 Zellen im Vergleich zu den Kontroll-si-RNA-behandelten und den unbehandelt belassenen SCC-9-Zellen nicht statistisch signifikant erhöht. Die statistische Analyse erfolgte mittels „one-way ANOVA“ (* $p < 0,05$).

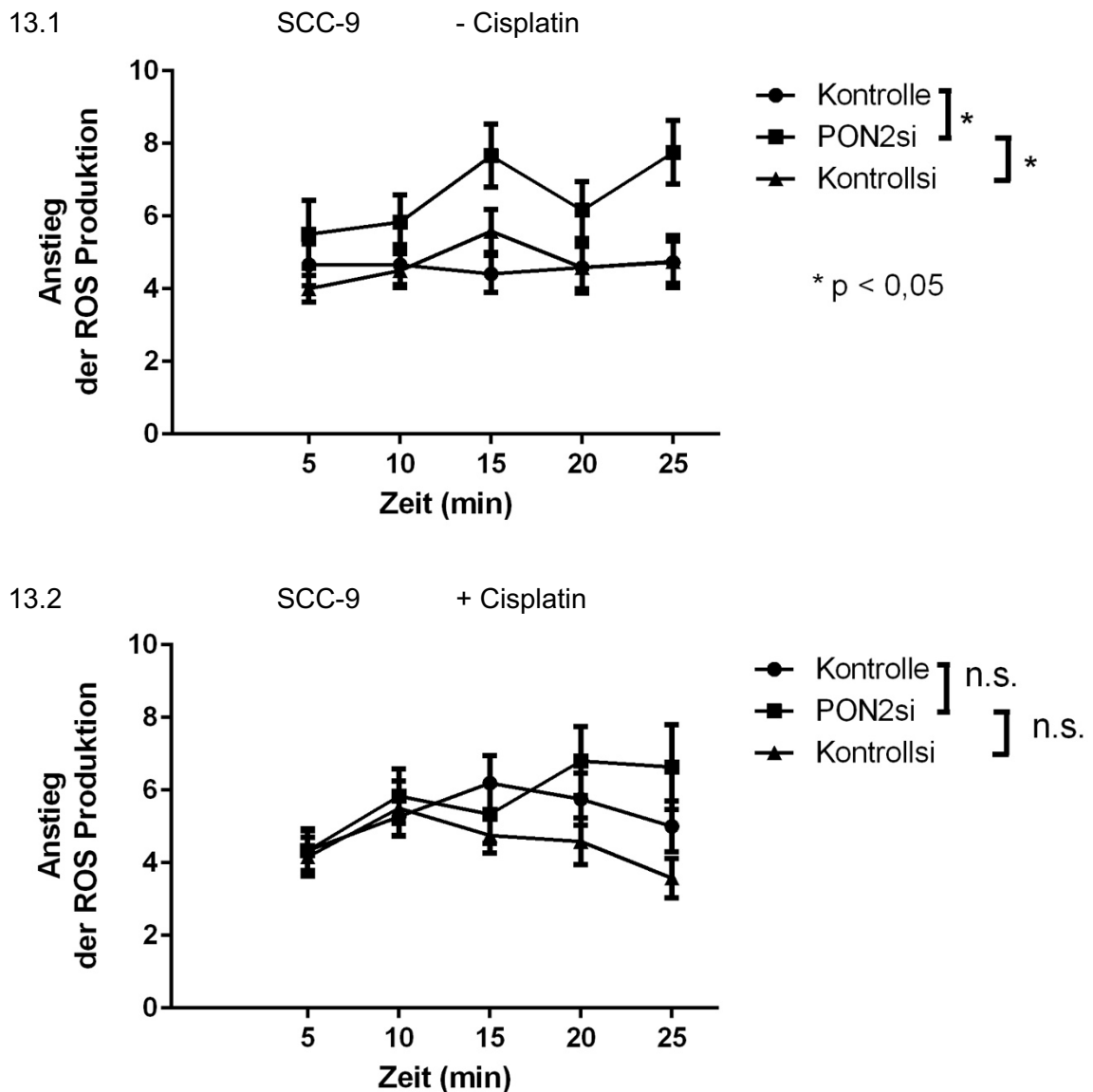


Abbildung 13: Intrazelluläre ROS-Spiegel in OSCC (SCC-9)

Die Zellen der Tumorzelllinie SCC-9 wurden sowohl mit PON2-spezifischer als auch mit unspezifischer RNAi behandelt oder unbehandelt belassen. Nach der Vorbehandlung wurden die SCC-9 Zellen mit 4µg/ml Cisplatin inkubiert und auf intrazelluläre ROS getestet. Nach Inkubation mit 10µmol/l DMNQ wurde mittels ROS-Reporter H₂DCFDA die intrazellulären ROS-Spiegel gemessen. Abbildung 13.1 zeigt die Ergebnisse ohne Cisplatin-Inkubation, während Abbildung 13.2 die Resultate nach Cisplatin-Inkubation darstellt. Jeder Punkt beinhaltet fünf individuelle Messungen, dargestellt als Mittelwerte ±SEM. Die Maximalwerte wurden mittels nicht-linearer Regression ermittelt und zeigen ohne Cisplatin statistisch signifikante Unterschiede (*p < 0,05) und mit Cisplatin keine signifikanten Unterschiede.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der eigenen Ergebnisse

5.1.1 Interpretation der eigenen Ergebnisse im Kontext anderer Studien

Die Gruppe der Paraoxonasen, mit dem Vertreter PON2, ist seit einiger Zeit Gegenstand medizinischer Forschung. Die meisten Studien konzentrierten sich hauptsächlich auf die Expression sowie die antiapoptotische bzw. antioxidative Funktion von PON2 bei kardiovaskulären, neurodegenerativen und infektiologischen Erkrankungen (159-162). Weitere geringere Studien untersuchten PON2 auch in verschiedenen Tumorzellen: Dabei wurden erhöhte Expressionsraten von PON2 in verschiedenen Tumoren wie z.B. dem hepatozellulären Karzinom, das Prostatakarzinom und die pädiatrische, lymphatische Leukämie nachgewiesen und es scheint, dass PON2 somit mehrere protektive Funktionen als Überlebensvorteil nutzt (144, 145, 163, 164). Eine noch geringe Anzahl von verschiedenen Forschungsgruppen beschäftigen sich mit PON2 in oralen Plattenepithelkarzinomzellen (12, 136, 165-167): Krüger et al. lieferten in ihrer Studie erste Hinweise darauf, dass die Hochregulierung von PON2 orale Plattenepithelkarzinomzellen vor strahleninduzierter Apoptose schützen kann (136). Nach Bestrahlung von vier verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien (PCI-13, PCI-52, SCC-4 und SCC-68) mit 7Gy wurden sowohl die PON2-Expression als auch die Caspase 3/7 Aktivität getestet (136). Im Vergleich zu den anderen Tumorzellen zeigten die SCC-4 Tumorzellen nach einmaliger Bestrahlung eine doppelt so hohe basale PON2-Aktivität ($p \leq 0,05$) und die niedrigste Caspase 3/7 Aktivität ($p \leq 0,05$) (136). Parallel dazu zeigte der PON2-Knockdown eine signifikant höhere Apoptoserate ($p \leq 0,05$), die eine Bestrahlungsempfindlichkeit der Tumorzellen widerspiegelt (136). Belloni et al. analysierten und bewerteten in ihrer Studie die zeitabhängigen Veränderungen der oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien HOC621- und HSC-3 sowohl nach PON2-Silencing- als auch nach Cisplatin-Behandlung mittels Fourier-Transform-Infrarotspektrometer (166). In beiden Tumorzelllinien, die einen PON2-Knockdown erhielten, zeigte sich ein positiver Effekt auf die Wirksamkeit von Cisplatin, mit reduziertem Wachstum in PON2-stillgelegten HOC621- im Vergleich zu HSC-3 Tumorzellen (166). Dabei identifizierten spezifische Spektralmarker zelluläre Veränderungen, hauptsächlich in Nukleinsäuren und Kohlenhydraten, die durch die Chemotherapie stärker beeinflusst zu werden schienen (166). Campagna et al. untersuchten außerdem die Wirkung auf die Zellproliferation, Lebensfähigkeit, Apoptose-Induktion und Empfindlichkeit gegenüber einer Behandlung mit Cisplatin und 5-Fluorouracil durch Stilllegung

des Paraoxonase 2-Gens ebenfalls in den oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien HSC-3 und HOC621 (167). Dabei zeigten spektroskopische Daten, dass die oxidative Schädigung von Lipiden und Proteinen in Zellen, die mit Cisplatin behandelt wurden, in Zellen mit herunterregulierter Paraoxonase 2 deutlich stärker ausgeprägt war als in Kontrollzellen (167). Auch die Enzymexpression und Zellproliferation waren in Cisplatin-resistenten HOC621-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant höher (167). Die Übersichtsarbeit von Kamal et al. erörtert wiederum die Rolle von PON2 bei der Entwicklung einer Resistenz gegen Strahlentherapie und Chemotherapie in OSCC (165). Ziel war es, die komplexen molekularen Mechanismen zu erforschen, die durch PON2 moduliert werden und die Wirksamkeit der Therapie verringern (165).

Die vorliegende Studie untersuchte die basale PON2-Expression in verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinomzellen und den Einfluss eines gezielten Gen-knockout von PON2 nach der Inkubation mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin in der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC-9, reiht sich in die anderen oben aufgeführten Studien ein und erweitert somit die Zusammenhänge hinsichtlich der Expression, Aktivität und Funktion von Paraoxonase 2 in oralen Plattenepithelkarzinomzellen:

5.1.2 Bedeutung der basalen PON2-Expression in verschiedenen OSCC

Im ersten Versuchsteil sollte in einem *in vitro* – Versuch die basale PON2 Expression in verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien CAL-27, SCC-9, SCC-15 und SCC-25 auf Proteinebene durch Western blot untersucht werden. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Analyse zeigten eine reguläre PON2-Expression in allen vier verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien, die aber unterschiedlich stark ausgeprägt waren (siehe Kapitel 4.1.1 PON2-Expressionsanalyse mittels proteinbiochemischer Methode (*in vitro*) und 4.1.2 PON2-Expressionsanalyse – Quantitative Analyse (*in vitro*)). Dabei zeigte die Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC-9 basal die höchste und SCC-25 basal die niedrigste relative PON2-Expression. Beide Tumorzelllinien stammen von männlichen Patienten ab, die aber unterschiedliches Alter aufweisen. Leider kann anhand der vorliegenden Ergebnisse keine gültige Aussage bzgl. einem potenziellen Zusammenhang zwischen Geschlecht, Alter und Gewebe in Kontext der PON2-Expression getroffen werden. In der Studie von Krüger et al. wurde ebenfalls auch die basale PON2-Expression für die oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien PCI-13, PCI-52, SCC-4 und SCC-68 untersucht. Die Analyse

zeigte ebenfalls eine reguläre PON2-Expression in allen vier verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien, die auch unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Hier wiederum zeigte die Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC-4 basal die höchste und SCC-68 basal die niedrigste relative PON2-Expression (136). Somit weisen die unterschiedlichen Plattenepithelkarzinomzelllinien jeweils eine uneinheitliche basale PON2-Expression auf. Diese unterschiedlichen, individuellen PON2-Expressionen können Hinweise auf den Einfluss auf biologische Eigenschaften wie z.B. Tumorentstehung, Metastasierung, ggf. Benutzung als potenzieller Marker oder sogar der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika geben. Orale Karzinome könnten mit einem höheren basalen Gehalt an PON2 einen Überlebensvorteil unter Chemotherapie haben, da PON2 eine antiapoptotische Funktion aufweist. Neben der antiapoptischen Funktion könnte die Hochregulierung von antioxidativer Systeme, die erhöhte ROS-Werte reduzieren, eine weitere Eigenschaft der Karzinomzelle sein. Sowohl die antiapoptotischen als auch antioxidativen Eigenschaften von Paraoxonase 2 werden in den nächsten zwei Kapiteln diskutiert:

5.1.3 PON2 schützt OSCC vor Cisplatin-induzierter Apoptose

Bei der Behandlung des Mundhöhlenkarzinoms kommen in der Regel die Platinverbindungen wie Cisplatin oder Carboplatin (75, 76) entweder in Kombination mit einer Strahlentherapie (primäre Radiochemotherapie) oder nach operativer Entfernung des Tumors in Kombination mit Bestrahlung (adjuvante Radiochemotherapie) zum Einsatz (77, 78). Auch heute noch ist Cisplatin der Goldstandard für die Behandlung des oralen Plattenepithelkarzinoms und wird mit einer Strahlentherapie kombiniert, um einen bedeutend höheren Überlebensvorteil im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie zu erzielen (168, 169). Leider geht dieser Überlebensvorteil der Kombinationstherapie mit einem deutlich höheren Nebenwirkungsspektrum einher (170). Es ist auch wichtig zu beachten, dass Tumorzellen eine Cisplatin-Resistenz entwickeln können (171). Dabei handelt es sich um einen Mechanismus, durch den eine Unempfindlichkeit gegenüber Cisplatin entsteht und somit die Wirksamkeit der Behandlung verringert wird (172). Verschiedene Faktoren können zu einer Cisplatin-Resistenz beitragen, darunter eine reduzierte Aufnahme und Retention, erhöhte Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden, Veränderungen in Zielproteinen und Aktivierung von Resistenzgenen (173, 174).

In der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der Plattenepithelkarzinomzellen mit Cisplatin zu einer Induktion von PON2 führt (siehe Kapitel 4.2.1 PON2-Expressionsanalyse auf RNA-Ebene in OSCC (SCC9) (*in vitro*) und 4.2.2 PON2-Expressionsanalyse auf proteinbiochemischer Ebene in OSCC (SCC9) (*in vitro*)). Eine weitere Analyse zeigte auch Hinweise auf eine Schutzfunktion von PON2 gegen Cisplatin-induzierte Apoptose: Die PON2-si-RNA-behandelten SCC-9 Tumorzellen zeigten nach 24h Inkubation mit Cisplatin eine 1,3fache höhere Caspase 3/7 Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Nach 48h Inkubation mit Cisplatin zeigten die PON2-si-RNA-behandelten SCC-9 Tumorzellen eine 1,9fache höhere Caspase 3/7 Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (siehe Kapitel 4.2.3 Analyse von Caspase 3/7 Aktivität in OSCC (SCC9) (*in vitro*)). Dies deutet darauf hin, dass PON2 orale Plattenepithelkarzinomzellen vor Cisplatin-induzierter Apoptose schützen kann und dass die Tumorzelle versucht, der Cisplatin-induzierten Apoptose durch Hochregulierung von PON2 zu entgehen. Daher scheinen PON2 und seine Eigenschaften aufgrund ihres Einflusses auf die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei oralen Plattenepithelkarzinomen von Interesse zu sein, wobei der genaue Mechanismus seiner Schutzfunktion jedoch noch geklärt werden muss. Campagna et al. belegten in ihrer Studie, dass PON2 an der Chemotherapieresistenz oraler Plattenepithelkarzinome beteiligt ist und dass somit ein relevanter molekularer Angriffspunkt bzw. Forschungsgegenstand für Therapiestrategien gegen diese Tumore darstellen (167). Die Ergebnisse der Studie von Krüger et al. zu PON2 in oralen Plattenepithelkarzinomzellen, die mit Strahlentherapie behandelt wurden, zeigen Ähnlichkeiten, dass die Hochregulierung von PON2 in OSCC vor strahleninduzierter Apoptose schützen kann (136). Belloni et al. untersuchten die Sensitivität von Cisplatin in oralen Plattenepithelkarzinomzellen nach PON2-Knockdown: Sie verwendeten andere orale Plattenepithelkarzinomzelllinien (HOC621 und HSC-3), eine andere Methode (Fourier-Transform-Infrarotspektrometer) und drei verschiedene Zeitpunkte (24h, 48h und 72h) (166). Bei PON2-inaktivierten HOC621-Tumorzellen wurde im Vergleich zu HSC-3-Tumorzellen ein geringeres Wachstum beobachtet, und in beiden Zelllinien wurden auch zelluläre Veränderungen beobachtet, allerdings ausgeprägter bei HOC621-Tumorzellen, die daher offenbar stärker von der Chemotherapie betroffen waren (166).

Die Analyse-Ergebnisse dieser und der anderen Studien legen nahe, dass die Abschaltung von PON2 bei OSCC eine wertvolle Möglichkeit zur Steigerung der Wirksamkeit der Therapie sein kann, da PON2 orale Plattenepithelkarzinomzellen vor Strahlen- und / oder Chemotherapie-induzierter Apoptose zu schützen scheint.

5.1.4 PON2 schützt OSCC vor Cisplatin-induzierten ROS-Spiegeln

Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass PON2 antioxidative Eigenschaften besitzt (175). Es schützt die Zellen vor oxidativem Stress und trägt zur Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei (131, 139). Dabei wurde PON2 im Zusammenhang mit der Entstehung und der Progression von Tumoren erforscht (126). Tumore wie das orale Plattenepithelkarzinom weisen einen veränderten Stoffwechsel auf, der auch die ROS-Homöostase beeinflusst (176). Der ROS-Einfluss auf den biologischen Stoffwechsel von Tumoren zeigt auch die Relevanz von PON2 in Tumorzellen (177). Die Rolle von ROS in Tumoren ist komplex und betrifft verschiedene Aspekte, wobei die genaue Wirkung von der Art des Tumors, der ROS-Konzentration und dem zellulären Kontext abhängt (178). Einerseits können sie durch die Schädigung der DNA und anderer Zellbestandteile zur Entartung von Zellen und damit zur Krebsentstehung beitragen, andererseits können sie auch als Signalmoleküle wirken, die das Wachstum und Überleben von Tumorzellen fördern oder sogar zu deren Zelltod führen können (179, 180). Die unterschiedlichen basalen PON2-Expressionen in den verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinomzellen könnten möglicherweise Hinweis auf Anpassungsprozesse an die veränderte ROS-Homöostase innerhalb des Stoffwechsels der Tumorzelle liefern, um die zu hohen ROS-Spiegel abzufangen und der ROS-induzierten Apoptose zu entgehen (siehe Kapitel 4.1.1 PON2-Expressionsanalyse mittels proteinbiochemischer Methode (*in vitro*) und 4.1.2 PON2-Expressionsanalyse – Quantitative Analyse (*in vitro*)). PON2 verfügt möglicherweise über ähnliche Mechanismen zur Reduzierung von ROS wie antioxidative Enzyme wie Superoxiddismutasen, Katalasen und Glutathionperoxidasen sowie Substanzen wie Glutathion (177, 181-184). Es ist daher auch denkbar, dass die Tumorzellen die hohen ROS-Spiegel, die auch therapeutisch durch Chemotherapeutika wie Cisplatin entstehen, kompensieren und sich dadurch einen Vorteil verschaffen. Vor diesem Hintergrund sollte die Frage diskutiert werden, ob PON2 orale Plattenepithelkarzinome vor der Cisplatin-induzierten ROS-Produktion schützt. Es wurde eine Analyse der intrazellulären ROS-Spiegel in SCC-9-Tumorzellen nach Cisplatin-Inkubation durchgeführt. Es zeigte Hinweise auf eine Schutzfunktion von PON2 gegen Cisplatin-induzierte ROS: Die PON2-si-RNA-behandelten SCC-9 Tumorzellen zeigten höhere ROS-Spiegel im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (siehe Kapitel 4.2.4 Analyse der intrazellulären ROS-Spiegel in OSCC (SCC-9 (*in vitro*))). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Tumorzelllinie SCC-9 PON2 als Antwort auf basal erhöhte ROS-Spiegel vermehrt exprimiert, was die existentielle Bedeutung für PON2 für die Tumorzelle unterstreicht. Die Ergebnisse der vorgestellten Analyse von PON2 und ROS geben Hinweise auf eine ROS-reduzierende Funktion von PON2.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ROS bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Tumoren eine doppelte Rolle spielen: Während eine übermäßige ROS-Produktion zu Zellschäden und Karzinomen führen kann, können moderate ROS-Werte auch als Signalmoleküle wirken und das Tumorstadium beeinflussen. Die hier vorgestellten Ergebnisse zur ROS-reduzierenden Funktion von PON2 könnten ebenfalls als ein potentielles therapeutisches Ziel betrachtet werden, worauf im nächsten Kapitel 5.2 PON2 potentieller Marker oder therapeutisches Ziel näher eingegangen wird.

5.2 PON2 - potenzieller Marker oder therapeutischer Angriffspunkt

Die verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien zeigen jeweils eine variable basale PON2-Expression. Diese variablen Expressionen machen PON2 als potenziellen Biomarker für den klinischen Alltagsgebrauch interessant, um ggf. das Ansprechen auf eine Therapie (adjuvante Radio- und/oder Chemotherapie) vorherzusagen bzw. resistente OSCC-Varianten zu identifizieren. Krüger et al. zeigte mit seinem *in vitro* Versuch, dass eine verminderte PON2-Expression im oralen Plattenepithelkarzinom mit einer verminderten Strahlentherapieresistenz korreliert (136). Wiederum in dieser vorgestellten Studie wurde mit *in vitro* Versuchen gezeigt, dass eine verminderte PON2-Expression ebenfalls mit einer verminderten Chemotherapieresistenz einhergeht. Für die Erstellung eines individuellen Therapiekonzept wäre es von großem Vorteil, wenn Karzinome mit potenziell höherer Sensitivität gegenüber Strahlen- oder Chemotherapie identifiziert werden könnten.

Biomarker, auch Tumormarker genannt, sind messbare Strukturen im Körper, die auf das Vorhandensein oder die Eigenschaften eines Tumors hinweisen (185). Dabei können Biomarker Proteine, Gene, Hormone, Enzyme oder andere Moleküle sein, können aber auch Mutationen oder veränderte Genexpression umfassen (186). Früherkennung, Diagnose, Prognose, Therapieüberwachung und personalisierte Therapie sind Beispiele für Anwendungen von Biomarkern in der Onkologie (187). Die vielfältigen Rollen von PON2 sowohl bei Krankheiten als auch bei Tumoren machen es zu einem vielversprechenden Biomarker (153): Studien haben gezeigt, dass PON2 eine Rolle bei der Atherosklerose spielt und ein Mangel an PON2 zu mitochondrialer Dysfunktion und einer verstärkten Atherosklerose führen kann (13, 141). Andere Studien legen nahe, dass PON2 im Gehirn eine Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress und Neuroinflammation spielt, was sie für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen interessant macht (161). Darüber hinaus lässt sich sagen,

dass PON2 an verschiedenen Aspekten von Infektionen beteiligt sein könnte, unter anderem an der Entzündungsregulierung, dem Schutz vor oxidativem Stress und möglicherweise auch an der zellulären Abwehr von Krankheitserregern (188, 189). In Bezug auf Tumore gibt es Hinweise darauf, dass PON2 bei einigen Krebsarten tumorfördernd wirkt, während es bei anderen als Tumorsuppressor fungiert (139, 152, 190). Neben einer variablen PON2-Expression bei anderen Tumorentitäten wurde auch Beobachtungen beim oralen Plattenepithelkarzinom gemacht, die nahe legen, dass eine veränderte PON2-Expression als relevantes Merkmal auf den funktionellen Einfluss des Tumorstoffwechsels haben könnte (127, 139, 191). Einen großen Vorteil für den Patienten wäre es, wenn man Tumore wie z.B. orale Plattenepithelkarzinome mit einer potenziell höheren Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapie vor Therapiebeginn identifizieren könnte. Daher könnte PON2 als potenzieller Marker oder therapeutisches Ziel bei oralem Plattenepithelkarzinom verwendet werden, sowohl für die Prognose als auch für das Ansprechen auf eine Chemotherapie.

5.3 PON2 - Konklusion und Zukunftsausblick

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Analyse zu PON2-Expression und ihrer Rolle in oralen Plattenepithelkarzinomzellen legen nahe, dass PON2 einen relevanten Einfluss auf die Chemotherapieresistenz von oralen Plattenepithelkarzinomen hat. Das intrazellulär lokalisierte PON2 stellt einen bisher unbekanntem Schutzfaktor gegen chemotherapeutisch induzierte Apoptose dar: Die verschiedenen Plattenepithelkarzinomzelllinien zeigen *in vitro* eine variable basale PON2-Expression auf. Des Weiteren schützt PON2 *in vitro* vor Cisplatin-induzierten ROS-Spiegeln. Dabei ist der genaue Mechanismus der Schutzfunktion noch weiterhin ungeklärt und sollte weiter erforscht werden. Ebenfalls wurde in dieser Studie die PON2-Rolle als potenzieller Marker erörtert. Da die PON2-Testung sowohl technisch komplex als auch zeitaufwändig ist, wird es in Zukunft notwendig sein, weitere einfache, zuverlässige und zeitsparende Methoden zur Analyse der individuellen PON2-Expression in Karzinomen zu entwickeln. Ebenfalls wäre es denkbar PON2 als potenziellen Biomarker anwenden zu können und anhand der PON2-Expression Rückschlüsse sowohl auf die Tumoraggressivität als auch auf die Erfolgsrate bei den adjuvanten Therapieformen ziehen zu können.

Die Frage, ob PON2 allein oder in Kombination mit anderen Biomarkern ein nützliches Instrument zur Vorhersage als auch zur Prognose des Ansprechens auf eine adjuvante Therapie darstellt, sowie weitere Fragen zum genauen Mechanismus der Therapieresistenz gilt es in Zukunft durch weitere Analysen zu erforschen und beantworten.

6 Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung

Die oralen Plattenepithelkarzinome machen 90% der malignen Neoplasien der Mundhöhle und des Oropharynx aus. Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms sind Tabakkonsum, kauen von Areca bzw. Betelnüssen, übermäßiger Alkoholkonsum, genetische Prädisposition sowie eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 62%, bei Patienten mit Metastasen nur bei 32%. Die Therapie des OSCC ist eine Kombination aus chirurgischer Entfernung, Strahlen- und / oder Chemotherapie. Der gemeinsame Wirkmechanismus der adjuvanten Therapieformen ist die Induktion der Apoptose. Durch therapeutisch induzierten oxidativen Stress lässt sich auch das intrazelluläre ROS-Gleichgewicht gezielt stören, was ebenfalls zu einer Aktivierung des programmierten Zelltodes führen kann. Tumore weisen häufig eine veränderte Genexpression auf, um der therapeutisch induzierten Apoptose zu entgehen. Die Tumorforschung konzentriert sich auf die Analyse von antiapoptotischer und antioxidativer Eigenschaften, um ein Verständnis des Tumorstoffwechsels zu ermöglichen, um gezieltere und wirksamere Therapien zu entwickeln und die Überlebensrate für Patienten zu verbessern.

Es scheint, dass Paraoxonase 2 (PON2) eine wichtige Rolle bei Tumoren spielt. Es wurde beschrieben, dass das intrazelluläre Enzym PON2 sowohl antiapoptotische als auch antioxidative Eigenschaften besitzt. Auch wurde veränderte PON2-Expressionen für verschiedene Tumorarten beschrieben. In dieser Studie wurden die Zusammenhänge hinsichtlich Expression, Aktivität und Funktion von PON2 bei oralen Plattenepithelkarzinomen unter Chemotherapie untersucht. Das Vorhandensein und eine variable Expression von PON2 innerhalb der OSCC-Zelllinien CAL-27, SSC-9, SCC-15 und SCC-25 wurde durch biochemische Methode bestätigt. Die SCC-9 – Zelllinie zeigte im Vergleich zu den anderen Zelllinien die höchste basale PON2-Expression. Da Platinverbindungen bevorzugt in der adjuvanten Therapieform eingesetzt werden, wurde PON2 in der Tumorzelllinie SCC-9 mittels eines temporären Gen-Knockdown gezielt herunterreguliert, mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin inkubiert und anschließend Folgeuntersuchungen in Form von RealTimePCR, Westernblots, Caspase- und ROS-Analysen durchgeführt. Die Behandlung mit Cisplatin führte zur Induktion von PON2 in der PON2-exprimierenden Zelllinie SCC-9, um möglicherweise der

chemotherapeutischen Apoptose entgegenzuwirken. Der vorübergehende Knockdown von PON2 in SCC-9 – Tumorzellen führte nach Inkubation mit Cisplatin im Vergleich zu der Kontrollzelllinie einerseits zu einer erhöhten Apoptoserate und andererseits zu erhöhten ROS-Spiegel. Somit schützt eine vermehrte PON2-Expression die oralen Plattenepithelkarzinomzellen vor Cisplatin induzierter Apoptose und ROS-Spiegel. Diese Studie zeigte die wichtige klinische Relevanz von PON2 für die Chemotherapieresistenz bei oralen Plattenepithelkarzinomen. Dabei könnte PON2 allein oder in Kombination mit anderen Markern ein nützliches Instrument zur Vorhersage als auch zur Prognose des Ansprechens auf Chemotherapie darstellen. In Hinblick auf den Tumorstoffwechsel gilt es weiterhin PON2 durch weitere Analysen zu untersuchen, damit man in Zukunft PON2 als Prognosemarker verwenden kann.

6.2 Summary

Oral squamous cell carcinomas account for 90% of malignant neoplasms of the oral cavity and oropharynx. The main risk factors for the development of oral squamous cell carcinoma are tobacco consumption, chewing areca oder betel nuts, excessive alcohol consumption, genetic predisposition and infection with the human papillomavirus (HPV). The 5-year survival rate is approximately 62%, while in patients with metastases it is only 32%. The treatment of OSCC is a combination of surgical removal, radiotherapy and/or chemotherapy. The common mechanism of action of adjuvant therapies is the induction of apoptosis. Therapeutic-induced oxidative stress can also specifically disrupt the intracellular ROS balance, which can also lead to the activation of programmed cell death. Tumors often exhibit altered gene expression to evade therapeutically induced apoptosis. Tumor research focuses on the analysis of antiapoptotic and antioxidant properties to enable an understanding of tumor metabolism in order to develop more targeted and effective therapies and improve the survival rate for patients.

It appears that paraoxonase 2 (PON2) plays an important role in tumors. The intracellular enzyme PON2 has been described to have both antiapoptotic and antioxidant properties. Altered PON2 expression has also been described for various tumor types. This study investigated the relationships between expression, activity and function of PON2 in oral squamous cell carcinomas undergoing chemotherapy. The presence and variable expression of PON2 within the OSCC cell lines CAL-27, SCC-9, SCC-15 and SCC-25 was confirmed by biochemical method. The SCC-9 cell line showed the highest basal PON2 expression compared to the other cell lines. Since platinum compounds are preferably used in adjuvant therapy, PON2 was specifically downregulated in the SCC-9 tumor cell line by means of a temporary gene knockdown, incubated with the chemotherapeutic agent cisplatin, and subsequent follow-up investigations were carried out in the form of real-time PCR, Western blots, Caspase and ROS analyses. Treatment with cisplatin led to the induction of PON2 in the PON2-expressing cell line SCC-9, possibly to counteract chemotherapeutic apoptosis. The temporary knockdown of PON2 in SCC-9 tumor cells after incubation with cisplatin resulted in an increased apoptosis rate and increased ROS levels compared to the control cell line. Thus, increased PON2 expression protects oral squamous cell carcinoma cells from cisplatin-induced apoptosis and ROS levels. This study demonstrated the important clinical relevance of PON2 for chemotherapy resistance in oral squamous cell carcinomas. PON2 alone or in

combination with other markers could be a useful tool for predicting and prognosticating response to chemotherapy. With regard to tumor metabolism, PON2 needs to be further investigated through further analyses so that PON2 can be used as a prognostic marker in the future.

7 Literaturverzeichnis

1. Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3):491-508.
2. H. Ehardt PAR, A.M. Schmidt-Westhausen. *Spezielle Pathologie für Zahnmediziner*: Quintessence Publishing; 2018.
3. El-Naggar AK, Chan JKC, Takata T, Grandis JR, Slootweg PJ. The fourth edition of the head and neck World Health Organization blue book: editors' perspectives. *Hum Pathol*. 2017;66:10-2.
4. Federation FDIWD. FDI policy statement on oral cancer: Adopted by the FDI General Assembly: 24 September 2015, Bangkok, Thailand. *Int Dent J*. 2016;66(1):13-4.
5. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015;517(7536):576-82.
6. Jou A, Hess J. *Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer*. *Oncol Res Treat*. 2017;40(6):328-32.
7. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9-29.
8. Gupta S, Singh A, Deorah S, Tomar A. Immunotherapy in OSCC: Current trend and challenges. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2025;209:104672.
9. Manikkath J, Manikkath A, Lad H, Vora LK, Mudgal J, Shenoy RR, et al. Nanoparticle-mediated active and passive drug targeting in oral squamous cell carcinoma: current trends and advances. *Nanomedicine (Lond)*. 2023;18(27):2061-80.
10. Chamoli A, Gosavi AS, Shirwadkar UP, Wangdale KV, Behera SK, Kurrey NK, et al. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. *Oral Oncol*. 2021;121:105451.
11. Jonckheere N, Skrypek N, Van Seuning I. Mucins and tumor resistance to chemotherapeutic drugs. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1846(1):142-51.
12. Kruger M, Amort J, Wilgenbus P, Helmstadter JP, Grechowa I, Ebert J, et al. The anti-apoptotic PON2 protein is Wnt/beta-catenin-regulated and correlates with radiotherapy resistance in OSCC patients. *Oncotarget*. 2016;7(32):51082-95.
13. 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.
14. Kamal MV, Damerla RR, Parida P, Chakrabarty S, Rao M, Kumar NA. Antiapoptotic PON2 expression and its clinical implications in locally advanced oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2024;115(6):2012-22.
15. Zentrum für Krebsregisterdaten RKI. Krebs in Mundhöhle und Rachen, ICD-10 C00-C14 2022 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Mundhoehle_Rachenkrebs/mundhoehle_rachen_node.html]. (Zugriff am 27.10.2025)
16. Niu Q, Sun Q, Bai R, Zhang Y, Zhuang Z, Zhang X, et al. Progress of Nanomaterials-Based Photothermal Therapy for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2022;23(18).
17. Vitorio JG, Duarte-Andrade FF, Dos Santos Fontes Pereira T, Fonseca FP, Amorim LSD, Martins-Chaves RR, et al. Metabolic landscape of oral squamous cell carcinoma. *Metabolomics*. 2020;16(10):105.
18. Wolf JS, Li G, Varadhachary A, Petrak K, Schneyer M, Li D, et al. Oral lactoferrin results in T cell-dependent tumor inhibition of head and neck squamous cell carcinoma in vivo. *Clin Cancer Res*. 2007;13(5):1601-10.
19. Jung K, Narwal M, Min SY, Keam B, Kang H. Squamous cell carcinoma of head and neck: what internists should know. *Korean J Intern Med*. 2020;35(5):1031-44.
20. Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Saginala K, Barsouk A. Epidemiology, Risk Factors, and Prevention of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci (Basel)*. 2023;11(2).
21. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(1):12-49.

22. Howaldt HP, Vorast H, Blecher JC, Reicherts M, Kainz M. [Results of the DOSAK tumor register]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2000;4 Suppl 1:S216-25.
23. Cramer JD, Burtneess B, Le QT, Ferris RL. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(11):669-83.
24. Kolegova ES, Patysheva MR, Larionova IV, Fedorova IK, Kulbakin DE, Choinzonov EL, et al. Early-onset oral cancer as a clinical entity: aetiology and pathogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2022;51(12):1497-509.
25. Vukovic V, Stojanovic J, Vecchioni A, Pastorino R, Boccia S. Systematic Review and Meta-analysis of SNPs from Genome-Wide Association Studies of Head and Neck Cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2018;159(4):615-24.
26. Rabinovics N, Mizrachi A, Hadar T, Ad-El D, Feinmesser R, Guttman D, et al. Cancer of the head and neck region in solid organ transplant recipients. *Head Neck.* 2014;36(2):181-6.
27. Shamsi S, Rai A, Manjhi L, Kumar A, Mahuli SA, Shree P, et al. Nutritional deficiencies in oral potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther.* 2025;21(1):71-6.
28. Wyss A, Hashibe M, Chuang SC, Lee YC, Zhang ZF, Yu GP, et al. Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Am J Epidemiol.* 2013;178(5):679-90.
29. Nguyen A, Kim AH, Kang MK, Park NH, Kim RH, Kim Y, et al. Chronic Alcohol Exposure Promotes Cancer Stemness and Glycolysis in Oral/Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines by Activating NFAT Signaling. *Int J Mol Sci.* 2022;23(17).
30. Guha N, Warnakulasuriya S, Vlaanderen J, Straif K. Betel quid chewing and the risk of oral and oropharyngeal cancers: a meta-analysis with implications for cancer control. *Int J Cancer.* 2014;135(6):1433-43.
31. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2011;29(32):4294-301.
32. Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biorklund A, et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer.* 1998;82(7):1367-75.
33. Bosetti C, La Vecchia C, Talamini R, Negri E, Levi F, Fryzek J, et al. Energy, macronutrients and laryngeal cancer risk. *Ann Oncol.* 2003;14(6):907-12.
34. Tampa M, Caruntu C, Mitran M, Mitran C, Sarbu I, Rusu LC, et al. Markers of Oral Lichen Planus Malignant Transformation. *Dis Markers.* 2018;2018:1959506.
35. 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.
36. Radaic A, Kamarajan P, Cho A, Wang S, Hung GC, Najarzadegan F, et al. Biological biomarkers of oral cancer. *Periodontol 2000.* 2024;96(1):250-80.
37. Yang Y, Li YX, Yang X, Jiang L, Zhou ZJ, Zhu YQ. Progress risk assessment of oral premalignant lesions with saliva miRNA analysis. *BMC Cancer.* 2013;13:129.
38. Desai RS, Shirsat PM, Bansal S, Prasad P, Satish Arvandekar A. Oral field cancerization: A critical appraisal. *Oral Oncol.* 2021;118:105304.
39. Saikishore R, Velmurugan P, Ranjithkumar D, Latha R, Sathiamoorthi T, Arun A, et al. The Circular RNA-miRNA Axis: A Special RNA Signature Regulatory Transcriptome as a Potential Biomarker for OSCC. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2020;22:352-61.
40. Sannam Khan R, Khurshid Z, Akhbar S, Faraz Moin S. Advances of Salivary Proteomics in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) Detection: An Update. *Proteomes.* 2016;4(4).
41. Choi JH, Lee BS, Jang JY, Lee YS, Kim HJ, Roh J, et al. Single-cell transcriptome profiling of the stepwise progression of head and neck cancer. *Nat Commun.* 2023;14(1):1055.
42. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, Gonzalez-Moles MA, Kerr AR, et al. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international

- seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis.* 2021;27(8):1862-80.
43. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309-16.
44. Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L, Ruoppo E, Lo Muzio L. Oral and pharyngeal cancer: lack of prevention and early detection by health care providers. *Eur J Cancer Prev.* 2001;10(4):381-3.
45. Pitiphat W, Diehl SR, Laskaris G, Cartsos V, Douglass CW, Zavras AI. Factors associated with delay in the diagnosis of oral cancer. *J Dent Res.* 2002;81(3):192-7.
46. Jones TM, Hargrove O, Lancaster J, Fenton J, Shenoy A, Roland NJ. Waiting times during the management of head and neck tumours. *J Laryngol Otol.* 2002;116(4):275-9.
47. Hollows P, McAndrew PG, Perini MG. Delays in the referral and treatment of oral squamous cell carcinoma. *Br Dent J.* 2000;188(5):262-5.
48. Haughey BH, Gates GA, Arfken CL, Harvey J. Meta-analysis of second malignant tumors in head and neck cancer: the case for an endoscopic screening protocol. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1992;101(2 Pt 1):105-12.
49. de Bree R, Deurloo EE, Snow GB, Leemans CR. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope.* 2000;110(3 Pt 1):397-401.
50. Spector JG, Sessions DG, Haughey BH, Chao KS, Simpson J, El Mofty S, et al. Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope.* 2001;111(6):1079-87.
51. AWMF. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms; AWMF-Registernummer: 007/100 OL, Version 3.0 - März 2021: AWMF; [02.05.2025]. Available from: https://register.awmf.org/assets/guidelines/007-100OLI_S3-Diagnostik-Therapie-Mundhoehlenkarzinom_2021-03.pdf. (Zugriff am 27.10.25)
52. Bettendorf O, Piffko J, Bankfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncol.* 2004;40(2):110-9.
53. Mattavelli D, Ferrari M, Taboni S, Morello R, Paderno A, Rampinelli V, et al. The 8th TNM classification for oral squamous cell carcinoma: What is gained, what is lost, and what is missing. *Oral Oncol.* 2020;111:104937.
54. Almangush A, Makitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojan P, Rinaldo A, et al. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. *Oral Oncol.* 2020;107:104799.
55. Chieng CY, Davies A, Lowe D, Bekiroglu F, Khattak O, Schache A, et al. Clinical characteristics, treatment intent, and outcome in a consecutive 10-year cohort of oral cancer patients aged 75 years and older. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2021;59(3):303-11.
56. Yamada S, Kurita H, Shimane T, Kamata T, Uehara S, Tanaka H, et al. Estimation of the width of free margin with a significant impact on local recurrence in surgical resection of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016;45(2):147-52.
57. Baik MH, Friesner RA, Lippard SJ. Theoretical study of cisplatin binding to purine bases: why does cisplatin prefer guanine over adenine? *J Am Chem Soc.* 2003;125(46):14082-92.
58. dos Santos CR, Goncalves Filho J, Magrin J, Johnson LF, Ferlito A, Kowalski LP. Involvement of level I neck lymph nodes in advanced squamous carcinoma of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2001;110(10):982-4.
59. Johansen LV, Grau C, Overgaard J. Hypopharyngeal squamous cell carcinoma--treatment results in 138 consecutively admitted patients. *Acta Oncol.* 2000;39(4):529-36.
60. Levendag PC, Nowak PJ, van der Sangen MJ, Jansen PP, Eijkenboom WM, Planting AS, et al. Local tumor control in radiation therapy of cancers in the head and neck. *Am J Clin Oncol.* 1996;19(5):469-77.
61. Byers RM, El-Naggar AK, Lee YY, Rao B, Fornage B, Terry NH, et al. Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue? *Head Neck.* 1998;20(2):138-44.
62. Spiro JD, Spiro RH, Shah JP, Sessions RB, Strong EW. Critical assessment of supraomohyoid neck dissection. *Am J Surg.* 1988;156(4):286-9.

63. Bier J. Radical neck dissection versus conservative neck dissection for squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Recent Results Cancer Res.* 1994;134:57-62.
64. Shah JP, Candela FC, Poddar AK. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* 1990;66(1):109-13.
65. Cole I, Hughes L. The relationship of cervical lymph node metastases to primary sites of carcinoma of the upper aerodigestive tract: a pathological study. *Aust N Z J Surg.* 1997;67(12):860-5.
66. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2004;350(19):1937-44.
67. Bernier J, Dommenege C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(19):1945-52.
68. Cabrera Rodriguez J, Cacicedo J, Giral J, Garcia Miragall E, Lloret M, Arias F, et al. GEORCC recommendations on target volumes in radiotherapy for Head Neck Cancer of Unknown Primary. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;130:51-9.
69. Vozenin MC, Bourhis J, Durante M. Towards clinical translation of FLASH radiotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022;19(12):791-803.
70. Awwad HK, Lotayef M, Shouman T, Begg AC, Wilson G, Bentzen SM, et al. Accelerated hyperfractionation (AHF) compared to conventional fractionation (CF) in the postoperative radiotherapy of locally advanced head and neck cancer: influence of proliferation. *Br J Cancer.* 2002;86(4):517-23.
71. Ang KK, Trotti A, Brown BW, Garden AS, Foote RL, Morrison WH, et al. Randomized trial addressing risk features and time factors of surgery plus radiotherapy in advanced head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;51(3):571-8.
72. Vanags D, Williams B, Johnson B, Hall S, Nash P, Taylor A, et al. Therapeutic efficacy and safety of chaperonin 10 in patients with rheumatoid arthritis: a double-blind randomised trial. *Lancet.* 2006;368(9538):855-63.
73. Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun RJ, Saunders DP, Lalla RV, Migliorati CA, et al. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer Med.* 2017;6(12):2918-31.
74. Huang SH, O'Sullivan B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18(2):e233-40.
75. Benhamou Y, Picco V, Raybaud H, Sudaka A, Chamorey E, Brolih S, et al. Telomeric repeat-binding factor 2: a marker for survival and anti-EGFR efficacy in oral carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(28):44236-51.
76. Huang SH, Hahn E, Chiosea SI, Xu ZY, Li JS, Shen L, et al. The role of adjuvant (chemo-)radiotherapy in oral cancers in the contemporary era. *Oral Oncol.* 2020;102:104563.
77. Laramore GE, Scott CB, al-Sarraf M, Haselow RE, Ervin TJ, Wheeler R, et al. Adjuvant chemotherapy for resectable squamous cell carcinomas of the head and neck: report on Intergroup Study 0034. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992;23(4):705-13.
78. 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.
79. Bernier J. Current state-of-the-art for concurrent chemoradiation. *Semin Radiat Oncol.* 2009;19(1):3-10.
80. Ord RA, Blanchaert RH, Jr. Current management of oral cancer. A multidisciplinary approach. *J Am Dent Assoc.* 2001;132 Suppl:19S-23S.
81. Wensing KU, Ciarimboli G. Saving ears and kidneys from cisplatin. *Anticancer Res.* 2013;33(10):4183-8.
82. National Center for Biotechnology Information; PubChem Compound Summary for CID 5460033, Cisplatin 2025 [03.05.2025]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5460033>. (Zugriff am 27.10.25)

83. Dasari S, Njiki S, Mbemi A, Yedjou CG, Tchounwou PB. Pharmacological Effects of Cisplatin Combination with Natural Products in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3).
84. Romani AMP. Cisplatin in cancer treatment. *Biochem Pharmacol.* 2022;206:115323.
85. Herausgegeben von Thomas Herdegen uMvRB, juraj Culman, Peter Gohlke, Thomas Herdegen, Gerd Luippold, Vicki Wätzig. *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie:* Thieme; 10.07.2024.
86. Symonds P. Chemoradiation: the new gold standard for non-surgical treatment of cervical cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2002;14(3):201-2.
87. Fang CY, Lou DY, Zhou LQ, Wang JC, Yang B, He QJ, et al. Natural products: potential treatments for cisplatin-induced nephrotoxicity. *Acta Pharmacol Sin.* 2021;42(12):1951-69.
88. Jonathan EC, Bernhard EJ, McKenna WG. How does radiation kill cells? *Curr Opin Chem Biol.* 1999;3(1):77-83.
89. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol.* 2010;31(4):363-72.
90. Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist.* 2006;11(4):342-57.
91. Ocker M, Hopfner M. Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy. *Eur Surg Res.* 2012;48(3):111-20.
92. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
93. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY).* 2016;8(4):603-19.
94. Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol.* 2011;103:55-98.
95. Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, Ahmad W, Siddiqui S, Alam M, et al. Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. *Cells.* 2024;13(22).
96. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3448-59.
97. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2005;37(11):719-27.
98. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell.* 2009;138(5):838-54.
99. Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure.* 2013;21(4):501-15.
100. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30(1):87.
101. Bortner CD, Cidlowski JA. A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 1998;56(12):1549-59.
102. Souza JP, Cerqueira Ede M, Meireles JR. Chromosome damage, apoptosis, and necrosis in exfoliated cells of oral mucosa from androgenic anabolic steroids users. *J Toxicol Environ Health A.* 2015;78(2):67-77.
103. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
104. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994;73(8):2013-26.
105. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980;284(5756):555-6.
106. Newton K, Strasser A, Kayagaki N, Dixit VM. Cell death. *Cell.* 2024;187(2):235-56.
107. Dabrowska C, Li M, Fan Y. Apoptotic Caspases in Promoting Cancer: Implications from Their Roles in Development and Tissue Homeostasis. *Adv Exp Med Biol.* 2016;930:89-112.
108. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer.* 2009;124(3):511-5.
109. Rothenberg SM, Ellisen LW. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest.* 2012;122(6):1951-7.

110. Ding ZY, Liu GH, Olsson B, Sun XF. Upregulation of the antiapoptotic factor Livin contributes to cisplatin resistance in colon cancer cells. *Tumour Biol.* 2013;34(2):683-93.
111. Reichert CO, de Macedo CG, Levy D, Sini BC, Monteiro AM, Gidlund M, et al. Paraoxonases (PON) 1, 2, and 3 Polymorphisms and PON-1 Activities in Patients with Sickle Cell Disease. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(8).
112. Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med (Berl).* 2003;81(12):766-79.
113. 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.
114. Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltran R, Joven J, et al. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(2):146-57.
115. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res.* 2005;46(6):1239-47.
116. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Kruger M, Strand D, Forstermann U. Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation.* 2007;115(15):2055-64.
117. Mackness M, Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene.* 2015;567(1):12-21.
118. Kedage V, Muttigi MS, Shetty MS, Suvarna R, Rao SS, Joshi C, et al. Serum paraoxonase 1 activity status in patients with liver disorders. *Saudi J Gastroenterol.* 2010;16(2):79-83.
119. Aggarwal G, May-Zhang LS, Yermalitsky V, Dikalov S, Voynov MA, Amarnath V, et al. Myeloperoxidase-induced modification of HDL by isolevuglandins inhibits paraoxonase-1 activity. *J Biol Chem.* 2021;297(3):101019.
120. van Himbergen TM, van Tits LJ, Roest M, Stalenhoef AF. The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Neth J Med.* 2006;64(2):34-8.
121. Linton MF, Yancey PG, Tao H, Davies SS. HDL Function and Atherosclerosis: Reactive Dicarbonyls as Promising Targets of Therapy. *Circ Res.* 2023;132(11):1521-45.
122. Kotur-Stevuljevic J, Vekic J, Stefanovic A, Zeljkovic A, Ninic A, Ivanisevic J, et al. Paraoxonase 1 and atherosclerosis-related diseases. *Biofactors.* 2020;46(2):193-205.
123. Priyanka K, Singh S, Gill K. Paraoxonase 3: Structure and Its Role in Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Biomolecules.* 2019;9(12).
124. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(4):542-7.
125. Taler-Vercic A, Golicnik M, Bavec A. The Structure and Function of Paraoxonase-1 and Its Comparison to Paraoxonase-2 and -3. *Molecules.* 2020;25(24).
126. Bacchetti T, Ferretti G, Sahebkar A. The role of paraoxonase in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2019;56:72-86.
127. Schweikert EM, Devarajan A, Witte I, Wilgenbus P, Amort J, Forstermann U, et al. PON3 is upregulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death. *Cell Death Differ.* 2012;19(9):1549-60.
128. Ribarska T, Ingenwerth M, Goering W, Engers R, Schulz WA. Epigenetic inactivation of the placentally imprinted tumor suppressor gene TFPI2 in prostate carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics.* 2010;7(2):51-60.
129. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(2):153-63.
130. Garrick JM, Dao K, de Laat R, Elsworth J, Cole TB, Marsillach J, et al. Developmental expression of paraoxonase 2. *Chem Biol Interact.* 2016;259(Pt B):168-74.

131. Altenhofer 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.
132. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8416763.
133. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med.* 1999;31(2):53-9.
134. Kong H, Chandel NS. Regulation of redox balance in cancer and T cells. *J Biol Chem.* 2018;293(20):7499-507.
135. Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ.* 2009;16(7):1040-52.
136. Kruger 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.
137. 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. *J Biol Chem.* 2001;276(48):44444-9.
138. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie.* 2017;132:19-27.
139. Witte I, Altenhofer 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.
140. Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(3):468-74.
141. Witte I, Foerstermann U, Devarajan A, Reddy ST, Horke S. Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer. *J Lipids.* 2012;2012:342806.
142. Bacchetti T, Sartini D, Pozzi V, Cacciamani T, Ferretti G, Emanuelli M. Exploring the role of paraoxonase-2 in bladder cancer: analyses performed on tissue samples, urines and cell cultures. *Oncotarget.* 2017;8(17):28785-95.
143. Suh DH, Kim MK, Kim HS, Chung HH, Song YS. Unfolded protein response to autophagy as a promising druggable target for anticancer therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1271(1):20-32.
144. Kang H, Chen IM, Wilson CS, Bedrick EJ, Harvey RC, Atlas SR, et al. Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2010;115(7):1394-405.
145. Li Y, Li Y, Tang R, Xu H, Qiu M, Chen Q, et al. Discovery and analysis of hepatocellular carcinoma genes using cDNA microarrays. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002;128(7):369-79.
146. Kotsafti A, Scarpa M, Castagliuolo I, Scarpa M. Reactive Oxygen Species and Antitumor Immunity-From Surveillance to Evasion. *Cancers (Basel).* 2020;12(7).
147. Yu Y, Liu S, Yang L, Song P, Liu Z, Liu X, et al. Roles of reactive oxygen species in inflammation and cancer. *MedComm (2020).* 2024;5(4):e519.
148. Cheung EC, Vousden KH. The role of ROS in tumour development and progression. *Nat Rev Cancer.* 2022;22(5):280-97.
149. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(12):931-47.
150. Zheng Z, Su J, Bao X, Wang H, Bian C, Zhao Q, et al. Mechanisms and applications of radiation-induced oxidative stress in regulating cancer immunotherapy. *Front Immunol.* 2023;14:1247268.
151. Ionescu C, Kamal FZ, Ciobica A, Halitchi G, Burlui V, Petroaie AD. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Oral Cancer. *Biomedicines.* 2024;12(6).
152. Campagna R, Serritelli EN, Salvolini E, Schiavoni V, Cecati M, Sartini D, et al. Contribution of the Paraoxonase-2 Enzyme to Cancer Cell Metabolism and Phenotypes. *Biomolecules.* 2024;14(2).

153. Parween F, Gupta RD. Insights into the role of paraoxonase 2 in human pathophysiology. *J Biosci.* 2022;47(1).
154. Gioanni J, Fischel JL, Lambert JC, Demard F, Mazeau C, Zanghellini E, et al. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1988;24(9):1445-55.
155. Rheinwald JG, Beckett MA. Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 1981;41(5):1657-63.
156. Rheinwald JG, Beckett MA. Defective terminal differentiation in culture as a consistent and selectable character of malignant human keratinocytes. *Cell.* 1980;22(2 Pt 2):629-32.
157. Wu YJ, Rheinwald JG. A new small (40 kd) keratin filament protein made by some cultured human squamous cell carcinomas. *Cell.* 1981;25(3):627-35.
158. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
159. Li YR, Zhu H, Kauffman M, Danelisen I, Misra HP, Ke Y, et al. Paraoxonases function as unique protectors against cardiovascular diseases and diabetes: Updated experimental and clinical data. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;239(8):899-906.
160. Kowalska K, Socha E, Milnerowicz H. Review: The role of paraoxonase in cardiovascular diseases. *Ann Clin Lab Sci.* 2015;45(2):226-33.
161. Costa LG, de Laat R, Dao K, Pellacani C, Cole TB, Furlong CE. Paraoxonase-2 (PON2) in brain and its potential role in neuroprotection. *Neurotoxicology.* 2014;43:3-9.
162. Bourika V, Bartzeliotou A, Spiliopoulou C, Michos A, Papassotiriou I, Siahaidou T. Paraoxonase (PON)-1 activity in septic neonates: One more arrow in the quiver of biomarkers of neonatal sepsis? *Clin Biochem.* 2021;93:119-21.
163. Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Girtman K, Williams WK, et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood.* 2003;102(8):2951-9.
164. 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.
165. Kamal MV, Prabhu K, Sharan K, Pai A, Chakrabarty S, Damerla RR, et al. Investigation of the Molecular Mechanisms of Paraoxonase-2 Mediated Radiotherapy and Chemotherapy Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clin Transl Sci.* 2025;18(4):e70201.
166. Belloni A, Campagna R, Notarstefano V, Pozzi V, Orilisi G, Pompei V, et al. Deepening Cisplatin sensitivity on Oral Squamous cell Carcinoma cell lines after PON2 knockdown: A FTIRM investigation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2025;330:125726.
167. Campagna R, Belloni A, Pozzi V, Salvucci A, Notarstefano V, Togni L, et al. Role Played by Paraoxonase-2 Enzyme in Cell Viability, Proliferation and Sensitivity to Chemotherapy of Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2022;24(1).
168. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. *Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. Lancet.* 2000;355(9208):949-55.
169. Budach W, Hehr T, Budach V, Belka C, Dietz K. A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer.* 2006;6:28.
170. Zraik IM, Hess-Busch Y. [Management of chemotherapy side effects and their long-term sequelae]. *Urologe A.* 2021;60(7):862-71.
171. Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol Res.* 2016;106:27-36.
172. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene.* 2012;31(15):1869-83.

173. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev.* 2012;64(3):706-21.
174. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7265-79.
175. Precourt LP, Marcil V, Ntimbane T, Taha R, Lavoie JC, Delvin E, et al. Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(5):G623-34.
176. Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis.* 2016;7(6):e2253.
177. Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, et al. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:6175804.
178. Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(4):695-705.
179. Reczek CR, Chandel NS. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annu Rev Cancer Biol.* 2017;1:79-98.
180. Kumari S, Badana AK, G MM, G S, Malla R. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark Insights.* 2018;13:1177271918755391.
181. Wang Y, Branicky R, Noe A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018;217(6):1915-28.
182. Gebicka L, Krych-Madej J. The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *J Inorg Biochem.* 2019;197:110699.
183. Zhang J, Hao H, Wu X, Wang Q, Chen M, Feng Z, et al. The functions of glutathione peroxidase in ROS homeostasis and fruiting body development in *Hypsizygus marmoreus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(24):10555-70.
184. Lv H, Zhen C, Liu J, Yang P, Hu L, Shang P. Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:3150145.
185. Faria SC, Sagebiel T, Patnana M, Cox V, Viswanathan C, Lall C, et al. Tumor markers: myths and facts unfolded. *Abdom Radiol (NY).* 2019;44(4):1575-600.
186. Passaro A, Al Bakir M, Hamilton EG, Diehn M, Andre F, Roy-Chowdhuri S, et al. Cancer biomarkers: Emerging trends and clinical implications for personalized treatment. *Cell.* 2024;187(7):1617-35.
187. Das S, Dey MK, Devireddy R, Gartia MR. Biomarkers in Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis. *Sensors (Basel).* 2023;24(1).
188. Mu X, Yi X, Xiao S, Wang C, Chen G, Li Y. Substrates for Paraoxonase. *Curr Pharm Des.* 2018;24(5):615-27.
189. Devarajan A, Bourquard N, Grijalva VR, Gao F, Ganapathy E, Verma J, et al. Role of PON2 in innate immune response in an acute infection model. *Mol Genet Metab.* 2013;110(3):362-70.
190. 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.
191. Sukketsiri W, Porntadavity S, Phivthong-ngam L, Lawanprasert S. Lead inhibits paraoxonase 2 but not paraoxonase 1 activity in human hepatoma HepG2 cells. *J Appl Toxicol.* 2013;33(7):631-7.

8 Anhang

9 Danksagung

10 Tabellarischer Lebenslauf

