

Aus der Klinik für Urologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Peter Albers

Lange nicht-kodierende RNAs als Biomarker in
Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von
Madeleine Voß
2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Schulz

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Michael Sabel

Für Mama, in ewiger Liebe

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- Sassenberg M, Droop J, Schulz WA, Dietrich D, Loick SM, Wiek C, Scheckenbach K, Gaisa NT, Hoffmann MJ: Upregulation of the long-noncoding RNA CASC9 as a biomarker for squamous cell carcinoma; *BMC Cancer*, 2019 (1), 806. doi:10.1186/s12885-019-6021-6

Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (*HNSCC*) entstehen aus Zellen der Mukosa in Mund, Nase und Schlund. Das *HNSCC* stellt den sechsthäufigsten Tumor in Industriestaaten dar und gilt als häufigste bösartige Veränderung des oberen Respirationstraktes. Gehäuft tritt diese Tumorerkrankung bei Männern zwischen 50 und 70 Jahren auf; sie wird vor allem durch das Rauchen und erhöhten Alkoholkonsum verursacht. Die Inzidenz in jüngeren Bevölkerungsgruppen steigt, was in ca. 30% aller Fälle mit einer vorliegenden HPV-Infektion assoziiert ist.

Die HPV-assoziierten Tumore stellen offenbar eine biologisch und klinisch distinkte Subgruppe dar, die mit einem besseren Therapieansprechen und somit einer besseren Prognose vergesellschaftet ist. In frühen Tumorstadien haben Patienten eine gute Überlebensprognose, die sich jedoch mit Fortschreiten der Erkrankung drastisch reduziert. Da viele Tumore - aufgrund fehlender Früherkennung - erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden, sind die Überlebenschancen der Patienten bei Erstdiagnose bereits vermindert. Für die Therapieeinschätzung dieser Tumore ist es wichtig, jenseits von histopathologischen Parametern und HPV-Status geeignete Biomarker zur Früherkennung, Prädiktion von Therapieansprechen und klinischem Verlauf zu finden. Als potentieller Biomarker werden in dieser Arbeit lange nicht kodierende RNAs, kurz lncRNAs, untersucht. Von diesen mindestens 200 bp langen RNAs ist aus verschiedenen Tumorentitäten bekannt, dass sie vielfältige Wirkungen auf Zellen ausüben und auch in der Tumorgenese eine bedeutende Rolle spielen können.

Vor diesem Hintergrund wurden mittels Literatur- und Datenbankrecherchen potentiell in *HNSCC* verändert exprimierte lncRNAs identifiziert und ihre Expression in Gewebesets mit Tumor- und Normalproben gemessen.

Hierbei stellten sich die lncRNAs HOTAIR, HOXB-AS3 und CASC9 als signifikant überexprimiert in Tumoren dar. Das Hauptaugenmerk wurde im weiteren Verlauf auf CASC9 gelegt und dessen Expression in einer Serie von 49 Tumoren und 20 Normalgeweben mittels qRT-PCR gemessen. Nach Auswertung der klinischen Patientendaten zeigte sich CASC9 - im Einklang mit den Datenbankanalysen - signifikant überexprimiert, auch in fortgeschrittenen Tumorstadien sowie metastasierten Tumoren.

Weitere Datenbankrecherchen ergaben, dass CASC9 signifikant in vielen weiteren Plattenepithelkarzinomen überexprimiert wird, sodass der funktionelle Einfluss dieser lncRNA auf Tumorzellen näher betrachtet wurde.

Hierzu wurde in zwei verschiedenen Versuchsansätzen auf der einen Seite die Überexpression von CASC9 mittels lentiviraler Transduktion in Vektoren, sowie auf der anderen Seite eine Herabregulation von CASC9 mittels shRNA („Knockdown“) erreicht und die Effekte auf Proliferation, Migration und Invasion verschiedener Zelllinien analysiert. Sowohl die - jeweils verifizierte - Überexpression als auch der Knockdown von CASC9 in Zelllinien lösten jedoch nur geringe zelluläre Effekte im Zellkulturmodell aus. Es lässt sich dennoch festhalten, dass CASC9 ein vielversprechender Biomarker-Kandidat zur Identifizierung von Plattenepithelkarzinomen ist. Dabei ist CASC9 offenbar kein Hauptinduktor zellulärer Veränderungen, sondern wirkt vermutlich mit entitätsspezifischen Kofaktoren zusammen und könnte so zu einer Dysregulation in der Zelle beitragen. Als weiterführende Fragestellung der Forschung um CASC9 ergibt sich somit die Identifizierung der Faktoren, die zur Überexpression von CASC9 in Plattenepithelkarzinomen führen.

Summary

Squamous carcinoma of the head and neck (*HNSCC*) is the sixth most common malignancy overall and the most common malignancy of the upper respiratory tract. It is caused mostly by cigarette smoking and alcohol consumption and occurs especially in men aged 50-70 years. In recent years, the incidence in the younger generation has increased because of human papillomavirus (HPV) infection. Radiation therapy, surgery, chemotherapy, treatment with EGFR antibodies, immune checkpoint inhibitors or combined treatments are applied for primary tumors and recurrent or metastatic disease. Patients with localized *HNSCC* and low tumor stage have a high chance of cure. The disease recurs in up to 50% of the cases. For high stage, metastatic and recurrent *HNSCC* treatment options are limited and the outcome is therefore unfavorable. One problem in *HNSCC* is the belated diagnosis of many tumors which aggravates prognosis. To date, clinically validated prognostic biomarkers for *HNSCC* are lacking except for HPV positivity, which predicts favorable survival and better response to radio- and chemotherapy.

For these reasons new diagnostic and prognostic markers are required. Long noncoding RNAs (lncRNAs) are potential biomarkers, as they are considered in the literature as good candidates for tumor biomarkers and regulators of various neoplastic cell properties. By definition, lncRNAs do not contain substantial open reading frames and consist of more than 200 nucleotides. They can be involved in various cellular processes like proliferation, metastasis or apoptosis. lncRNAs are known to be differentially expressed in tumors and may actively contribute to their development and progression.

In this thesis differentially expressed lncRNAs in *HNSCC* were identified by literature and database research. Their expression was then analyzed in two different tissue sets of *HNSCC* tumor and benign tissue samples. *CASC9*, *HOTAIR* and *HOXB-AS3* were found to be upregulated in tumors. *CASC9* expression was in particular upregulated in advanced tumor stages and metastatic cases. Literature data and a pan-cancer analysis based on data from The Cancer Genome Atlas indicated *CASC9* to be overexpressed in other squamous cell cancer types suggesting *CASC9* as general biomarker of squamous cell cancers as well.

To understand the consequences of *CASC9* overexpression in tumors, in vitro experiments were performed in *HNSCC* cell lines to explore the effects of *CASC9* expression on cell proliferation, clonogenicity, migration or chemosensitivity. However, upregulation or shRNA-mediated downregulation (knockdown) of *CASC9* had no major effects on tumor cells.

In conclusion, *CASC9* does not appear to be a driving factor in cancers of the oral and oropharyngeal tract but can discriminate well between cancerous and benign samples. Being robustly overexpressed in *HNSCC* *CASC9* is a promising candidate for tumor detection, potentially also of squamous cell carcinomas in other organs. An important question for future work is therefore which factors drive the overexpression of *CASC9* in *HNSCC* and other squamous cell carcinomas.

Abkürzungsverzeichnis:

- AUC- area under the curve
- BC200- brain cytoplasmic 200 long-noncoding RNA
- BLCA- bladder urothelial carcinoma (Abk. lt. *TCGA* Konsortium)
- bp- Basenpaare
- BRCA- breast invasive carcinoma (Abk. lt. *TCGA* Konsortium)
- Ca- Carcinoma
- CAM- chick embryo chorioallantoic membrane model
- CASC9- cancer susceptibility candidate 9
- CCND1- kodierendes Gen für Cyklin D1
- CDK6- cyclin dependent kinase 6
- cDNA- complementary DNA
- CESC- cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma
- CT- Computertomografie
- DFS- disease free survival
- DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- dNTP- Desoxyribonukleosidtriphosphate
- DUXAP8- double homeobox A pseudogene 8
- EGFR- epidermal growth factor receptor
- EMT- epithelial-mesenchymale Transition
- EZH2- enhancer of zeste homolog 2
- FACS- Fluorescence-Activated-Cell-Sorter
- FBXW7- F-box/WD repeat-containing protein 7
- FCS- fetal calf serum
- G- (Tumor) grade
- GAPDH- Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
- GFP- green fluorescent protein
- H3K27- Lysin an Position 27 in Histone H3
- HNRPL- heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
- HNSCC- head and neck squamous cell carcinoma
- HOTAIR- HOX transcript antisense RNA
- HOXA-AS4- homeobox protein A 4 antisense RNA

- HOXA10- homebox protein A10
- HOXA9- homebox protein A 9
- HOXB-AS3- homebox protein B 3 antisense RNA
- HOXB4- homebox protein B4
- HOXB8- homebox protein B 8
- HOXC13-AS- homebox C 13 antisense RNA
- HPV- humane Papillomviren
- IC50- mittlere inhibitorische Konzentration
- Jag1- Jagged 1
- Jag2- Jagged 2
- kb- Kilobasen
- KICH- kidney chromophobe (Abk. lt. *TCGA* Konsortium)
- KIRC- kidney renal clear cell carcinoma (Abk. lt. *TCGA* Konsortium)
- KIRP- kidney renal papillary cell carcinoma (Abk. lt. *TCGA* Konsortium)
- LIHC- liver hepatocellular carcinoma (Abk. lt. *TCGA* Konsortium)
- LK- Lymphknoten
- lncRNA- long noncoding RNA
- LUAD- lung adenocarcinoma (Abk. lt. *TCGA* Konsortium)
- LUSC- lung squamous cell carcinoma (Abk. lt. *TCGA* Konsortium)
- M- (Tumor) metastasis
- MALAT1- metastasis lung adenocarcinoma transcript 1
- MDM2- mouse double minute 2 homolog
- miRNA- mikroRNA
- mRNA- messenger RNA
- MRT- Magnetresonanztomografie
- MUC22- mucin 22
- N- (Tumor) nodes
- NEAT1-nuclear paraspeckle assembly transcript 1
- NHEK- normal human epidermal keratinocytes
- NKX2-1-AS1- NK2 homebox 1 antisense RNA 1
- NOTCH1- Notch homolog 1, translocation-associated *Drosophila*
- NOTCH2- neurogenic locus notch homolog protein 2

- OSCC- oral squamous cell carcinoma
- p53- nukleäres Phosphoprotein 53
- PAX9- paired box gene 9
- PBS- phosphate-buffered saline
- PCA3- prostate cancer antigen 3
- PDCD4- programmed cell death protein 4
- PRAD- prostate adenocarcinoma (Abk. lt. *TCGA* Konsortium)
- PRDM9- PR domain zinc finger protein 9
- Q5- Q-Solution
- qRT-PCR- real time quantitative PCR
- RIN- RNA integrity number, Qualitätsmerkmal für RNA
- RNA- ribonucleic acid
- ROC- Receiver-Operating-Curves
- rpm- rounds per minute
- SAFB2- Scaffold attachment factor B2
- SDHA- Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A
- shRNA- small hairpin RNA
- SLITRK3- SLIT and NTRK like family member 3
- SNHG6- snRNA host gene 6
- STAD- stomach adenocarcinoma (Abk. lt. *TCGA* Konsortium)
- STAU1- Staufenprotein 1
- T- tumor
- TBP- TATA-binding protein
- TCGA- The Cancer Genome Atlas
- THCA- thyroid carcinoma (Abk. lt. *TCGA* Konsortium)
- TINCR- TINCR ubiquitin domain containing
- TNM- tumour, nodes, metastasis
- UCEC- uterine corpus endometroid carcinoma (Abk. lt. *TCGA* Konsortium)
- ZNRF4- Zinc and ring finger 4

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Epidemiologie, Klinik und Therapie von Kopf-Hals Plattenepithelkarzinomen	1
1.2	Molekulargenetik von Kopf-Hals Plattenepithelkarzinomen	3
1.3	Zielsetzung der Arbeit	8
2	<i>Material und Methoden</i>	9
2.1	Material	9
2.1.1	Gewebeproben aus Düsseldorf	9
2.1.2	Gewebeproben aus Bonn	14
2.1.3	Gewebeset der chirurgischen Klinik der Universitätsklinik Düsseldorf	20
2.1.4	Zelllinien	21
2.1.5	Chemikalien	24
2.1.6	Enzyme	25
2.1.7	Medien, Puffer und Lösungen	25
2.1.8	Molekularbiologische Kits	26
2.1.9	Laborgeräte	26
2.1.10	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.11	Oligonukleotidprimer	29
2.1.12	shRNA gegen CASC9	32
2.2	Software	32
2.2.1	Programme	32
2.2.2	Datenbanken	32
2.3	Methoden	33
2.3.1	Zellkultur	33
2.3.2	RNA-Extraktion mittels Trizol	34
2.3.3	Reverse Transkription	35
2.3.4	Quantitative Realtime-PCR	36
2.3.5	Gelelektrophoretische Methoden	39
2.4	Funktionelle Experimente	40
2.4.1	Klonierung von pMF11bdEGNwo aus pMF11bdEGwo und PUC	40
2.4.2	Klonierung von pMF11bdEGNwo mit CASC9	43
2.4.3	shRNA vermittelter CASC9 Knockdown in UM-SSC-14A	46
2.4.4	Überexpression von CASC9 in FaDu und HaCaT Zellen	51
2.5	Statistische Verfahren	52
2.5.1	Korrelation mit klinischen Parametern	52

3	<i>Ergebnisse</i>	53
3.1	Datenbankanalyse zur Suche nach lncRNA Biomarker-Kandidaten für das HNSCC	53
3.2	Bestimmung der Expression von lncRNAs in Gewebeproben aus Kopf-Hals Plattenepithelkarzinomen mittels qRT-PCR	60
3.2.1	NKX2-1-AS1	62
3.2.2	CASC9	64
3.2.3	HOXB-AS3	66
3.2.4	TINCR	68
3.2.5	HOTAIR	70
3.2.6	SNHG6	72
3.2.7	Linc01116	74
3.3	Korrelationen mit klinischen Parametern	76
3.4	Messung signifikant veränderter lncRNAs in unabhängigen Gewebeproben von Kopf und Hals	79
3.5	CASC 9 Messung in Gewebeproben im Vergleich von Primärtumor und Lymphknotenmetastase	83
3.6	CASC9 in weiteren Tumorentitäten	85
3.7	Messung signifikant veränderter lncRNAs in Zelllinien der Hals-Nasen- Ohrenklinik	88
3.8	Funktionelle Experimente	90
3.8.1	shRNA vermittelter Knockdown von CASC9 in UM-SSC-14A	90
3.8.2	Stabile Überexpression von CASC9 mittels lentiviraler Transduktion	94
4	<i>Diskussion</i>	105
4.1	Identifikation von Biomarkern im Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals	105
4.2	lncRNAs als potentielle Biomarker in Tumoren	106
4.3	Identifikation von lncRNAs als Biomarkerkandidaten im HNSCC	108
4.4	Messung der lncRNAs in Gewebeproben von Kopf und Hals	110
4.5	Korrelation der lncRNAs mit klinischen Patientenparametern	114
4.6	CASC9 Überexpression in anderen Tumoren	115
4.7	Funktionelle Untersuchungen von CASC9	118
4.8	Überexpression von CASC9 in verschiedenen Tumorentitäten	122
4.9	Schlussfolgerung	123
5	<i>Literaturverzeichnis</i>	124
6	<i>Danksagung</i>	129

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie, Klinik und Therapie von Kopf-Hals Plattenepithelkarzinomen

Den Großteil aller Tumore des Kopf-Hals Bereiches bilden Plattenepithelkarzinome. Sie entstehen aus Dysplasien des Plattenepithels und finden sich in Mund, Nase und Rachen. Als Plattenepithel gilt dabei die äußerste Gewebeschicht, welche die Oberfläche eines Gewebes bildet. Die einzelnen Zellschichten des Plattenepithels sind fest miteinander verbunden und dienen als Schutzbarriere des unterliegenden Gewebes.

Bei den Plattenepithelien verschiedener Organe und Organsysteme unterscheidet man zwischen ein- und mehrschichtigem sowie zwischen verhornendem und nicht verhornendem Plattenepithel. Im Kopf-Hals Bereich ist das mehrschichtig unverhornte Plattenepithel zu finden, von dem aus sich ein Tumor in Mund, Nase und Rachen entwickeln kann [1].

Das Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals wird nach seiner Lokalisation klassifiziert und in Subtypen eingeteilt. Man unterscheidet zwischen Karzinomen von Mundhöhle, Oropharynx, Nasopharynx, Larynx und Hypopharynx, was wesentlich für die Prognose und die Therapie ist. Abhängig von der Lokalisation macht sich der Tumor durch verschiedene Symptome bemerkbar. Dazu zählen Lymphknotenschwellungen des Halses, Heiserkeit und Schluckbeschwerden unklarer Genese, die länger als drei Wochen anhalten. In vielen Fällen werden die Symptome unterschätzt und für grippale Infekte gehalten, weshalb eine frühzeitige Diagnose in vielen Fällen nicht geschieht [1].

Die Diagnosestellung erfolgt mittels klinischer Inspektion und Palpation. Bei Malignitätsverdacht erfolgt eine Bildgebung mittels CT und MRT sowie eine Röntgenuntersuchung zur Detektion von Metastasen. Um die Verdachtsdiagnose zu bestätigen, ist eine Biopsie zwingend notwendig [1].

Mit einer Inzidenz von 700.000 Neuerkrankungen stellt das Plattenepithelkarzinom von Kopf- und Hals die sechsthäufigste Tumorentität in Industrienationen dar. Betroffen sind dabei vor allem Männer über 50, wobei die Inzidenz in den letzten Jahren bei jüngeren Altersklassen zugenommen hat [2].

Die Entstehung der Tumore wird durch mehrere Risikofaktoren begünstigt. Dazu zählt vor allem Nikotinabusus, welcher das Risiko zu erkranken erhöht - insbesondere in Kombination mit gleichzeitigem Alkoholabusus. Zu den Risikofaktoren bzw. Ursachen von

Kopf-Hals Tumoren zählt weiter eine Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV), vor allem den „*high-risk*“ Typen 16 und 18. Diese „*high-risk*“ Viren sind maßgeblich an der Entstehung von Dysplasien beteiligt und begünstigen die Entstehung von Tumoren [3]. Weitere, quantitativ weniger bedeutsame Risikofaktoren sind eine schlechte Mundhygiene oder Strahlenexposition bei der Behandlung von Tumoren der Schilddrüse oder der Speicheldrüsen.

Das Patientenüberleben ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Patienten mit lokal begrenzten Tumoren haben die besten Überlebenschancen. Das Überleben der Patienten sinkt bei Metastasierung sowie Zweittumoren. Nur 10-25% der Patienten mit metastasierten Plattenepithelkarzinomen und maximal 40% der Patienten mit Zweittumoren überleben langfristig.

Wird die Diagnose frühzeitig gestellt, sprechen Patienten gut auf die verschiedenen Therapieoptionen an und können in 70-90% aller Fälle geheilt werden. Das schwerwiegendste Problem bei den Kopf-Hals Tumoren und Tumoren des Respirationstraktes ist allerdings die meist späte Erstdiagnose, wenn der Tumor schon fortgeschritten und eventuell metastasiert ist [4].

In der Therapie des Plattenepithelkarzinoms von Kopf und Hals gab es in den letzten Jahren Fortschritte durch neue chirurgische Operationstechniken, ebenso wie in der Chemo- und Radiotherapie. Trotz dieser Verbesserungen bleiben die Ansprechraten gering, weswegen die Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des oberen Respirationstrakts nach wie vor eine schlechte Überlebensprognose haben [5]. Das 5-Jahres-Überleben verharrt bei etwa 50%.

Das schlechte Therapieansprechen liegt vor allem an der Heterogenität der Tumore. Tumore mit ähnlichem histopathologischen Erscheinungsbild sprechen unterschiedlich auf die gleiche Therapieform an, sodass es schwierig ist, gezielte Therapien für alle Tumore zu finden. Der HPV-Status ist wesentlich für das Therapieansprechen. Patienten mit positivem HPV-Status sprechen besser auf die Therapie mit Cisplatin an, was eine um 67% erhöhte 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit gegenüber Patienten mit HPV-negativen Tumoren bedeutet [4].

Trotz aller Therapiefortschritte bleibt die ursprüngliche Problematik bestehen, nämlich das Fehlen biologischer Marker für die Früherkennung, den Therapieverlauf und die Prognose der Patienten.

1.2 Molekulargenetik von Kopf-Hals Plattenepithelkarzinomen

Nach umfassenden genomischen Untersuchungen sind Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals mittlerweile weitaus besser untersucht als noch vor wenigen Jahren. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass *p53/TP53* das am häufigsten in Kopf-Hals Tumoren mutierte Gen ist. Die Inaktivierung von p53 hat wahrscheinlich mehrere Konsequenzen. Unter anderem ist die Fähigkeit von Zellen beeinträchtigt nach schwerwiegenden Schädigungen des Genoms Apoptose auszulösen, was genomische Instabilität, unkontrolliertes Zell- und somit Tumorwachstum begünstigt. Als wichtigster negativer Regulator von *p53* ist *MDM2* bekannt, welches in Kopf-Hals Tumoren häufig überexprimiert ist. Bei mit HPV infizierten Patienten führt eine Interaktion des E6 Onkoproteins mit p53 zu dessen Inaktivierung, mit vermutlich entsprechenden Konsequenzen.

Wie sich andere molekulare Veränderungen auf die Entstehung und Progression von Tumoren im Kopf-Hals Bereich auswirken, ist weniger gut untersucht, wobei die Forschung der letzten Jahre schon dazu beigetragen hat, die Tumore besser molekulargenetisch zu klassifizieren. Daher ist es notwendig, die beteiligten Mechanismen genauer zu verstehen [2, 6, 7].

Für die Zukunft ist es unabdingbar, neue zelluläre und molekulare Veränderungen daraufhin zu untersuchen, ob und wie sie den Patienten bessere Möglichkeiten zur Therapie, zur Diagnostik und Informationen zum Verlauf ihrer Erkrankung bieten können. Dabei wäre es vor allem wünschenswert, molekulargenetische Veränderungen möglichst frühzeitig detektieren zu können, damit der Tumor schon im Frühstadium erkannt oder zumindest dem Patienten eine individuellere Therapie ermöglicht werden kann, die in einem erhöhten Überleben resultiert. Für diese Zwecke sind möglicherweise lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) geeignet.

Das menschliche Genom umfasst insgesamt 3.400.000 kb. Bis zu 85% davon werden transkribiert, aber nur 2% - was ungefähr 20.000 Genen entspricht - kodiert für Proteine [8]. Der restliche - und wesentlich größere - Anteil der RNA-Transkripte ist nicht kodierend; diese RNAs können anders als mRNAs nicht in ein Protein translatiert werden. Dennoch üben viele dieser nicht-kodierenden RNAs Funktionen in der Zelle und im Organismus aus. Dazu zählen unter anderem, wie schon lange bekannt, das Spleißen, die Durchführung und Regulation der Translation und der Abbau von mRNA. In neuerer Zeit sind jedoch viele weitere nicht-kodierende RNAs identifiziert und charakterisiert worden, deren Funktionen vielfältiger sind. Vor allem in Tumoren werden einigen von ihnen bedeutsame Funktionen zugeschrieben, die näher untersucht werden müssen [9].

Nicht-kodierende RNAs werden anhand ihrer Länge in verschiedene Subgruppen unterteilt; man unterscheidet zwischen kurzen und langen nicht-kodierenden RNAs. Als kurze nicht-kodierende RNAs gelten dabei RNAs mit einer Länge von weniger als 200 Basen. Dazu gehören zum Beispiel die miRNAs mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden, welche die Translation einzelner Gene unterdrücken und somit einen Gegenpart zur mRNA bilden. Ihre Aufgabe im menschlichen Genom ist hauptsächlich die negative Regulation der Translation [10].

Lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) sind RNAs mit einer Länge von mehr als 200 Basen. Es ist bekannt, dass über 1.000 verschiedene lncRNAs im menschlichen Genom vorhanden sind [11]. Die Klasse der lncRNAs bildet somit die größte Anzahl von Transkripten des menschlichen Genoms [11]. Über die Funktion vieler lncRNAs ist bis dato noch nicht viel bekannt. Jedoch weiß man, dass lncRNAs sowohl an der physiologischen Entwicklung von Zellen als auch in malignen Entartungen beteiligt sein können [11]. Nach gegenwärtigem Forschungsstand können lncRNAs Auswirkungen auf alle wesentlichen Eigenschaften von Krebszellen haben, auch im *HNSCC* [12]. Neue Erkenntnisse auf diesem aktuellen Forschungsgebiet kommen fortlaufend hinzu.

Es zeichnet sich ab, dass lncRNAs weitaus vielfältigere Funktionen als miRNAs haben. Dazu zählt unter anderem ihr Einfluss auf das Zellwachstum, Migration und Apoptose, sowie die generelle Beeinflussung des Zellzyklus und der Zellmorphologie. Im Nukleus lokalisierte lncRNAs sind beteiligt an der Regulation der Chromatinaktivität und der RNA-Biosynthese, wohingegen zytoplasmatische lncRNAs auf die Stabilität oder Translation von mRNA und auf Signalkaskaden Einfluss nehmen. Generell lässt sich die Funktion von lncRNAs als Modulatoren der genetischen Expression in Zellen beschreiben [13].

Anfängliche Untersuchungen auf dem Themengebiet der lncRNAs erfolgten mit heutzutage eher selten genutzten Forschungsmethoden der Genomuntersuchung wie zum Beispiel des *cDNA library scanning*. Mittels dieser Untersuchungen konnten die ersten lncRNAs, im Sinne der modernen Definition, identifiziert werden [14]. Dazu gehören zum Beispiel BC200, ein wichtiger Biomarker sowohl bei Alzheimer Demenz als auch in frühen Stadien des Mammakarzinoms [15], sowie MALAT-1 (*Metastasis Lung Adenocarcinoma Transcript 1*), ein Marker für die Hyperproliferation und Metastasierung von Adenokarzinomen der Lunge, welcher im Jahr 2000 erstmalig beschrieben wurde [16].

Die Entdeckung solcher RNAs ermöglichte eine bessere Detektion und Behandlung verschiedener Tumorentitäten [14]. Eine sehr bekannte nicht-kodierende RNA ist das sog. „*prostate cancer antigen 3*“, kurz PCA3. Sie dient als diagnostischer Biomarker in Prostatakarzinomen, da sie in Tumorzellen ca. 100-mal höher exprimiert wird als in benignen Zellen. Nach der ärztlichen Tastuntersuchung der Prostata werden Tumorzellen in den Urin freigesetzt und können mittels des „*Progenssa-Tests*“, der PCA3 misst, detektiert werden [17]. Dieses diagnostische Verfahren kann sowohl vor als auch zwischen einzelnen Prostatabiopsien verwendet werden, um maligne Entartungen der Prostata festzustellen.

LncRNAs üben vielfältige Funktionen in der Pathogenese von Krankheiten aus. Vor allem in Tumoren sind Veränderungen der Expression von lncRNAs beschrieben. Da einige von ihnen wichtige Regulatoren der Genexpression sind, führen Expressionsveränderungen zu vielfältigen Funktionsveränderungen der Zellen, was sich in erhöhter Zellproliferation, Apoptoseresistenz, Angiogenese und Metastasierungstendenz äußern kann [8].

Aus diesem Grunde sind einige lncRNAs bereits sehr gut hinsichtlich ihrer Funktion in normalen Geweben und Tumoren charakterisiert. Dazu zählt unter anderem „*TINCR*“. Das für *TINCR* kodierende Gen liegt auf Chromosom 19 zwischen *SAFB2* und *ZNRF4*. Von diesem Gen wird ein 3,7 kb Transkript produziert, das im Zytoplasma der Zelle zu finden ist. Es übt einen entscheidenden Einfluss auf die epidermale Differenzierung aus. In Datenbankrecherchen und Expressionsmessungen erwies sich *TINCR* – als eine von 258 relevanten nicht-kodierenden RNAs – als diejenige mit der höchsten Induktion während der epidermalen Differenzierung [18].

Hohe *TINCR* Expression in einer geeigneten Zelle ist verbunden mit der Expression einer Vielzahl von Schlüsselproteinen der epidermalen Differenzierung. Dabei reichert sich *TINCR* vor allem in den differenzierten Schichten der Epidermis an. Wird die Expression dieser lncRNA unterdrückt, entwickelt sich die Epidermis zwar normal, allerdings kommt es zu einer reduzierten Expression von Differenzierungsgenen auf Protein- und mRNA-Ebene [18]. Der Verlust von *TINCR* macht sich in der signifikant verminderten Expression 394 essentieller Gene bemerkbar. Dabei interagiert *TINCR* mit den mRNAs von Proteinmediatoren der epidermalen Differenzierung post-transkriptionell mittels 25 Nukleotiden langen sog. „*TINCR boxes*“, welche zwingend für die Interaktion benötigt werden [18].

Als Besonderheit ist die direkte Interaktion von *TINCR* mit dem Staufer Protein (*STAU1*) zu nennen. *STAU1* ist ein wichtiges doppelsträngige RNA bindendes Protein, welches am Transport von mRNA zu zellulären Kompartimenten und damit ihrer Lokalisierung beteiligt ist. Erstmals beschrieben wurde es in *Drosophila*, wo es die RNA-Lokalisierung in Oozyten organisiert [18]. In epidermalen Zellen dient der *TINCR/STAU1*-Komplex zur Stabilisierung wichtiger mRNAs und somit der zelltypspezifischen Proteinbiosynthese [18]. Abschließend lässt sich somit sagen, dass *TINCR* während der epidermalen Differenzierung induziert wird und mittels direkter Interaktion mit *STAU1* diese Differenzierung unterstützt.

Die oben bereits vorgestellten lncRNAs können somit bereits helfen, bestimmte Tumorentitäten besser zu verstehen und den Patienten individuellere Therapiekonzepte zu ermöglichen. Die ebenfalls gut untersuchte lncRNA HOTAIR spielt in vielen Tumorentitäten eine bedeutende Rolle. Sie wird beispielsweise in Harnblasen-, Cervix- oder auch kolorektalen Tumoren sowie Mammakarzinomen verstärkt exprimiert. HOTAIR ist ein nicht kodierendes Transkript mit einer Länge von 2,2 kb und wird vom *HOXC* Locus auf Chromosom 12 transkribiert. Seine Wirkung entfaltet sich auch an anderen Stellen des Genoms in *trans*, u.a. auf posteriore *HOXD* Gene auf Chromosom 2. Dort reprimiert HOTAIR die Transkription.

Mittels des 5'-Bereichs bindet HOTAIR an Chromatin-modifizierende Komplexe welche das Histon H3 am Lysin 27 methylieren; der 3'-Bereich bindet an den Histon H3K4 Demethylase 1 Komplex. Dadurch reguliert HOTAIR die Methylierung von Histon H3K27 und die Demethylierung von H3K4me2 an Genen, die mit der Proliferation, Apoptose und Metastasierung von Tumorzellen zusammenhängen [13]. Im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus beispielsweise interagiert HOTAIR mit *CCND1* über eine reduzierte miR-1 Expression. *CCND1* ist ein Onkogen aus der Familie der D-Typ Zykline; sein Produkt Cyclin D1 fördert den Zellzyklus beim Durchlauf der G1-Phase. Die reduzierte Expression von miR-1 begünstigt die Tumorgenese sowie die Progression des Tumors. Ein Knockdown von Cyclin D1 führt entsprechend zu einer verminderten Proliferation der Tumorzellen verbunden mit einem G1-Arrest im Zellzyklus [19].

Im Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals sind bislang nur vereinzelte lncRNAs untersucht und hinsichtlich ihrer Funktion näher beschrieben worden. Auch hier hat sich HOTAIR in den letzten Jahren als relevante lncRNA erwiesen. Bislang weiß man, dass

HOTAIR in vielen Subtypen des Plattenepithelkarzinoms von Kopf und Hals überexprimiert wird. Eine erhöhte Expression im Larynxkarzinom geht einher mit Lymphknotenmetastasen und geringer Differenzierung des Tumors. Im Mundraum korreliert die erhöhte HOTAIR Expression mit Lymphknotenmetastasen, Tumorgröße sowie dem Tumorstadium der Patienten [13].

Allerdings hat die Forschung zu Kopf-Hals Tumoren in den letzten Jahren auch spezifische lncRNAs zu Tage gebracht, die erstmalig in der Pathogenese der Kopf-Hals Tumore zum Tragen kommen und erst danach in weiteren Entitäten untersucht wurden. Dazu zählt beispielsweise das „*nuclear paraspeckle assembly transcript 1*“, kurz NEAT1, dessen Funktion im Larynxkarzinom näher beleuchtet wurde [16]. Das Larynxkarzinom zählt zu den häufigsten Tumoren im Kopf-Hals-Bereich und die Überlebensrate der Betroffenen mit dieser Diagnose ist nach wie vor besonders schlecht. NEAT1 tritt in zwei verschiedenen Isoformen auf; es gibt ein 3,7 kb großes Transkript NEAT1.1 und das 23 kb große Transkript NEAT1.2. Die Überexpression von NEAT1 ist auch in Leukämien, dem hepatozellulären Karzinom, sowie im Lungenkarzinom beschrieben worden [20]. Mittels Microarray-Analysen wurde festgestellt, dass NEAT1 im Larynxkarzinom signifikant überexprimiert wird [20]. In weiterführenden Untersuchungen mittels qRT-PCR stellte sich heraus, dass die Überexpression von NEAT1 mit der Tumorprogression und Invasion im Larynxkarzinom einhergeht. Um NEAT1 weiter zu charakterisieren wurde in funktionellen Experimenten mittels shRNA ein *Knockdown* durchgeführt, der die Proliferation und Invasion von Zellen des Larynxkarzinoms verminderte und die Zellen in einen G1-Arrest oder Apoptose trieb.

Des Weiteren steht NEAT1 in enger Verbindung zur „*cyclin dependent kinase 6*“ (CDK6). NEAT1 führt zu einer Überexpression von CDK6 durch Inhibierung von miR-107 [20].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Anhand dieser Beispiele - vor allem an TINCR, HOTAIR und NEAT1 - wird deutlich, welche vielfältigen Aufgaben lncRNAs in der Zelle haben können und dass es für ein tiefer gehendes Krankheitsverständnis essentiell ist, nähere Information zu spezifischen Tumoren zu erhalten [18].

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher gewesen, mittels Literatur- und Datenbankrecherche lange nicht-kodierende RNAs zu identifizieren, die in Tumoren von Kopf und Hals verändert exprimiert werden. Diese potentiellen Kandidaten sollten zur weiteren Untersuchung hinsichtlich ihrer Eigenschaften wie Größe und Lage zu benachbarten Genen näher charakterisiert werden, um eine Auswahl für potentielle Biomarker treffen zu können.

Für die so eingegrenzte Kandidatenliste sollten PCR-Primer entworfen werden, um ihre Expression in den zur Verfügung stehenden Gewebeproben zu messen. Im Falle einer veränderten Expression sollte mit Hilfe statistischer Verfahren der Zusammenhang der Expressionsveränderungen mit klinischen Parametern überprüft werden. Zu diesen Parametern zählen vor allem das Patientenüberleben, aber auch die Tumorgöße und der Lymphknotenstatus.

Zur vertieften Charakterisierung sollten funktionelle *in vitro* Untersuchungen zeigen, inwiefern ein systematischer Knockdown überexprimierter lncRNAs Auswirkungen auf die Zelle hat oder was umgekehrt eine Überexpression ausgewählter lncRNAs an Veränderungen der Zelle mit sich bringt.

Anhand dieser Experimente erhoffte man sich, weitere diagnostische und prognostische Marker für das Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals finden zu können. So könnten weitere Untersuchungen erfolgen, die eine bessere Früherkennung und einen verbesserten Krankheitsverlauf mittels individualisierter Therapie ermöglichen.

2 *Material und Methoden*

2.1 *Material*

2.1.1 *Gewebeproben aus Düsseldorf*

Ein Teil der für die Messung der lncRNA-Expression verwendeten Gewebeproben stammt aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Aus den Gewebeproben wurde im Forschungslabor der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde die RNA extrahiert; dafür eingesetzt wurde das „*RNeasy Mini Kit*“ der Firma *Qiagen*. Für die Messungen wurden nur RNA-Proben mit hoher Qualität verwendet. Auswahlkriterium war hierbei ein „*RIN*“ (*RNA integrity number*, Qualitätsmerkmal für RNA) von mindestens 8.

So wurden insgesamt 69 RNAs gewonnen, aus 49 Tumor- und 20 Normalproben. Im Verlauf der Messungen und bei Zusammenstellung der klinischen Daten wurden insgesamt drei Proben von der Auswertung ausgeschlossen, da bei zwei Proben die Referenzgene auffällig abwichen und sich bei einer Probe herausstellte, dass der Tumor neuro-logischen Ursprungs war.

Somit wurden die ausgewählten lncRNAs in 46 Tumor- und 20 Normalproben gemessen. Die Tumorproben bestanden aus 7 Tumoren im Stadium pT1, 13 im Stadium pT2, 6 im Stadium pT3 und 7 im Stadium pT4. Die weiteren klinischen Parameter der Proben und die Grunddaten der Patienten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: klinische Parameter und Patientengrunddaten des Düsseldorfer Probensets

HNO ID	Lokalisation	Tod	OP-Alter	Ge- schlecht	T Sta- dium	N Sta- dium	M Sta- dium	Grad	HPV
HNO ID 11/15	TonsillenCa/ Oropharynx	nein	70	M	2	2c	0	3	pos.
HNO ID12/15	TonsillenCa	nein	73	F	3	2c	0	2	neg.
HNO ID18/15	TonsillenCa, PlattenepithelCa	nein	50	F	2	2b	0	2	neg.
HNO ID19/15	TonsillenCa li	nein	70	M	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	pos.
HNO ID20/15	GaumenCa	nein	63	M	1	0	0	2	neg.
HNO ID22/15	LarynxCa	nein	58	F	4	2c	0	2	neg.
HNO ID26/15	HypopharynxCa	nein	56	F	3	2c	0	unbek.	neg.
HNO ID27/15	LarynxCa	nein	60	M	3	1	0	3	unbek.
HNO ID28/15	TonsillenCa/ Oropharynx; Rezidiv	nein	63	F	3	2c	x	2	pos.
HNO ID29/15	PlattenepithelCa Zungenrand; Re- zidiv	nein	75	M	1	x	0	2	unbek.
HNO ID30/15	LarynxCa	ja	55	M	2	2b	0		pos.
HNO ID33/15	LarynxCa	nein	77	M	2	0	x		neg.
HNO ID35/15	LarynxCa	nein	55	M	3	2c	0	2	unbek.
HNO ID39/15	LarynxCa, PlattenepithelCa Stimm lippe	nein	77	M	2a	1	0	unbek.	neg.

HNO ID42/15	LarynxCa	nein	65	M	2	0	0	Unbek.	unbek.
HNO ID45/15	HPV Papillome Larynx	nein	79	M	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	pos.
HNO ID47/15	Oropharynx-/MundhölenCa; Rezidiv ausgedehnt	nein	61	F	4	0	unbek.	2	neg.
HNO ID49/15	OropharynxCa	nein	64	F	2	0	0	2	neg.
HNO ID60/15	Hartgaumen; Oropharynx-/LarynxCa	ja	26	F	4	3	2	2	neg.
HNO ID62/15	HypopharynxCa	ja	71	M	1	1	0	3	neg.
HNO ID13/13	LarynxCa	ja	80	M	4	0	0	3	unbek.
HNO ID01/14	Hypopharynx/ LarynxCa	nein	61	M	4	0	0	3	neg.
HNO ID09/14	HypopharynxCa	nein	76	F	2	0	0	2	neg.
HNO ID50/12	Oro-, Hypopharynx, Plattenepithelpapillom	nein	48	M	3	0	0	2	pos.
HNO ID 04/13	MundhöhlenCa	n	64	M	4	0	0	2	unbek.
HNO ID08/14	MundbodenCa	ja	53	M	2	2b	0	3	neg.
HNO ID17/14	LarynxCa	nein	76	M	3	0	0	2	pos.
HNO ID29/13	MundhöhlenCa	nein	68	F	1	0	0	2	neg.
HNO ID04/14	MundbodenCa	nein	68	M	1	0	0	2	neg.
HNO ID06/14	MundhöhlenCa	nein	70	M	4	2c	0	2	pos.

HNO ID 28/14	OropharynxCa	nein	73	F	2	2b	0	2	neg.
HNO ID40/14	OropharynxCa	nein	77	M	2	2c	0	2	neg.
HNO ID45/14	ZungenrandCa	nein	80	F	2	1	0	0	neg.
HNO ID46/14	MundbodenCa	nein	53	F	2	0	0	2	neg.
HNO ID21/15	Normalschleimhaut	nein	63	M					
HNO ID23/15	Normalschleimhaut	nein	58	f					
HNO ID40/15	Normalschleimhaut	nein	77	m					
HNO ID44/15	Normalschleimhaut	nein	77	m					
HNO ID46/15	Normalschleimhaut	nein	79	m					
HNO ID48/15	Normalschleimhaut	nein	61	f					
HNO ID55/15	Normalschleimhaut	nein	36	f					
HNO ID58/15	Normalschleimhaut	ja	26	f					
HNO ID64/15	Normalschleimhaut	nein	71	m					
HNO ID02/16	Normalschleimhaut bei Tonsillitis	nein	21	m					
HNO ID03/16	Normalschleimhaut bei Tonsillitis re	nein	22	m					
HNO ID04/16	Normalschleimhaut bei Tonsillitis li	nein	22	m					

HNO ID06/16	Normalschleimhaut bei rez. Tonsil- litis re	nein	19	m					
HNO ID07/16	Normalschleimhaut bei rez. Tonsil- litis li	nein	19	m					

Die vorgenommenen Untersuchungen sind von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt worden (Studennummer 5406 vom 12.02.2016) und von allen Patienten und Patientinnen liegt eine Einverständniserklärung zur Verwendung der Gewebeproben vor.

2.1.2 Gewebeproben aus Bonn

Ein anderer Teil der für die Messung der lncRNA-Expression verwendeten Gewebeproben stammen aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Bonn. Dort wurde aus den jeweiligen Proben die RNA extrahiert und ihre Konzentration gemessen. Die Grunddaten zu den Proben sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Die histopathologischen Daten, einschließlich des HPV-Status, wurden von den Kooperationspartner PD Dr. Dietrich und Dr. Loick ausgewertet. Insgesamt umfasste die Gewebeserie 93 Proben aus Normal- und 75 Proben aus Tumorgeweben. Die Tumorproben bestanden aus 11 Tumoren im Stadium pT1, 33 im Stadium pT2, 24 im Stadium pT3 und 10 im Stadium pT4.

Tabelle 2: Grunddaten und Parameter des Bonner Gewebesets

Probennummer	T/N	Jahr	RNA conc in ng/µl	RIN
1	Tumor	2012	155,23	7,90
2	Normal	2012	254,98	6
3	Normal	2010	245,31	7,40
4	Tumor	2011	750,66	6,30
5	Normal	2012	77,66	8,10
7	Tumor	2012	135,92	9
9	Tumor	2011	260,41	8,10
10	Tumor	2011	614,84	9,10

11	Tumor	2012	104,66	6,10
12	Normal	2012	378,92	9
13	Normal	2011	721,83	9,50
14	Normal	2011	97,3	7,60
15	Normal	2010	20,01	8,70
16	Tumor	2011	454,38	9
17	Tumor	2012	1199	8,40
18	Normal	2011	725,74	5,80
20	Tumor	2012	709,62	9,20
21	Normal	2011	189,53	8,60
22	Tumor	2012	1116,38	8,80
23	Normal	2011	343,78	8,90
24	Normal	2012	401,78	9,90
25	Normal	2012	166,26	9
26	Tumor	2012	793,06	9,40
28	Normal	2011	308,31	9,40
29	Tumor	2011	243,99	7,20
31	Normal	2011	644,55	9,90
32	Normal	2013	239,77	8,40
33	Normal	2013	322,2	9,80

34	Nor- mal	2011	122,77	9,40
35	Nor- mal	2012	541,32	N/A
36	Nor- mal	2012	216,52	N/A
37	Tumor	2011	368,61	8,70
38	Tumor	2011	1606,72	9,60
39	Tumor	2012	855,39	3,50
40	Tumor	2013	1306,02	9,60
41	Nor- mal	2010	1348,43	9,10
42	Nor- mal	2012	131,99	8,30
44	Tumor	2012	524,37	2,40
45	Tumor	2011	553,37	9,20
46	Nor- mal	2011	800,03	8,90
48	Nor- mal	2011	144,86	8,10
49	Tumor	2012	242,08	8
50	Nor- mal	2011	400,37	9,20
51	Tumor	2012	751,09	9,20
52	Tumor	2012	794,06	9,80
53	Nor- mal	2010	48,71	9,20
55	Tumor	2011	757,39	8,70
56	Tumor	2011	1200,37	8,60
57	Tumor	2011	807,29	8,70
58	Tumor	2012	291,53	9,70
59	Nor- mal	2011	131,91	8,50

60	Nor- mal	2013	596,72	8,90
61	Tumor	2012	220,67	4,50
65	Nor- mal	2012	549,13	9,10
66	Nor- mal	2012	747	9,40
67	Tumor	2011	73,14	8,90
68	Nor- mal	2011	296,03	8,30
69	Tumor	2012	81,86	2,60
73	Nor- mal	2011	625,76	9,50
75	Nor- mal	2013	1146,94	9
76	Tumor	2012	713,94	2,50
77	Nor- mal	2012	321,56	8,40
78	Nor- mal	2012	230,76	7,50
79	Tumor	2011	277,27	9,60
80	Nor- mal	2013	206,06	8,40
81	Nor- mal	2013	473,82	9
82	Nor- mal	2011	616,4	9,90
83	Tumor	2011	199,79	9
84	Tumor	2013	415,56	7
86	Nor- mal	2011	173,13	9,30
87	Tumor	2013	379,99	9,20
89	Tumor	2013	863,43	9,60

90	Tumor	2013	796,79	9,60
91	Tumor	2012	619,51	9,40
92	Tumor	2012	67,76	8
93	Tumor	2011	169,76	9
96	Nor- mal	2012	603,42	9
98	Tumor	2012	378,88	2,40
99	Tumor	2010	299,54	9
100	Nor- mal	2015	44,81	8
101	Tumor	2015	94,27	6,30
103	Tumor	2012	111,43	9,40
104	Nor- mal	2012	665,77	3,50
106	Tumor	2011	640,99	8,90
107	Nor- mal	2012	329,98	8,70
109	Tumor	2012	943,6	9,50
110	Nor- mal	2012	284,17	8,90
112	Nor- mal	2013	813,43	8
113	Tumor	2012	356,06	8,90
114	Nor- mal	2015	70,94	7
117	Nor- mal	2015	204,23	8,60
118	Tumor	2015	1377,63	9,50
119	Tumor	2015	420,68	9,10
120	Nor- mal	2015	36,75	7,80
121	Tumor	2011	176,69	9,10
122	Tumor	2015	40,15	6,30

123	Nor- mal	2013	445,13	9
124	Tumor	2013	1090,24	9,30
126	Tumor	2012	371,7	8,50
127	Nor- mal	2012	176,05	9,40
128	Nor- mal	2012	200,19	1,80
131	Tumor	2012	1020,32	9,60
133	Tumor	2012	779,01	9
134	Tumor	2015	451,98	8,20
136	Tumor	2013	1054,7	8,50
137	Tumor	2011	422,37	8,10
139	Nor- mal	2017	290,56	8,80
140	Tumor	2012	778,42	8,10
141	Nor- mal	2016	344,52	8,90
142	Tumor	2011	27,07	6,90
143	Tumor	2017	492,8	8,80
145	Tumor	2012	1285,48	9,20
146	Nor- mal	2015	586,73	N/A
147	Nor- mal	2015	503	N/A
148	Tumor	2013	512,92	8,20
149	Nor- mal	2016	58,97	8,70
150	Tumor	2010	162,08	7,90
151	Tumor	2016	661,2	9,10
152	Tumor	2010	158,08	8,90
153	Tumor	2015	390,38	9,30
154	Tumor	2011	232,3	7,80

155	Tumor	2013	374,09	7,50
156	Tumor	2010	308,07	8,40
157	Nor- mal	2012	266,5	9,10
158	Nor- mal	2016	20,36	7,40
159	Tumor	2017	578,67	N/A
160	Tumor	2013	331,06	N/A
161	Nor- mal	2017	249,92	9,10
162	Tumor	2011	188,04	8,90
163	Tumor	2016	111,35	9,30
165	Tumor	2015	814,46	9,20
167	Tumor	2016	339,36	7,70
168	Tumor	2011	385,55	9,20

Die vorgenommenen Untersuchungen sind von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn genehmigt worden (laufende Nummer 187/16 vom 21.07.2016) und von allen Patienten und Patientinnen liegt eine Einverständniserklärung zur Verwendung der Gewebeproben vor.

2.1.3 Gewebeset der chirurgischen Klinik der Universitätsklinik Düsseldorf

Ein dritter Teil der für die Messung der lncRNA-Expression verwendeten Gewebeproben stammen aus der chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Sie wurde freundlicherweise von Dr. Behrens zur Verfügung gestellt. Aus den gewonnenen Biopsien wurde dort die RNA extrahiert und ihre Konzentration gemessen. Die Unterteilung der Proben wird in Tabelle 3 ersichtlich. Insgesamt standen sieben Proben aus Primärtumoren, 11 Proben aus Filiae und zwei Proben aus Normalgewebe zur Verfügung.

Tabelle 3: Grunddaten und Parameter des chirurgischen Probensets

Probe	Probenort
127	Primarius Alveolarfortsatz UK rechts
127-B	Filia
182	Primärtumor: Alveolarfortsatz/Mundboden/Wange
182-A	negativer LK
182-C	Filia
196	Primarius Zungengrund links
196-B	Filia
276	Primarius
276-A	Filia
277	Primarius Zungenrand rechts
277-C	Filia
277-D	Filia
277-E	negativer LK
278	Primarius Alveolarfortsatz UK li
278-A	Filia
279	Primarius Zungenrand rechts
279-A	Filia
279-B	Filia
279-D	Filia
279-G	Filia

Die vorgenommenen Untersuchungen sind von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt worden (Studiennummer 3090 vom 03.08.2009) und von allen Patienten und Patientinnen liegt eine Einverständniserklärung zur Verwendung der Gewebeproben vor.

2.1.4 Zelllinien

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung ausgewählter lncRNAs mit signifikant veränderter Genexpression in Geweben wurde ihre Expression in Zelllinien gemessen.

Als *in vitro* Modelle für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs stehen dabei insgesamt 20 Zelllinien zur Verfügung (s. Tabelle 4). Sieben der Zelllinien sind von der Arbeitsgruppe des Forschungslabors der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde selbst etabliert worden; die übrigen 13 Zelllinien wurden aus dem Labor von Dr. Reidar Grénman, University of Turku, Finnland, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Zelllinien

HNSCC Zelllinien	HPV-Status	p53 Mutation
UD-SCC1	Negativ	del exon 3
UD-SCC 2	Positiv	Wildtyp
UD-SCC3	Negativ	aa224, GAG→TAT, Glu→Stop
UD-SCC5	Negativ	aa179, CAT→TAT, His→Tyr
UD-SCC6	Negativ	aa220, TAT→TGT, Tyr→Cys
UD-SCC7A	Negativ	aa248, Arg→Leu
UD-SCC8	Negativ	Nicht bekannt
UM-SCC10A	Negativ	aa→TGC, Gly→Cys
UM-SCC 10B	Negativ	aa245,GGC→TGC, Gly→Cys
UM-SCC11B	Negativ	aa 242,TGC→TCC, Cys→Ser
UM-SCC14A	Negativ	aa280,AGA→AGT, Arg→Ser
UM-SCC14B	Negativ	aa280,AGA→AGT, Arg→Ser
UM-SCC17A	Negativ	Wildtyp
UM-SCC17B	Negativ	Wildtyp
UM-SCC47	Positiv	Wildtyp
UM-SCC104	Positiv	Wildtyp
UT-SCC14	Negativ	del exon 8 oder ins intron 8
UT-SCC24A	Negativ	nt 775ins49, ins intron 6
UT-SCC24B	Negativ	nt 775ins49, ins intron 6
UT-SCC24B	Negativ	nt 775ins49, ins intron 6
UT-SCC33	Negativ	aa282,CGG→TGG, Arg→Trp
FaDu	Negativ	nur ein Allel [18]

Die zur Standardkontrolle der RT-PCR mitgeführten Zelllinien stammen aus dem Bestand des Urologischen Forschungslabors und sind in Tabelle 5 näher beschrieben.

Tabelle 5: Zelllinien des urologischen Forschungslabors der Universität Düsseldorf

Zelllinie	Tumorart	P53
RT-112	Urothelkarzinom	Mut
5637	Urothelkarzinom	Mut
253J		Mut
J82	Urothelkarzinom	Mut
T47D	Mamma-CA	Mut
T24	Urothelkarzinom	Mut
UP152	Normales Urothel	WT

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten nicht-transformierten Keratinozyten

Zelllinie	TNM	P53	Besonderheit
HaCaT	-	WT	Normaler Keratinozyt (63j.Mann)
NHEK	-	WT	Epidermale Keratinozyten (juveniler Spender)

2.1.5 Chemikalien

- Agarose Sigma-Aldrich Chemie Steinheim
- Annexin V FITC Konjugat (#31490013X2) Immunotools Jena
- Calciumchlorid Sigma-Aldrich Chemie Steinheim
- Chloroform Merck Darmstadt
- dNTP-Mix Fermentas St. Leon-Rot
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Gibco life technologies Carlsbad, USA
- Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma Aldrich Chemie Steinheim
- Eosin G-Lösung (0,5% wässrig) Nr. 1.09844.1000 Merck Darmstadt
- Ethanol Merck Darmstadt
- Fötale Kälberserum Biowest Nuaille, FR
- Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder Fermentas St. Leon-Rot
- Glycerol Merck Darmstadt
- Hämatoxylin-Lösung nach Gil III Nr.1.05174.1000 Merck Darmstadt
- HEPES Roth Karlsruhe
- Keratinocyte Serum Free Medium (KSFM) Gibco Life Technologies Carlsbad, USA
- Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent Invitrogen Karlsruhe
- Methanol Merck Darmstadt
- Opti-MEM Gibco life technologies Carlsbad, USA
- PBS-Lösung Sigma Aldrich Chemie Steinheim
- SYBR-Green Mix Qiagen Hilden
- 50 x TAE-Puffer S-Prime Hamburg
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide Sigma Aldrich Chemie Steinheim

- QIAzol Lysis Reagent Qiagen Hilden
- Xylol-Ersatz Roth Karlsruhe
(Roti-Histol) Nr. 6640
- 0,25% Trypsin-EDTA Gibco Life Technologies Carlsbad, USA

2.1.6 *Enzyme*

- HotStart Taq-DNA-Polymerase Qiagen Hilden
- T4 DNA Ligase Thermo Scientific Waltham, USA
- Q5® High-Fidelity DNA Polymerase NEB Ipswich, UK
- Restriktionsenzyme NEB Ipswich, UK
 - Not1
 - EcoR1
 - Pst1
 - Nco1
 - Kpn1-HF
 - EcoR5-HF

2.1.7 *Medien, Puffer und Lösungen*

- Ampicillin 100 mg/ml
- Annexin V Binding Buffer 10 mM HEPES
150 mM NaCl
5 mM KCL
5 Mm MgCl₂
1,6 mM CaCl₂
- Ethidiumbromid-Lösung 0,5 mg/ml Ethidiumbromid
- LB-Medium 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 5 g/l NaCl
- Nicoletti-Puffer 0,1 % Triton-X100
0,1% Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat (Na₃C₆H₅O₇)
- Propidium-Iodid-Stock 2 mg/ ml
50 µg/ ml Propidiumiodid, in H₂O

- Coulter Allegra 212 Beckmann Krefeld
- Concentrator 5301 Eppendorf Hamburg
- Curix 60, Filmentwickler AGFA Köln
- Drucker Mitsubishi Barcelona, ESP
- Durchflusszytometriegerät Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach
- Elektrophoresekammer Biometra Göttingen
- ELISA Easy Reader SLT-Labinstruments Salzburg, AT
- Feinwaage 440-33 Kern Balingen
- Gefriertruhe REVCO by ThermoFisher Oberhausen
- Gel-Dokumentationsanlage INTAS Göttingen
- 2 Well ibidi Platte ibidi Gräfelfing
- Light Cycler 96 Roche Basel, CH
- MS2 Minishaker IKA IKA Labortechniken Staufen
- Mikrowelle Küppersbusch
- Mikroskope Nikon Düsseldorf
 - ECLIPSE TE200-S
 - ECLIPSE Ts2
- Mini-Zentrifuge 5415D Eppendorf Hamburg
- Multipipette Eppendorf Hamburg
- Nanodrop ND-1000 NanoDrop Technologies Wilmington, USA
- Pipetus Hirschmann Laborgeräte Eberstadt
- Spannungsquelle Biometra Göttingen
- EASY-CAST Owl Scientific Inc. by Oberhausen
- Gelelektrophoreseapparatur ThermoFisher
- Thermomixer Eppendorf Hamburg
- Thermocycler T3 Biometra Göttingen
- TRIO Thermoblock Biometra Göttingen
- UV-Tisch Intas Göttingen
- Wasserbad 1083 GFL Burgwedel
- Zellkulturwerkbank BSB4A Gelaire Meckenheim
- Zentrifugen Beckman Coulter Krefeld
 - Avanti™30/Allegra X-30R

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

- Bakterialschalen Greiner Frickenhausen
- Combitips Eppendorf Hamburg
- Pipettenspitzen Starlab Hamburg
- Pipettenspitzen gestopft Starlab Hamburg
- Hyperfilm ECL Amersham Pharmacia Freiburg
- Light Cycler Abdichtungs- Roche Basel, CH
folie
- Light Cycler 96-Well- Roche Basel, CH
Platte
- 50ml Röhrchen Greiner Frickenhausen
- 15ml Röhrchen Greiner Frickenhausen
- 6-Well-Platte Sarstedt Nümbrecht
- 96-Well-Platte Sarstedt Nümbrecht
- Stripetten Corning New York, USA
- Verschlussfolie „M“ Parafilm by Bemis Neenah, USA
- Whatman Filterpapier Whatman Maidstone, UK
- Zellkulturflaschen 75 cm² Greiner Frickenhausen
- Zellkulturflaschen 25 cm² Greiner Frickenhausen

2.1.11 Oligonukleotidprimer

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Primer und PCR-Assays

Nr.	Gen	Primername	Sequenz 5'-3'	Tm °C	Produktgröße
1	linc01296	linc01296-qRT-F1	AGCTCACTGCAAGCTCTGC	58.8	142 bp
2	linc01296	linc01296-qRT-R1	CTTTAGACCCATTCTCGTATGG	58.4	
3	NKX-2-1-AS1	NKX-2-1-AS1_qRT_F	AAGTCAGACCCAAGCACTAC	57.3	152 bp
4	NKX-2-1-AS1	NKX-2-1-AS1_qRT_R	GCCCATTATTGAGGATCC	53.7	
5	linc01322	linc01322-qRT-F1	ATAAGGGGTTTCACCTTGT	52.4	110 bp
6	linc01322	linc01322-qRT-R1	GGCATGGTAGCTCATGTT	53.7	
7	HOX-A-AS4	HOX-A-AS4_qRT_F1	GAAGACAGGGAAAAGAAGG	54.5	95 bp
8	HOX-A-AS4	HOX-A-AS4_qRT_F1	CTTTCCCCTTCCACCAC	55.2	
9	linc01296	linc01296-qRT-F2	AGCTTCCACACTCAGAGTCAC	59.8	125 bp
10	linc01296	linc01296-qRT-R2	GTGACAGTGAAGTGCTGAGAG	59.8	
11	CASC9	qRT_CASC9_F1	TTATGTTTGGCTGGAGAGT	52.4	121 bp
12	CASC9	qRT_CASC9_R1	TTGCTTTGCTGCTGTCTG	53.7	
13	HOXC13-AS	qRT_HOXC13AS_F1	GGAGAAGGTGGTGTTTGAC	56.7	127 bp
14	HOXC13AS	qRT_HOXC13AS_R1	CTACAACCTTCGGCTGGTC	56	

15	SNHG6	qRT_SNHG6_F1	GAAGAAGCGCGAAGAGCCG	61	121 bp
16	SNHG6	qRT_SNHG6_R1	GATGACTTTCATACACCTTCACCTC	61.3	
17	linc01615	qRT_linc01615_F1	CTCTGGTACACGCATTGCTC	59.4	159 bp
18	linc01615	qRT_linc01615_R1	GTTCGTAGCAGACGTTATCTTC	58.4	
19	NKX-2-1-AS1	NKX-2-1-AS1_qRT_F1	ATGAGGAACAGCGCCTCT	56	148 bp
20	NKX-2-1-AS1	NKX-2-1-AS1_qRT_R1	TGTTCTTGCTCACGTCCC	56	
21	HOXC13-AS	qRT_HOXC13AS_F	CACCACCGACACGTCCAG	60.5	103 bp
22	HOXC13-AS	qRT_HOXC13AS_R	GGTGCAGTAGGTCTGGCTGAG	63.7	
23	TINCR	TINCR QRT fwd	GAGGCAGAGCCATGACCA	58.2	84 bp
24	TINCR	TINCR QRT rev	GGAGAAGTGCCTTCCAAAAGTG	60.3	
25	HOTAIR	Hotair QRT fwd	GGTAGAAAAAGCAACCACGAAGC	63.4	170 bp
26	HOTAIR	Hotair QRT rev	ACATAAACCTCTGTCTGTGAGTGCC	63	
27	HOXB-AS3	QRT fwd	AGCGCCTCATCGCTCTTATC	59.4	155 bp
28	HOXB-AS3	QRT rev	TGCCAGCTCCTTGGTTGG	58.2	
29	GAPDH	GAPDH QRT fwd	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	57.3	226 bp
30	GAPDH	GAPDH QRT rev	GAAGATGGTGATGGGATTC	55.9	
31	SDHA	SDHA QRT fwd	GCCAGGACCTAGAGTTTGTTC	60,7	115 bp
32	SDHA	SDHA QRT rev	CTTTCGCCTTGACTGTTAATGA	59,4	

33	p63 ΔN	p63 deltaN echt f	TACCTGGAAAACAATGCCCAGACT	56,4	94 bp
34	p63 ΔN	p63 deltaN echt r	AGCCGTTCTGAATCTGCTGGTC	58,6	
35	p63 TA	p63 TA QPCR F1	AAACCCCAGCTCATTTCTCTT	55.9	147 bp
36	p63TA	p63 TA QPCR R1	CAATGGGCTGAACTGAACATA	55.9	
37	LINC01116	qRT_LINC01116_F1	AGCAGCTCCCACCAAAGT	56	83 bp
38	LINC01116	qRT_LINC01116_R1	CGAACAGGCAGATTTTCAC	54.5	
39	TBP	qRT_TBP_F1	ACAACAGCCTGCCACCTTA	56,7	120 bp
40	TBP	qRT_TBP_R1	GAATAGGCTGTGGGGTCAGT	59.4	

2.1.12 *shRNA gegen CASC9*

Die verwendete shRNA gegen CASC9 und die Negativkontrolle stammen von der Firma *Dharmacon* und werden in der folgenden Tabelle 8 näher beschrieben:

Tabelle 8: shRNA und Negativkontrolle gegen CASC9

Gen	Produktname	Produktnummer
shCASC9	shRNA construct CASC9	#V3SH11246
Negativkontrolle shRNA	shRNA construct control	#VSC11709

2.2 Software

2.2.1 *Programme*

- Endnote
- Microsoft Word
- Microsoft Excel
- SPSS Inc. PSAW Statistics 18+25
- pROC-package für R
- PyroMark Assay Design 2.0

2.2.2 *Datenbanken*

- <https://www.lgstandards-atcc.org/>
- <http://www.ensembl.org>
- <https://genome.ucsc.edu/>
- <http://www.lncipedia.org/>
- <https://www.tanric.org>
- <https://portal.gdc.cancer.gov>

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkultur

2.3.1.1 Anzucht von Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten HNSCC-Tumorzelllinien UM-SCC-10A, UM-SCC-10B, UM-SCC-14A und UM-SCC-17A wurden mit DMEM mit 10% hitze-inaktiviertem FCS bei 37°C und 5% CO₂ in H₂O-gesättigter Atmosphäre in Kultur gehalten. Die Routinekultur erfolgte in T25 Zellkulturflaschen.

2.3.1.2 Kultivierung von humanen Keratinozyten

Als benigne Kontrolle für die Plattenepithelkarzinom-Zelllinien aus dem Kopf-Hals-Bereich wurden normale humane epidermale Keratinozyten aus der Haut über die Fa. Lonza bezogen. Die Zellen wurden entsprechend der Herstellerangaben in KBM-Gold Basal Medium supplementiert mit KGM-Gold SingleQuots (Transferrin, Insulin, GA-1000, BPE, rhEGF, Hydrocortison und Epinephrin) kultiviert. Zum Auftauen wurden die Zellen in dem supplementierten Medium suspendiert, jedoch nicht zentrifugiert. Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert. Zum Passagieren wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 10 µM HEPES in PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Sobald die Zellen unter dem Mikroskop abgerundet erschienen, wurden sie abgeklopft und in Trypsin-Inhibitor aufgenommen. Die Zellen wurden in ein 15-ml Greiner-Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen erneut mit HEPES/PBS gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 - 1:4 in neue Zellkulturflaschen überführt. Dazu wird frisches Medium zuvor bereits für 15 Minuten in der Zellkulturflasche bei 37°C inkubiert.

2.3.1.3 Kultivierung von HaCaT

Die spontan immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie HaCaT wurde von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Boukamp aus dem Leibniz Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden ebenso wie die Karzinom-

Zelllinien wie unter 2.3.1.1 beschrieben kultiviert, jedoch erst bei Erreichen von vollständiger Konfluenz im Verhältnis 1:10 - 1:20 einmal die Woche passagiert.

2.3.1.4 Passagieren der Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml Trypsin im Brutschrank inkubiert. Nach wenigen Minuten wurde die enzymatische Reaktion des Trypsins durch Zugabe von 4 ml Medium gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden im Standard-Medium resuspendiert und im gewünschten Volumen in eine neue T25 Zellkulturflasche oder - für Experimente - in eine 6-Well Platte ausgesät.

2.3.2 RNA-Extraktion mittels Trizol

Die RNA aus Zellkulturen wurde mittels Trizol-Extraktion gewonnen. Dabei wurden die Zellen mittels Guanidiniumthiocyanat und Phenol lysiert und gleichzeitig RNasen und andere Enzyme inaktiviert.

Im ersten Schritt wurden dazu die Zellen mit PBS gewaschen und dann unter dem Abzug mit 1 ml/T25 Kulturflasche Trizol lysiert. Zur anschließenden Phasentrennung wurde 200 µl Chloroform pro ml Lysat hinzugegeben, gemischt und bei 12000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend waren 3 Phasen zu erkennen. Die untere, organische Phase enthielt im Wesentlichen Proteine und Lipide. Die mittlere, feste Phase enthielt die DNA der lysierten Zellen mit weiteren Proteinen, und in der oberen, wässrigen Phase war die RNA enthalten. Diese wurde nachfolgend vorsichtig entnommen, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge Ethanol gemischt.

Für die weiteren Schritte wurde das RNA-Isolationskit „*RNeasy Mini Kit*“ der Firma *Qiagen* verwendet.

Dabei wurden 700 µl des Ethanolgemisches auf eine Säule aufgetragen und für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde verworfen. Nun folgte ein zweifacher Waschschrift. Nach Zugabe von 700 µl eines salz- und ethanolhaltigen Puffers („RW1“) wurde die Membran der Säule durch 15-sekündiges Zentrifugieren bei 8000 g gewaschen. Dabei wurden störende Bestandteile wie Kohlenhydrate oder Fette effizient herausgewaschen. Im nächsten Waschschrift wurde ein „milder“ Waschpuffer zur Entfernung sämtlicher Salz- und Ethanolreste verwendet („RPE“).

Von diesem Puffer wurden 500 µl auf die Säule aufgetragen und es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 Sekunden bei 8000 g. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Nach den Waschschritten wurde die Säule für zwei Minuten bei 13000 rpm trocken zentrifugiert, bevor die RNA im letzten Schritt in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert wurde.

Da die Qualität der RNA erheblichen Einfluss auf die nachfolgenden Realtime PCR-Messungen hat, wurde im nächsten Schritt die Qualität der RNA überprüft. Dies geschah mittels photometrischer Bestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Die Absorption der RNA wurde jeweils bei 260 nm und 280 nm gemessen, worauf der Quotient beider Messungen gebildet werden konnte. Für den weiteren Gebrauch der Proben wurde darauf geachtet, dass der A260/280 Quotient stets zwischen 1,8 und 2 lag, da außerhalb dieses Bereiches die Nukleinsäuren nicht mehr als „rein“ zu betrachten sind. Der „RIN“-Wert von RNAs stellt ein Maß für ihre Reinheit dar. Er wird mittels Gelelektrophorese bestimmt. Dazu wird das Agarosegel mit Ethidiumbromid versetzt und es entsteht ein spezifisches Bandenmuster der RNA. Das typische Bandenmuster zeichnet sich durch zwei starke Streifen aus: der 28S und der 18S rRNA. Mittels des Gels kann das Verhältnis von 28S:18S rRNA bestimmt werden. Dieses Verhältnis wird als „RIN“-Wert bezeichnet und liegt bei qualitativ hochwertigen RNAs über 2 [21].

2.3.3 Reverse Transkription

Aus der gewonnenen RNA wurde mittels reverser Transkriptase cDNA (complementary DNA) hergestellt. Dazu wurde die „*Quantiscript Reverse Transcriptase*“ mit dem „*QuantiTect Reverse Transcription Kit*“ der Firma *Qiagen* mit einem zusätzlichen Schritt zur Entfernung restlicher genomischer DNA verwendet. Pro Ansatz wurde 1 µg RNA aus Geweben oder Zelllinien mit sterilem, RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl gebracht. Ein Mastermix für die folgenden Schritte wurde nach dem Schema in Tabelle 9 angesetzt. Der RT-Primer Mix ist dabei eine Mischung aus einem sog. „Random-Primer“ sowie Oligo-dT-Primern, der eine cDNA Synthese von allen Abschnitten der RNA ausgehend ermöglicht.

Tabelle 9: Reaktionsansatz des Mastermix der Reversen Transkription

Komponente	Volumen/Reaktion
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 μ l
Quantiscript RT-Buffer, 5x	4 μ l
RT-Primer Mix	1 μ l

Nach Herstellung des Mastermix wurden 2 μ l gDNA Wipeout Buffer (7x) zur verdünnten RNA gegeben, um die genomische DNA aus der Reaktion zu entfernen. Im Anschluss wurde die Probe für zwei Minuten bei 42°C inkubiert. Nach Zusatz von jeweils 6 μ l Mastermix folgte eine dreißigminütige Inkubation bei ebenfalls 42°C. Direkt danach wurde die DNase drei Minuten bei 95°C inaktiviert und die Reaktionsmischung auf 4°C abgekühlt.

2.3.4 Quantitative Realtime-PCR

Zur Messung der ausgewählten lncRNAs in den Gewebeproben wurde die Quantitative Realtime-PCR verwendet. Diese Methode beruht auf der Quantifizierung der Menge des Produktes nach jedem durchlaufenen Zyklus, in diesem Falle mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffes *SYBR Green*. Dieser interkaliert in die Doppelstranghelix der DNA. Durch diese Einlagerung wird seine Fluoreszenz (Absorptionsmaximum 494 nm, Emissionsmaximum 521 nm) stark erhöht und die Menge des gebildeten Produkts kann so über die Zeit verfolgt werden. In der Regel ergibt sich für den Verlauf der Fluoreszenz eine sigmoidale Kurve, deren exponentielle Phase in Abhängigkeit von der Ausgangsmenge der untersuchten cDNA-Sequenz früher beginnt.

Zur Quantifizierung unbekannter Proben wurde eine Referenzprobe benötigt, die als Standardkurve mitgeführt wurde. Dazu wurde zunächst für jedes Gen eine passende Zelllinie ausgesucht, die eine starke Genexpression für das entsprechende Gen aufwies. Von deren cDNA wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt (im Allgemeinen 1:10, 1:100, 1:1000) und im gleichen Lauf mitgeführt. Die zu messenden Expressionswerte wurden aus dem Vergleich mit der Standardkurve berechnet. Des Weiteren konnte aus der Standardkurve durch logarithmische Auftragung die Effizienz der PCR bestimmt werden. Eine weitere Qualitätskontrolle erfolgte durch Erstellung einer Schmelzkurve der Amplifikate nach abgeschlossener Reaktion. Diese Schmelzkurve sollte aus einem ein-

zigen Peak ohne störende Hintergrundsignale bestehen und bei allen Proben bei der gleichen Temperatur liegen. Falls mehr als ein Peak vorliegt oder die Peaks sich in ihrem Aussehen oder ihrer Lage voneinander unterscheiden, liegt womöglich eine Verunreinigung des Produkts oder eine falsche Anlagerungstemperatur vor, so dass beispielsweise Primerdimere entstanden sind. Als Kontaminationskontrolle für die verwendeten Reagenzien wurde in jedem Lauf eine Probe mit reinem Wasser anstelle von cDNA mitgeführt.

Um Unterschiede in der Qualität oder Menge der eingesetzten RNA und der Effizienz der RT-Reaktion auszugleichen, wurde weiterhin für jede Probe die Expression von Referenzgenen gemessen, von denen angenommen wird, dass sie in den verschiedenen Proben gleich exprimiert sind. Hierzu wurden Gene verwendet, die in nahezu allen Geweben annähernd gleich stark exprimiert sind und als „*Housekeeping Gene*“ bezeichnet werden. Für die Messung der Proben aus *HNSCC*-Geweben und -Zelllinien wurden dazu die Gene *SDHA* und *GAPDH* verwendet.

Für die Messungen wurde der Light-Cycler der Firma Roche verwendet mit dem „*QuantiTect SYBR[®] Green PCR Kit*“ (Firma *Qiagen*). Dieses Kit enthält neben *SYBR Green* - zur Verfolgung der Reaktion - und Desoxynukleotidtriphosphaten noch die Hot-StarTaq DNA Polymerase, welche erst zu Beginn der Messung 15 min bei 95°C aktiviert wird, um die Entstehung unspezifischer Produkte zu verhindern.

Die eigentliche PCR-Reaktion unterscheidet sich im Prinzip nicht von der bei einer qualitativen PCR und besteht somit aus Denaturierung der cDNA, Annealing der Primer und DNA-Replikation. Auf die initiale Denaturierung der cDNA während der 15-minütigen Präinkubation zur Abspaltung der Schutzgruppen der Taq-Polymerase folgt eine dreisrittige Amplifikationsphase, die insgesamt 50 Sekunden dauert und zyklisch 40 Mal hintereinander abläuft. Das gebildete Produkt durchläuft im vorletzten Schritt eine Schmelzphase, bevor es für 30 Sekunden bei 37°C abkühlen kann.

Der Reaktionsansatz für den Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 10: Reaktionsansatz für den Mastermix:

Komponente	Volumen/Ansatz
2x SYBR Green	10 µl
Primer forward [100pmol/µl]	0,1 µl
Primer reverse [100pmol/µl]	0,1 µl
H₂O	8,8 µl

Der Mastermix wurde mittels Multistep-Pipette in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Proben zur Standardmitführung wurden jeweils dreifach mit 1 µl pro Well pipettiert. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe. Die verdünnten Proben wurden jeweils doppelt pipettiert.

Die einzelnen Schritte der Realtime- PCR können in Tabelle 11 nachvollzogen werden.

Tabelle 11: Beispiel für ein Temperaturprogramm am LightCycler

SDHA	
Denaturierung <i>1 Zyklus</i>	95°C / 10 min
Amplifikation <i>45 Zyklen</i>	
Denaturierung	95°C / 15 sec
Primer-Anlagerung	64°C / 15 sec
Primer-Verlängerung	72°C / 20 sec
Schmelzkurve <i>1 Zyklus</i>	
Denaturierung	95°C / 0 sec
Primer-Anlagerung	74°C / 20 sec
Schmelzen	95°C / 0 sec
Kühlung <i>1 Zyklus</i>	37°C / 30 sec

Normalisierungsfaktor:

Zu Beginn der Messungen wurden in allen Gewebeproben die Gene *SDHA* und *GAPDH* gemessen. Zur weiteren Auswertung wurde das geometrische Mittel aus *SDHA* und *GAPDH* als Normalisierungsfaktor bestimmt, auf das die in den Gewebeproben gemessenen Konzentrationen der jeweiligen lncRNAs bezogen wurden.

2.3.4.1 Auswertung der PCR-Messungen

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels SPSS in Form von Boxplot-Diagrammen. Dazu wurde der Quotient der gemessenen lncRNA Konzentrationen und des Normalisierungsfaktors gebildet.

2.3.5 Gelelektrophoretische Methoden

2.3.5.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird hauptsächlich zur Bestimmung der Produktgrößen einer DNA-Probe aus PCR-Reaktionen sowie nach Plasmidverdau bei Klonierungen verwendet.

Hierzu wurde ein 1-2%iges Agarosegel hergestellt, indem das Agarosepulver mit einfachem TAE-Puffer aufgekocht wurde. Der Gelschlitten wurde so im Gießstand montiert, dass die Öffnungen verschlossen werden und kein Gel austreten konnte. Anschließend wurde das noch flüssige Agarosegel vorsichtig in den Gelschlitten gegossen und eventuell entstandene Luftblasen wurden entfernt. An der äußeren Aussparung des Gelschlittens wurde ein Kamm eingesetzt, der nach Trocknung des Gels Platz für die zu untersuchenden DNA-Proben bot. Daraufhin kühlte das Gel ca. 30 min ab und gelierte dabei.

Vor Auftragung der Proben wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt und mit einfachem TAE-Puffer übergossen. Den Proben wurde im Verhältnis 1:6 sechsfacher Blaumarker zugesetzt, um ihre Dichte zu erhöhen und die Lauffront auf dem Gel sichtbar

zu machen. Zur Charakterisierung der Fragmentgrößen der Proben wurde parallel eine Probe des „Gene-Ruler 100 bp DNA-Ladder“ als Längenstandard aufgetragen. Dieser wurde ebenfalls mit dem Blaumarker versetzt. Die endgültige Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte anschließend bei einer Spannung von 5V/cm Gel.

Im Anschluss wurden die Nukleinsäuren mittels Ethidiumbromid nachgewiesen. Während eines fünf- bis zehnminütigen Ethidiumbromidbads interkalierte der fluoreszierende Farbstoff in die DNA, sodass anschließend die Größe der DNA-Fragmente auf einem UV-Tisch bei einer Wellenlänge von 302 nm bestimmt und mittels Digitalkamera dokumentiert werden konnte.

2.4 Funktionelle Experimente

2.4.1 Klonierung von pMF11bdEGNwo aus pMF11bdEGwo und PUC

Als Ursprungsvektor der Klonierung diente der Vektor pMF11bgEGwo (s. Abb. 2). Im ersten Schritt wurde ein Neomycin-Resistenzgen zu diesem vorhandenen Vektor hinzugefügt. Die benötigte für Neomycin kodierende Sequenz stammte dabei aus dem Vektor puc2F11EGwo (s. Abb.1).

Zu Anfang wurden beide Vektoren mittels Restriktionsverdau verdaut und anschließend auf ein 1%iges Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese weiter behandelt. Nun wurde die Bande mit dem Neomycin-Resistenzgen aus dem Gel mittels des „NEB Monarch Kits“ herausgeschnitten.

Im nächsten Schritt wurden die verdauten DNA-Fragmente mit Hilfe des „Zymo Clean & Concentrator Kits“ aufgereinigt.

Danach erfolgte die Ligation von verdautem pMF11bdEGWo mit dem aufgereinigtem Neomycin-Resistenzgen-Abschnitt im molaren Verhältnis 1:3. Entsprechend wurden 50 ng Vektor und 13,3 ng Insert verwendet und zusammen mit 2 µl 10x-Ligase Puffer und 0,2 µl Ligase („Fermentas T4 DNA Ligase 200U“) für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Folgenden erfolgte die Transformation in XL2-Blue E. coli. Dazu wurden 25 µl Bakterien mit 0,5µl β-Mercaptoethanol für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde 1 µl des Ligationsansatzes zu den Bakterien gegeben und für weitere zehn Minuten auf Eis inkubiert. Der nächste Schritt war ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42°C und die sofortige Kühlung auf Eis. Das Gemisch wurde mit 500 µl SOC-

Medium versetzt und eine Stunde bei 37°C und 250 rpm vermengt. Auf einer vorbereiteten, mit 50 µg/ml Ampicillin versetzten, Agarplatte wurden 100 µl der Lösung ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach ca. 16 h erfolgte das Picken der entstanden Kolonien und das Ansetzen von Mini-kulturen. Dazu wurden die einzelnen Kolonien mit 2 ml LB- Medium versetzt und wieder bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Kulturen für die Minipreps mit Hilfe des „ZR Plasmid Miniprep Kit-Classical“ aufbereitet und die DNA Konzentration in den Proben bestimmt. Zwecks Validierung der Klonierung erfolgte ein Kontrollverdau mit Pst1 und Nco1, die im Zielvektor schneiden sollen. Der Verdauansatz bestand aus 1 µg DNA, die mit jeweils 2 µl 10x Puffer sowie 1 µl Nco1 (*Fermentas* 10 U/µl) und 1 µl Pst1 (*Fermentas* 10 U/µl) versetzt und auf 20 µl mit Wasser verdünnt wurden. Mittels Gelelektrophorese konnte nun im nächsten Schritt festgestellt werden, ob die Klonierung erfolgreich war, und der entstandene Vektor (s. Abb. 3) für weitere Untersuchungen verwendet werden konnte. Nun wurde aus dem vorhandenen Rest des Miniprep Ansatzes ein großer Ansatz hergestellt und mit Hilfe des „Plasmid Maxi Kit“ von *Qiagen* aufbereitet.

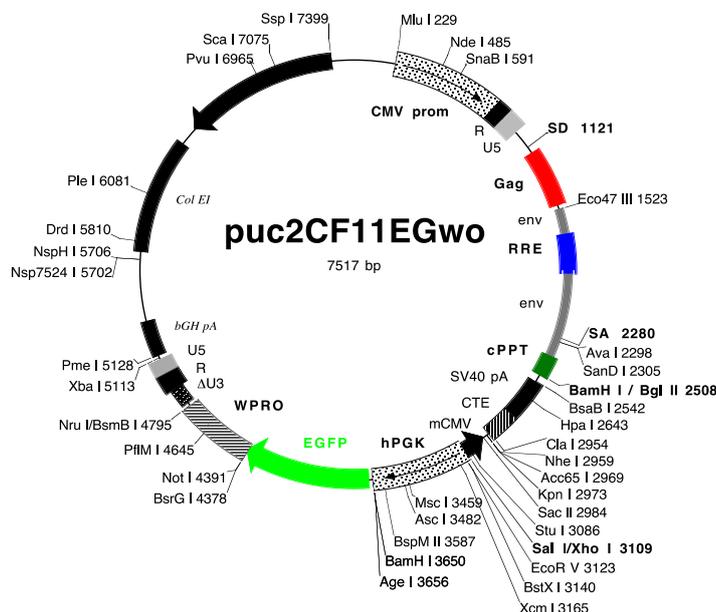


Abb. 1: puc2F11EGwo Vektor: Der Vektor puc2F11EGwo dient als Donor der für ein Neomycin-Resistenzgen kodierenden Sequenz für die Klonierung.

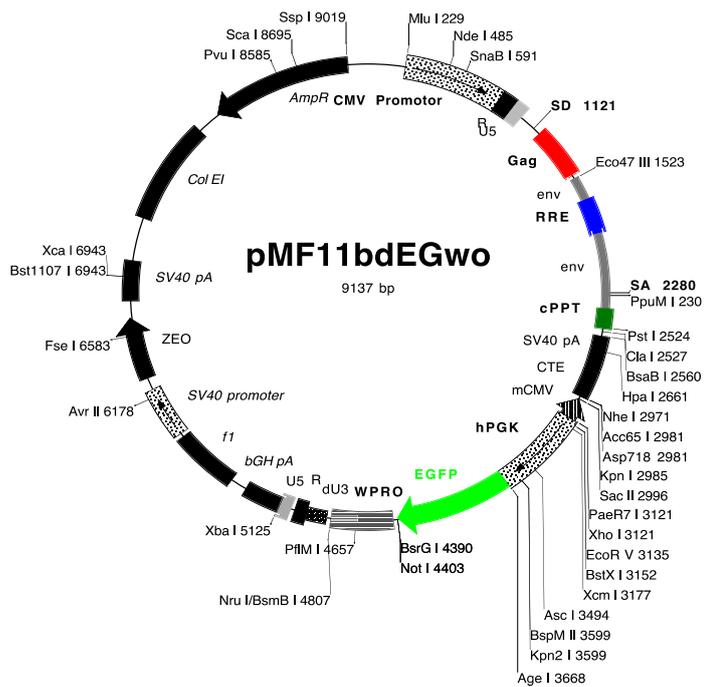


Abb. 2: Ausgangsvektor pMF11bdEGwo: Der Vektor pMF11bdEGwo dient als Empfängervektor der für Neomycin kodierenden Sequenz.

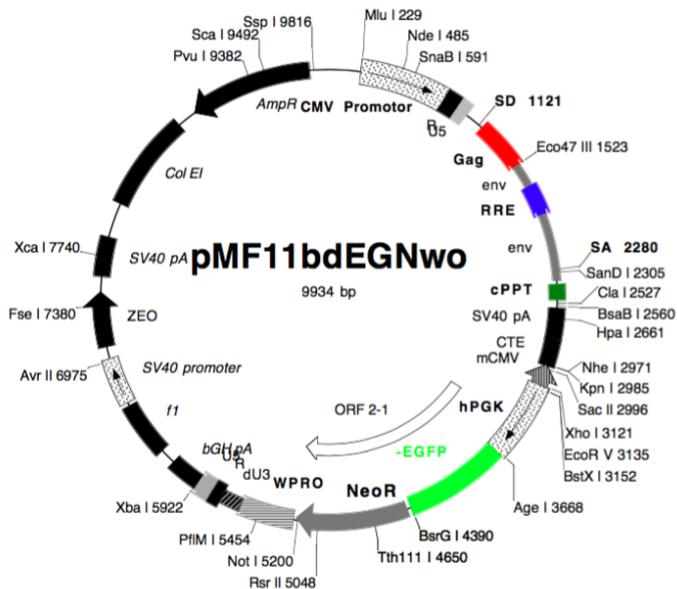


Abb. 3: Zielvektor pMF11bdEGNwo: Der Zielvektor pMF11bdEGNwo beinhaltet ein Neomycin-Resistenzgen aus dem Vektor puc2F11EGwo im Vektor pMF11bdEGwo.

2.4.2 Klonierung von pMF11bdEGNwo mit CASC9

2.4.2.1 Amplifikation von CASC9clone mittels long-range PCR

Zur Klonierung von CASC9 in den bereits modifizierten Vektor pMF11bdEGNwo musste CASC9 mittels „long range“ PCR mit dem „LongRange PCR Kit“ der Firma Qiagen amplifiziert werden. Das entstandene Produkt CASC9clone konnte dann für die weiteren Versuche verwendet werden. Der PCR Ansatz kann aus Tabelle 12 nachvollzogen werden.

Tabelle 12: PCR Ansatz zur Amplifikation von CASC9 mittels long range PCR

Eingesetzte Menge ad 50 µl H ₂ O	Substanz
10 µl	10x „LongRange PCR Buffer“
3 µl	MgCl ₂ (25mM)
0,25 µl	Forward Primer CASC9clone [100 pmol/µl]
0,25 µl	Reverse Primer CASC9clone [100pmol/µl]
1 µl	dNTP-Mischung(10mM jeweils)
1 µl	cDNA/H ₂ O
0,5 µl	5x „Q-Solution“ (bei GC reichen Regionen oder komplexen Strukturen)
0,4 µl	„HotStar Taq Polymerase“ (1000U)

Der Ansatz wurde nach folgendem Temperaturschema behandelt:

Tabelle 13: Temperaturschema der *long range* PCR

Denaturierung <i>1 Zyklus</i>	
	98°C / 180 sec
Amplifikation <i>35 Zyklen</i>	
Denaturierung	93°C / 15 sec
Primer-Anlagerung	62°C / 30 sec
Primer-Verlängerung	68°C/60 sec/kb
Kühlung <i>1 Zyklus</i>	
	4°C / unendlich

Das entstandene PCR-Produkt wurde auf ein Gel aufgetragen und mittels Ethidiumbromid angefärbt und die Banden so unter der UV-Lampe sichtbar gemacht. Danach wurde es aus dem Gel herausgeschnitten, die DNA mittels des „*Monarch DNA Gel Extraction Kits*“ extrahiert und ihre Konzentration gemessen.

2.4.2.2 Vektorverdau von *pMF11bdEGNWo* und *CASC9clone*

Im nächsten Schritt mussten sowohl Vektor, als auch das extrahierte DNA-Fragment mit der lncRNA für die weiteren Schritte vorbereitet werden. Dazu wurde der Vektor mittels Vektorverdau geöffnet, um die lncRNA in den nachfolgenden Schritten einzufügen.

Tabelle 14: Enzymatischer Vektorverdau von *pMF11bdEGNWo*

Eingesetzte Menge ad 20 µl H₂O	
1 µl	pMF11bdEGNWo (=5 µg DNA)
1 µl	KpnI-HF
1 µl	EcoR5 –HF
2 µl	Cut-Smart Puffer

Tabelle 15: Enzymatischer Verdau von CASC9clone

Eingesetzte Menge ad 30 µl H₂O	
18 µl	CASC9 Insert
0,5 µl	KpnI-HF
0,5 µl	EcoR5 –HF
3 µl	Cut-Smart Puffer

Im Anschluss wurde der enzymatisch verdaute Vektor mit dem „*Zymo Research DNA Clean & Concentrator- Kit*“ aufgereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt.

Danach erfolgte die Ligation von Vektor und CASC9clone im Verhältnis 1:3 nach folgendem Protokoll:

Tabelle 16: Protokoll zur Ligation von pMF11bdEGNWo und CASC9clone

Eingesetzte Menge ad 20 µl H₂O	
x µl	pMF11bdEGNWo
x µl	CASC9clone
2 µl	10x Ligase Puffer
0,2 µl	Ligase (<i>Fermentas T4 DNA Ligase 200 U</i>)

Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor mit der Klonierung fortgefahren werden konnte.

Im Folgenden wurde die Ligation in XL-2-Blue E. coli transformiert und je 100 µl Bakteriensuspension wurden auf einer Ampicillin-Agarplatte zur Koloniebildung im Brutschrank ausplattiert.

Aus den entstandenen Kolonien wurde mittels Minipreps DNA hergestellt. Die Erfolgskontrolle der Klonierung erfolgt durch einen Kontrollverdau mit EcoR5-HF und KpnI-HF.

2.4.3 *shRNA* vermittelter *CASC9* Knockdown in *UM-SSC-14A*

2.4.3.1 *Lentivirale Transduktion von shRNA gegen CASC9 in UM-SCC-14A*

2.4.3.1.1 *Präparation des Plasmids mit shRNA gegen CASC9*

Für die Herabregulation von *CASC9* wurde ein Plasmid von der Firma *Dharmacon* (siehe 3.1.12) erworben, das die Expression einer spezifischen *shRNA* über lentivirale Transduktion erlaubt. Das Plasmid wurde in einem Glycerolstock von *E. coli* Bakterien bereitgestellt. Zur Plasmidpräparation wurden 10 µl dieses Glycerolstocks in 5 ml LB broth medium mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und danach für 16 h bei ständigem Schwenken inkubiert. Die Plasmid DNA wurde mittels „*Plasmid Maxiprep Kit*“ der Firma *Qiagen* präpariert. Das gleiche Vorgehen erfolgte bei der Negativkontrolle. Das hierfür benötigte Plasmid stammt ebenfalls von der Firma *Dharmacon* (siehe 3.1.12). Beide Plasmide enthalten ein Gen zur Selektion auf Puromycinresistenz.

2.4.3.1.2 *Virusproduktion und Transfektion*

Am Anfang der Virusproduktion wurden 5×10^6 Zellen der Zelllinie „293T“ ausgesät. Diese Zellen wurden nach 36 h transfiziert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und durch DMEM +15% FCS ersetzt. Es wurde eine Mischung hergestellt, mit denen die Zellen versetzt wurden. Dazu wurden die Lösungen A und B (s. Tab. 17) zügig gemischt, gevortext und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie auf die Platte gegeben wurden.

Tabelle 17: Ansatz für die Virusproduktion:

Lösung A	Lösung B
985 µl DMEM	955 µl DMEM
6 µg Plasmid (<i>shCASC9</i> oder <i>shcontrol</i>)	45 µg PEI
6 µg pCMV-VSV-G	
6 µg CDNLBH	

pCMV-VSV-G liefert hierbei ein Verpackungsprotein zur Produktion lentiviraler Partikel und zu ihrer Fusion mit der Zellmembran; CDNLBH (pCMV3-untagged/ Human LBH natural ORF mammalian expression plasmid) stellt die reverse Transkriptase, Integrase und Capsidproteine für die lentiviralen Partikel bereit.

2.4.3.1.3 Lentivirale Infektion von UM-SCC-14A

Nach weiteren 24 h wurde die Zielzelllinie UM-SCC-14A in zwei 6-Well-Platten in verschiedenen Konzentrationen ausplattiert und es wurde ein Mediumwechsel der infizierten 293T-Zellen durchgeführt. Dazu wurde IMDM verwendet, welches mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1 mM Glutamin versetzt wurde.

Weitere 24 h später wurde der Virusüberstand von 293T abgenommen und die Infektion der Zielzelllinie erfolgte. Der Überstand wurde mit einer Spritze aufgenommen und durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Der Virusüberstand wurde direkt im Well verdünnt und in einer Verdünnung von 1:2; 1:5; 1:10 auf die Zellen gegeben. Nach ca. 24 h konnte man davon ausgehen, dass der Virus vollständig in die Zellen integriert ist. Deshalb wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Zwecks Selektionierung der Zellen wurde Puromycin in verschiedenen Konzentrationen (1-2 µg/ml) auf die Zellen gegeben.

2.4.3.2 Messung der Zellproliferation mittels MTT-Assay

Die stabil mit shRNA gegen CASC9 und Kontroll-shRNA behandelten Zellen wurden auf einer 96-Well Platte mit je 6000 Zellen pro Well ausgesät. Das Medienvolumen eines jeden Wells betrug dabei insgesamt 90 µl. Um die metabolische Aktivität der Zellen als Maß der Zellmenge festzustellen, wurde über fünf Tage hinweg jeden Tag ein MTT-Assay angefertigt.

Dazu wurden die einzelnen Wells mit je 50 µl MTT-Reagenz (5 mg/ml in PBS Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) versetzt und zum Inkubieren ca. 60 min in den Brutschrank gestellt. Nach der angegebenen Zeit wurden die Zellen unter dem Mikroskop angeschaut und es ließen sich einzelne blaue kristalline Strukturen erkennen. Danach wurde das Medium mitsamt dem MTT-Reagenz schwingvoll abgenommen und die Zellen wurden mit 50 µl DMSO versetzt, um sie zu lysieren. Anschließend wurde die metabolische Zellaktivität im Mikroplattenreader bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen die Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

2.4.3.3 Bestimmung der Klonogenität mittels Klonogenitätsassay

Die transfizierten Zellen sowie die Kontrollzellen wurden spärlich (2000 Zellen/Well) in einer 6-Well-Platte als Doppelwerte ausgesät. Nun wurde abgewartet, bis sich - nach 15

Tagen - mit dem bloßen Auge sichtbare Klone bildeten. Die Zellen erhielten bei Bedarf neues Medium. Nach 15 Tagen wurden die Zellen mittels Giemsa-Färbung angefärbt und ausgezählt.

2.4.3.4 Bestimmung der Migrationsfähigkeit mittels Scratch- Assay

Mit Hilfe des Scratch -Assays wurde die Migrationsfähigkeit der Zellen nach der shRNA-Behandlung gegen CASC9 untersucht.

Die stabil mit shCASC9 oder shcontrol transduzierten Zellen wurden in das Zweikammersystem der Ibidi-Platte überführt und dann für 24 h im Brutschrank inkubiert. Für den nächsten Schritt war notwendig, dass die Zellen in den Wells konfluent wuchsen. Nun wurde das Insert der Zwei-Well-Platte vorsichtig entfernt und es wurde frisches Medium zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden weiter im Brutschrank gelagert. Nach vier, sieben und 24 h wurde mit Hilfe des Mikroskops kontrolliert, wie weit sich die Zellen bereits angenähert haben und die Spaltbreite wurde bestimmt.

2.4.3.5 Bestimmung der Invasionsfähigkeit mittels Matrigel-Invasions-Assay

Am ersten Tag wurden die zu behandelnden Zellen präkonfluent in einer T25-Flasche ausgesät und mit DMEM + 10% FCS gefüttert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und für weitere 24 h serumreduziertes Medium hinzugegeben (DMEM+0,5%FCS). Mit einer sterilen Pinzette wurden ThinCerts-TC Einsätze für 24-Well-Platten mit 8 µm Porendurchmesser (*Greiner*) in eine 24-Well-Platte eingesetzt. Die behandelten Zellen befanden sich in der oberen Kammer, welche durch eine poröse Membran vom Boden getrennt ist. Für die Messung der Invasion wurden die Transwells mit einer Porengröße von 8,0 µm und das jeweilige Well der 24-Well-Platte mit verdünntem Kollagen (1:20 in 0,1%-iger Essigsäure) beschichtet. Nach der Beschichtung wurde das Kollagen abgenommen und die Membran zweimal mit PBS gewaschen.

Die für den weiteren Verlauf benötigte Gebrauchslösung bestand aus 0,5 ml Matrigel und 18 ml destilliertem Wasser und wurde vorgekühlt. Von dieser Lösung wurden 12,5 µl auf die Membran pipettiert und abgeklopft. Die Platte wurde nun für 30 min bei 37°C gelagert, sodass die Gebrauchslösung gelieren konnte. Danach wurde eine zweite Schicht Gebrauchslösung aufgetragen und bei 37°C im Brutschrank gelagert.

Bevor die Zellen auf der Matrigelmembran ausgesät wurden, wurde die Membran mit 20 µl Optimem rekonstituiert und die Zellen wurden in eine 24-Well-Platte ausgesät. Dabei wurden pro Bedingung sechsfach-Werte generiert. Dabei wurden die folgenden Zellen verwendet:

- FaDuEGN(FaDu Zellen mit transfiziertem Leervektor)
- FaDuCASC9 FaDu Zellen mit transfiziertem CASC9 Vektor)
- HaCaTEGN HaCaT Zellen mit transfiziertem Leervektor)
- HaCaTCASC9 HaCaT Zellen mit transfiziertem CASC9 Vektor)

Die mit serumreduziertem Medium vorbehandelten Zellen wurden abtrypsiniert, in normalem Medium aufgenommen und zentrifugiert. Nach Aufnahme in 4 ml Optimem wurden die Zellen gezählt und 350.000 Zellen in ein Eppendorfgemäß gegeben.

Diese Zellen wurden bei 2500 rpm zentrifugiert und in 350 µl Optimem wieder aufgenommen. Je 50 µl Zellsuspension wurde in ein Well gegeben und 500 µl Medium mit 20% FCS unter den Einsatz pipettiert.

Die Zellen wurden danach 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Transwell-Einsätze wurden aus dem Well entnommen und die Membran von innen von nicht-invasiven Zellen gereinigt. Hierauf wurden die Membranen zur Fixierung zehn Minuten in eiskaltem Methanol inkubiert. Bei der Färbung wurde die Membran vor jedem Schritt von nicht-invasiven Zellen gereinigt. Zunächst wurde die Membran zehn Minuten in Hämatoxylin inkubiert und hiernach kurz in Wasser gespült. Zum „Bläuen“ der Membranen wurden diese fünf Minuten in Wasser inkubiert. Es erfolgte die Eosin-Färbung für weitere 10 Minuten mit einem anschließenden Waschschrift in Wasser. Schließlich folgten jeweils kurze Inkubationen in Ethanol mit aufsteigender Konzentration: zweimal 70%, zweimal 80% und zweimal 100%. Nach der Ethanol-Reihe wurden die Membranen ein letztes Mal gereinigt und mit dem Skalpell aus dem Transwell-Einsatz ausgeschnitten. Die Membranen wurden kurz mit Xylol gespült.

Zuletzt wurden je drei Membranen mit den Zellen nach oben auf einen Objektträger gelegt, mit Eukitt betropft und mit einem Deckglas versiegelt.

Tabelle 18: Protokoll zur Färbung der Zellen

Reagenz	Behandlungsdauer
Hämatoxylin	2 Minuten
H₂O	5 Minuten
Eosin	1 Minute
H₂O	30 Sekunden
Alkoholreihe 70% 80% 96%	Je 1 Minute
Xylol- Ersatz	1 Minute

2.4.3.6 Messung des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie

Mithilfe des Durchflusszytometers, kurz *FACS (Fluorescence-Activated-Cell-Sorter)*, wird die Fluoreszenz von Partikeln (auch Zellen) gemessen, während diese - von einem Laser bestrahlt - durch ein Glasröhrchen fließen. Dadurch können beispielsweise die Zellen gezählt werden und über den DNA-Gehalt ihre aktuelle Zellzyklusphase bestimmt werden.

Kurz vor der Zellanalyse wurden die Zellen abtrypsiniert und bei 300 g abzentrifugiert. Danach erfolgte eine einmalige Waschung mit PBS. Das entstandene Zellpellet wurde in 500 µl Nicoletti-Puffer gründlich resuspendiert, sodass alle Zellklumpen gelöst wurden; diese können zu Verstopfungen am Gerät führen. Nun wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei war es wichtig, dass die Inkubation im Dunkeln erfolgte. Danach erfolgte die Einstellung des Geräts und die Messungen. Vor jeder Messung mussten die Zellen erneut gevortext werden.

Sowohl zur Messung der Apoptose als auch zur Zellzyklusanalyse wurde der Überstand gesammelt. Danach wurden die Zellen zur Apoptosemessung abtrypsiniert, zum Überstand gegeben und gemeinsam bei mindestens 200 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde einmal mit dem Annexin Binding Puffer gewaschen.

Das Zellpellet wurde in 70 µl Annexin Binding Buffer gründlich resuspendiert und danach mit 5 µl Annexin V FITC-Konjugat und 7.5 µl Propidiumiodid-Lösung versetzt. Nun wurde die Lösung für 15 min bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Vor der Apoptosemessung wurde einmalig 500 µl Annexin V Binding Buffer zugeben.

2.4.3.7 Messung der Cisplatinresistenz mittels MTT-Assay

Zur Testung der Cisplatinresistenz der behandelten Zellen wurde Cisplatin in unterschiedlichen Konzentrationen (0-3 µg/ml) auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen inkubiert und ihre Zellviabilität nach 48 h mittels MTT-Assay gemessen. Daraufhin konnte die jeweilige IC₅₀ Konzentration bestimmt werden.

2.4.4 Überexpression von CASC9 in FaDu und HaCaT Zellen

Die Überexpression von CASC9 wurde in FaDu und HaCaT durchgeführt. HaCaT und FaDu wurden mittels lentiviraler Transduktion durch den Vektor pMF11bdEGNwo mit CASC9 oder einem Leervektor behandelt, sodass CASC9 stabil exprimiert wurde. Pro Well wurden dann je 40/80.000 Zellen von FaDu und je 30/70.000 Zellen von HaCaT in einer 6-Well Platte ausgesät, um Migration, Invasion und Proliferation zu untersuchen. Die funktionellen Untersuchungen zu Migration, Invasion und Proliferation erfolgten äquivalent zu den Knockdownversuchen mit shRNA gegen CASC9, wie in 2.8.3.2-2.8.3.5 nachgelesen werden kann.

2.5 Statistische Verfahren

2.5.1 Korrelation mit klinischen Parametern

Nach Abschluss und Auswertung aller PCR-Messungen wurde berechnet, inwieweit die Expressionsveränderungen einzelner lncRNAs mit klinischen Parametern korrelieren. In dieser Auswertung wurden die lncRNAs betrachtet, die in vorherigen Messungen signifikante Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalproben aufwiesen. Diese Daten wurden in SPSS übertragen und mit ausgewählten klinischen Parametern korreliert, welche in Tabelle 19 zu finden sind. Die Signifikanz von Unterschieden bei den erhobenen Daten und Parametern für Gewebeproben wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests überprüft. Zur Bestimmung der Signifikanz von Unterschieden bei Experimenten mit Zelllinien wurde der t-Test verwendet. Als signifikant wurde jeweils ein Niveau von $p < 0,05$ angesehen.

Tabelle 19: Liste aller klinischen Parameter der Auswertungen

Variablen	Klassifizierung
Probentyp	Tumorgewebe Normalgewebe
Leben	tot lebendig
Geschlecht	männlich weiblich
HPV-Status	positiv negativ
Tumorstadium	pT1 pT2 pT3 pT4
Subklassifizierung	Tumorstadium \leq pT2 Tumorstadium $>$ pT2
Lymphknotenstatus	positiv negativ

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung wurden graphisch in der Regel als Boxplotdiagramme dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Datenbankanalyse zur Suche nach lncRNA Biomarker-Kandidaten für das HNSCC

Im ersten Schritt wurden potentielle Kandidaten für eine genauere Untersuchung im HNSCC mittels Literatur- und Datenbankrecherchen identifiziert. Dabei waren lncRNAs mit signifikant veränderter Expression im Tumor und möglichst einer Korrelation mit klinischen Parametern, maßgeblich der Prognose, von Interesse.

Zunächst wurden dazu lncRNAs aus den Untersuchungen von *Zou et al.* [22] betrachtet. Diese Forschungsgruppe hat die Expression verschiedener lncRNAs in Tumor- und Normalgeweben von HNSCC anhand von RNA-Seq Daten untersucht. Dabei waren 222 lncRNAs identifiziert worden, die in Tumorproben eine veränderte Expression im Vergleich zu Normalgewebe aufwiesen. Mittels Abgleich dieser Daten mit der *TANRIC* Datenbank, die über RNA-Sequenzierung ermittelte Genexpressionsdaten von 426 Tumorgeweben und 42 gutartigen Gewebeproben aus der *TCGA*-Studie beinhaltet, wurde die Anzahl der lncRNAs auf 65 reduziert.

Als Kriterium beim Verkleinern der Kandidatenliste wurden differentiell exprimierte lncRNAs ausgesucht, die mit dem Überleben der Patienten assoziiert waren. Dieses wurde durch Auswertung der Cox p- und log-rank p-Werte erreicht. Kriterium dafür war, dass nur lncRNAs mit wenigstens einem signifikanten Cox oder log-rank p-Wert berücksichtigt wurden. Im nächsten Schritt erfolgte die Berechnung des Medians der Expressionsspiegel für Tumor- und Normalgewebe, sowie die Berechnung des Quotienten der medianen Expression von Tumor- und Normalgewebe. Als Cut-off diente dann eine Verdreifachung der Expression, so dass am Ende 14 lncRNAs für eine nähere Betrachtung in Frage kamen. Diese sind der Tabelle 20 zu entnehmen:

Tabelle 20: lncRNA Kandidaten für das *HNSCC* laut *Zou et al.*

Genname nach UCSC Genome Browser	Lokalisation Chromosom Abschnitt	Größe in Basen	abweichender Name	benachbarte Gene	Typ lncRNA	Bemerkung	Expression im Tumor
ENSG00000233850.1	2q11.1	478 b	LNC-MRPS5-2	MAL	antisense	clustered	vermindert
ENSG00000244128	3q26.1	563 b	LINC01322	SLITRK3	divergent		erhöht
ENSG00000248240.1	5p12	572 b	Lnc-NNT2	C5orf34	divergent		erhöht
ENSG00000152931	5q12.1	2316 b	PART1	PDE4D	antisense		vermindert
ENSG00000249082	5q31.1	477 b	LOC340074	PITX1	intergenisch		vermindert
ENSG00000228789	6p21.33	1980 b	HCG 22	MUC22	intergenisch	clustered	vermindert
ENSG00000223485	6q27	647 b	LINC01615	THBS2	intergenisch		erhöht
ENSG00000253187.2	7p15.2	1129 b	HOXA-AS4	HOXA10	antisense		erhöht
ENSG00000249395	8q21.11	1164 b	CASC9	HNF4G	intergenisch		erhöht
ENSG00000235884.2	12p11.21	1645 b	LINC00941	CAPRIN2	intergenisch		erhöht
ENSG00000244306	14q11.2	4264 b	LINC00516	POTEM	intergenisch	clustered	erhöht
ENSG00000225210.4	14q11.2	4119 b	LINC01296	POTEM	intergenisch	clustered	erhöht
ENSG00000258661.1	14q13.3	2613 b	NKX2-1-AS1	NKX2-1-AS1	antisense		vermindert
ENSG00000184324.11	Xq28	847 b	CSAG3	MAGE-A2	intergenisch		erhöht

Zur Validierung des Datensatzes wurden in einem unabhängigen Ansatz alle 38184 in der *TCGA*-Studie verzeichneten lncRNAs betrachtet. Dazu wurde die *TANRIC* Datenbank verwendet. Zur ersten groben Eingrenzung wurde der Median der lncRNA Expression in Tumor- und Normalgewebe berechnet und die lncRNAs wurden nach folgenden Kriterien gefiltert:

4. ausreichende Expression im Tumorgewebe (Median der RPKM im Tumorgewebe >1)
5. mindestens dreifach erhöhte Expression von lncRNAs in Tumorgeweben im Vergleich zu Normalgeweben.

Diese Kriterien ergaben 17 primär zu untersuchende lncRNAs, welche in Tabelle 21 aufgeführt werden.

Tabelle 21: lncRNA Kandidaten für das *HNSCC* laut *TANRIC* Datenbankrecherche

Gennamen nach UCSC Genome Browser	Lokalisation Chromosom	Größe in Basen	abweichender Name	benachbarte Gene	Typ lncRNA	Bemerkung
ENSG00000231346.1	1p13.2	706 b	LINC00160	RAP1A	antisense	
ENSG00000215808.2	1q43	1537 b	LINC01139	MTRNR2L11	intergenisch	
ENSG00000229647.1	2q33.3	601 b	Lnc-KLF7-1 LOC101927865	KLF7, MIR1302-4	divergent	
ENSG00000163364.5	2q31.1	838 b	LINC01116	MTX2	intergenisch	clustered
ENSG00000225548.1	3p24.1	491 b	LINC01980	EOMES	intergenisch	
ENSG00000237978.1	3q26.32	508 b	KCNMB2-AS1	KCNMB2	antisense	

ENSG00000248554.1	5p12	572 b	Lnc-NNT2	C5orf34	divergent	
ENSG00000223485.1	6q27	647 b	LINC01615	THBS2	interge- nisch	
ENSG00000254341.1	8q13.1	472 b	SNHG6	MCMD2	antisense	
ENSG00000249395.2	8q21.11	1164 b	CASC9	HNF4G	interge- nisch	
ENSG00000242147.1	10p15.1	704 b	Lnc-ASB13-3 LOC105376382	ASB13	interge- nisch	
ENSG00000254560.1	11p14.1	745 b	BBOX1-AS1	BBOX1	antisense	
ENSG00000249641.2	12q13.13	1408 b	HOXC13-AS	HOXC13	antisense	

ENSG00000225210.5	14q11.2	1060 b	Lnc-POTEM-4	POTEM	interge- nisch	clus- tered
ENSG00000258955.1	14q22.1	1492 b	LINC00640	TMX1	interge- nisch	
ENSG00000272763.1	17q21.32	379 b	HOXB-AS4 Lnc-HOXB7-1	HOXB9 MIR196A1	interge- nisch	
ENSG00000237989.1	21q22.3	2798 b	LINC01679	SIK1	interge- nisch	

Wie aus den Tabellen 20 und 21 ersichtlich ist, wurden für die ausgewählten lncRNAs weitere wichtige Charakteristika ermittelt. Dazu wurde für jede lncRNA mit Hilfe des UCSC Genome Browsers die genaue genomische Lokalisation, Größe des Transkripts, benachbarte Gene und Verhältnis zu diesen bestimmt.

Jeder potentielle Kandidat wurde im Folgenden auf Eignung als messbare lncRNA überprüft. Dabei verkleinerte sich die Menge an potentiellen Kandidaten oft wegen ihrer Lokalisation im Genom. Beispielsweise überlappen einige lncRNAs so stark mit anderen Genen, dass sie sehr schwierig zu quantifizieren sind, da man nicht mit absoluter Sicherheit sagen kann, welche Gene oder Transkripte man genau misst. Hierzu zählt zum Beispiel lnc00640 oder linc01679. Weiterhin liegen einige lncRNAs in größeren überlappend transkribierten Bereichen (hier als „clustered“ bezeichnet), so dass die relevanten Einzeltranskripte schwer auszumachen sind (z.B. linc01116 oder lncPOTEM-4). Schließlich sind die Annotationen der lncRNAs in den Genom-Datenbanken oftmals noch nicht so verlässlich wie die von proteinkodierenden Genen (s. Beispiele in 3.2).

Zusätzlich zu den über die Recherchen ermittelten lncRNAs wurden die beiden bereits vom urologischen Forschungslabor in Urothelkarzinomen intensiv untersuchten lnc-RNAs TINCR und HOTAIR zur Messung in den Kopf-Hals-Tumoren ausgewählt, um eventuelle Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in der Expression dieser lncRNAs in den beiden Tumorarten zu finden. TINCR und HOTAIR sind dabei zwei lncRNAs, die in den bisherigen Recherchen nicht auftauchten, allerdings wird ihre Expression und Funktion in anderen Tumorentitäten beschrieben, weshalb eine nähere Betrachtung lohnenswert erschien.

Zusammenfassend wurden für die weiterführenden Messungen folgende lncRNAs ausgewählt:

Tabelle 22: lncRNA Kandidaten zur Messung in Geweben

Zou et. al	Overlap	TCGA data via TANRIC database	Zusätzlich
NKX-2-1-AS1	CASC9	HOXC13-AS	TINCR
LINC01296	LINC01296	HOXB-AS3	HOTAIR
CASC9	LINC01615	SNHG6	
LINC01615		LINC01296	
LINC01322		CASC9	
HOXA-AS4		LINC01116	

3.2 Bestimmung der Expression von lncRNAs in Gewebeproben aus Kopf-Hals Plattenepithelkarzinomen mittels qRT-PCR

Die Expression der ausgewählten lncRNA wurde nun in Gewebeproben von Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals gemessen. Für die Messungen standen 49 Tumor- und 20 Normalproben zur Verfügung. Die genaue Zusammensetzung der Probenserie kann im Material und Methodenteil dieser Arbeit nachgelesen werden (s. Tabelle 1).

Zu Beginn erfolgte für jede cDNA die Messung der Expression der beiden Referenzgene *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und *SDHA* (Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A). Zur weiteren Auswertung wurde das geometrische Mittel aus *SDHA* und *GAPDH* als Normalisierungsfaktor bestimmt, auf das die in den Gewebeproben gemessenen Konzentrationen der jeweiligen lncRNAs bezogen wurden.

Im nächsten Schritt wurde die qRT-PCR-Messung für jede der lncRNAs etabliert. Dazu wurden jeweils verschiedene Proben aus dem Bestand des urologischen Forschungslabors verwendet, in denen die Expression der jeweiligen lncRNA gemessen wurde. Diese Messungen dienten zunächst der Standardfindung.

Für einige lncRNAs erwies sich die Etablierung der Genexpressionsbestimmung aus biologischen oder technischen Gründen schwierig, sodass sie in den Geweben nicht sinnvoll durchgeführt werden konnte. Diese lncRNAs und die jeweiligen Ausschlussgründe sind im Folgenden erläutert.

- **Linc01296:** Aufgrund von Literatur- und Datenbankrecherchen erschien diese lncRNA besonders vielversprechend, da sie unabhängig voneinander in beiden Recherchen erschien. Bei genauerer Charakterisierung von linc01296 ergab sich jedoch, dass die gleiche Sequenz sowohl auf Chromosom 14q11.2 als auch auf Chromosom 22q11.1 zu finden ist. Die Überlappung in gleicher Richtung mit *DUXAP8* auf Chromosom 22q11.1 stellt ein weiteres Problem dar, da sich somit nicht für alle Primerkombinationen sagen lässt, ob nun LINC01296 oder *DUXAP8* gemessen wird. Dieses proteinkodierende Gen besitzt zudem viele verschiedene Spleiß-Isoformen, sodass keine für die lncRNA spezifischen Primer entworfen werden konnten. Daher wurde die Messung von linc01296 im Gewebe nicht durchgeführt.
- **Linc01615:** Das Gen, welches die 4041 Basen lange linc01615 kodiert, liegt intergenisch auf Chromosom 6q27. Über linc01615 war zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nichts zu Expression und Funktion in Tumorgeweben bekannt. Die Messung von linc01615 konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da sich die Primeretablierung schwierig gestaltete und im Agarosegel die Länge des PCR-Produktes nicht mit der erwarteten Größe übereinstimmte. Daher wurde die Messung von linc01615 nicht weiterverfolgt.
- **Linc01322:** Das Gen, welches linc01322 kodiert, liegt auf Chromosom 3q26.1 direkt anschließend an *SLITRK3*. Die erwartete Größe des Transkripts beträgt 563 Basen. In der Literatur zur Tumorforschung ist über linc01322 bislang noch nichts hinterlegt. Die Etablierung einer PCR gestaltete sich äußerst schwierig und war letztendlich nicht möglich, da linc01322 in unterschiedlichen Zelllinien und Gewebeproben urologischen, aber auch plattenepithelialen Ursprungs nicht detektierbar war. Aufgrund dessen wurde von weiteren Messungen abgesehen.
- **HOXC13AS:** Beim Versuch der Primeretablierung zeigten sich in der Auswertung der qRT-PCR einige Unstimmigkeiten bezüglich der Schmelzpunkte. In zwei verschiedenen Messungen lagen die Schmelzpunkte deutlich auseinander, sodass keine Arbeitstemperatur bestimmt werden konnte. Auch durch eine Gradienten-PCR, die während der Messung verschiedener Temperaturen zur Anlagerung verwendet, konnte keine Abhilfe schaffen, sodass auch für diese lncRNA die Messungen eingestellt wurden.
- **HOXA-AS4:** Das Gen, welches HOX-A-AS4 kodiert, liegt auf Chromosom 7p15.2 in entgegengesetzter Transkriptionsrichtung und überlappend zu *HOXA10* und *HOXA9*. Die Größe der lncRNA beträgt 1129 Basen. Aus der Literatur gibt es ebenso wenig Informationen zu HOXA-AS4 wie zu den oben genannten lncRNAs. Unter verschiedenen

PCR-Bedingungen und mit cDNAs aus verschiedenen Geweben und Zelllinien ließ sich kein Produkt detektieren, weswegen diese lncRNA von den weiteren Messungen ausgeschlossen wurde. Die genomisch benachbarte lncRNA HOXA-AS3 konnte hingegen - trotz oft schwacher Expression - untersucht werden (s. 3.2.3).

Bei den folgenden lncRNAs war dagegen ein quantitativer Nachweis möglich und ihre Expression wurde in den Gewebeproben bestimmt. Nachstehend sind für jede lncRNA die Ergebnisse aus den eigenen qRT-PCR Messungen und die auf RNA-Seq basierenden Daten aus der *TANRIC*-Datenbank gegenübergestellt.

3.2.1 NKX2-1-AS1

Das Gen, welches NKX2-1-AS1 codiert, liegt auf Chromosom 14q13.3 in entgegengesetzter Richtung zu *PAX9*. Die Größe der lncRNA soll 2613 Basen betragen. Die Primeretablierung gestaltete sich für NKX2-1-AS1 zunächst schwierig, da mittels qRT-PCR keine Expression in einer Reihe von Geweben urologischen oder plattenepithelialen Ursprungs detektierbar war. Aus diesem Grund wurde auf die vorliegenden Gewebeprobepben zurückgegriffen, um eine Probe zu finden, in der NKX-2-1-AS1 messbar war. Nach Auswahl mehrerer Tumor- und Normalproben stellte sich heraus, dass NKX-2-1-AS1 zumeist nur in gutartigen Gewebeproben exprimiert wird. Deshalb wurde als Standard eine gutartige Gewebeprobe aus dem Probenset mitgeführt.

Entsprechend war NKX-2-1-AS1 im Tumor signifikant erniedrigt ($p < 0.001$) im Vergleich zu gutartigen Gewebeproben (s. Abb. 4).

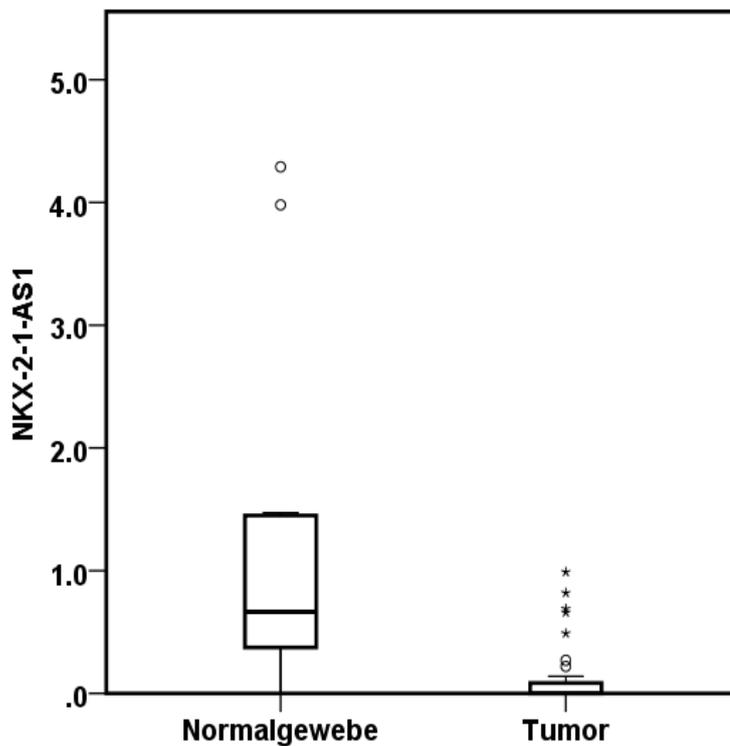


Abb. 4.1a: Relative NKX2-1-AS1 Expression in Tumor- und Normalgewebe laut qPCR: Die relative Expression der lncRNA NKX2-1-AS1 wurde mittels qRT-PCR in 49 Tumorgewebeproben und 20 Normalproben bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p < 0.001$).

Laut *TANRIC*-Datenbank (s. Abb. 4.1b) hingegen ist die NKX-2-1-AS1 Expression im Tumor signifikant im Vergleich zum Normalgewebe erhöht ($p < 0.001$). Somit unterscheiden sich die eigenen Messergebnisse deutlich von den Ergebnissen der *TANRIC*-Datenbank. Anzumerken ist hier allerdings die äußerst niedrige Expression der lncRNA in den Gewebeproben.

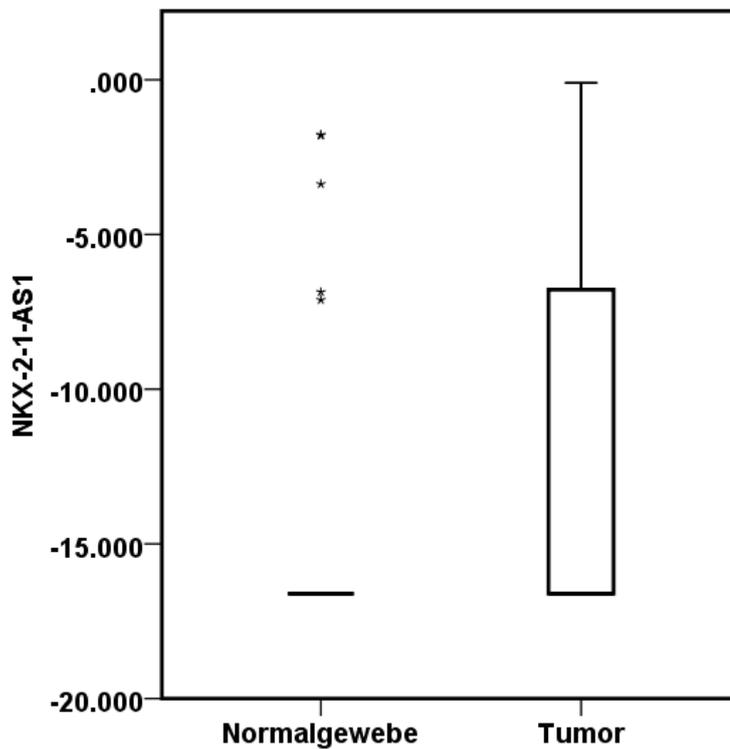


Abb. 4.1b: Relative NKX2-1-AS1 Expression in Tumor- und Normalgewebe basierend auf Daten der TANRIC-Datenbank: Als Vergleich zu den eigenen Messungen wurde die relative Expression der lncRNA NKX2-1-AS1 aus RNA-Seq-Messungen in 426 Tumorgeweben und 42 Normalgeweben der TCGA-Daten bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p < 0.001$).

3.2.2 CASC9

Auf Chromosom 8q21.11 liegt das für CASC9 kodierende Gen; die lncRNA umfasst 1164 Basen. Die Funktion und Regulation von CASC9 ist im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus bereits untersucht worden. Dort führt ein Knockdown von CASC9 zu veränderter Migration und Invasion von Tumorzellen [23-25]. Deshalb erschien eine genauere Betrachtung der CASC9 Expression im Plattenepithelkarzinom von Kopf- und Hals besonders lohnenswert.

Nach den qRT-PCR Messungen ist CASC9 im Tumorgewebe signifikant stärker exprimiert ($p < 0.001$) als im Normalgewebe.

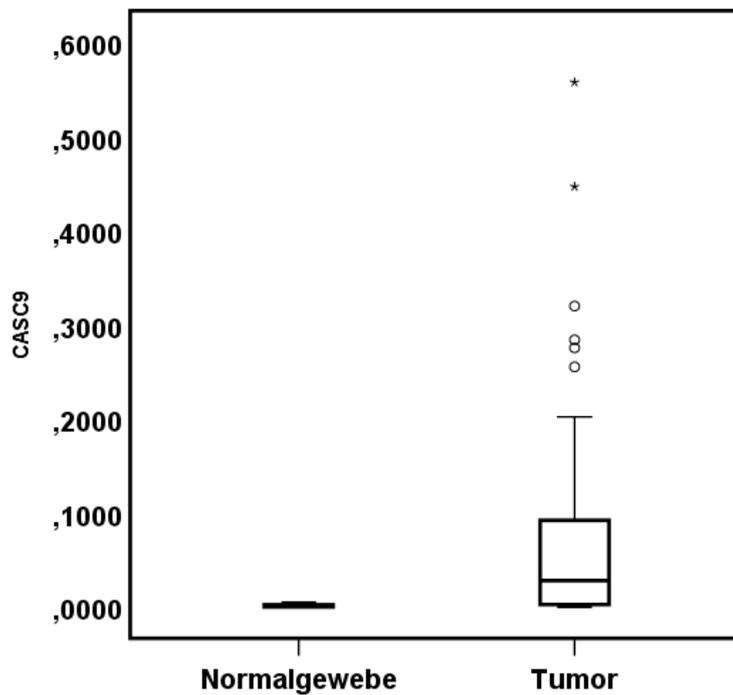


Abb. 5.1a: Relative CASC9 Expression in Tumor- und Normalgewebe laut qPCR:

Die relative Expression der lncRNA CASC9 wurde mittels qRT-PCR in 49 Tumorgewebeproben und 20 Normalproben bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p < 0.001$).

Auch im Probenstet der *TANRIC* Datenbank besteht eine signifikante Überexpression ($p < 0.001$) von CASC im Tumorgewebe, welche der Abb. 5.1b entnommen werden kann.

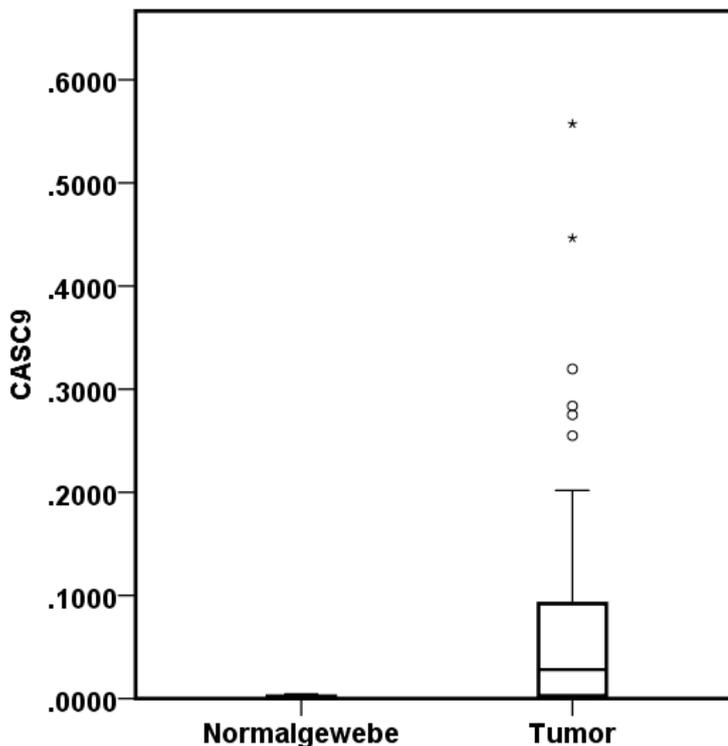


Abb. 5.1b: Relative CASC9 Expression in Tumor- und Normalgeweben basierend auf Daten der TANRIC-Datenbank: Als Vergleich zu den eigenen Messungen wurde die relative Expression der lncRNA CASC9 aus RNA-Seq-Messungen in 426 Tumorgeweben und 42 Normalgeweben der *TCGA*-Daten bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p < 0.001$).

3.2.3 *HOXB-AS3*

Das Gen, welches für *HOXB-AS3* kodiert, liegt auf Chromosom 17q21.32 intergenisch zwischen *HOXB4* und *HOXB8*; die lncRNA umfasst 806 Basen. In vorangegangenen Messungen des urologischen Forschungslabores hatte sich herausgestellt, dass *HOXB-AS3* im Urothelkarzinom signifikant stärker exprimiert wird als im Normalgewebe der Harnblase. Für andere Tumorentitäten gibt es über *HOXB-AS3* in der Literatur zum aktuellen Zeitpunkt noch keine genauen Informationen.

Die Expressionsmessung von *HOXB-AS3* in Tumor- und Normalproben erfolgte im Vergleich zu der UC-Zelllinie RT-112, welche *HOXB-AS3* stark exprimiert und somit als Standard ausgewählt wurde.

Die Auswertung der Messungen ergab dabei eine signifikante Erhöhung ($p=0.013$) von HOXB-AS3 in den Tumorproben im Vergleich zum Normalgewebe (s. Abb. 6.1a).

Dieses Ergebnis wurde auch durch die Daten der *TANRIC* Datenbank bestätigt, in denen ebenfalls eine signifikante Erhöhung ($p=0.001$) von HOXB-AS3 in den Tumorproben im Vergleich zum Normalgewebe zu beobachten war (s. Abb. 6.1b). Auch hier waren die Messwerte in einigen Proben sehr niedrig.

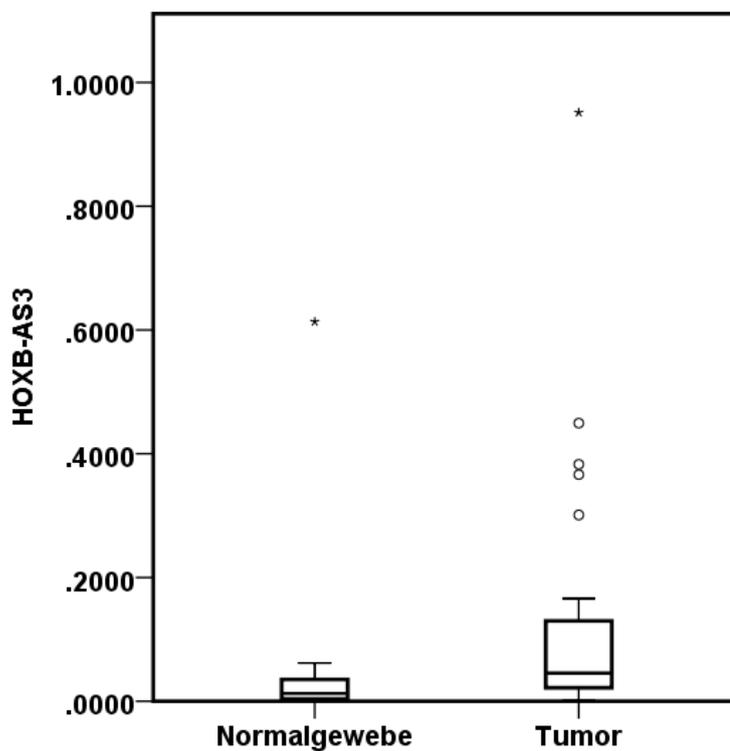


Abb. 6.1a: Relative HOXB-AS3 Expression in Tumor- und Normalgewebe laut qPCR: Die relative Expression der lncRNA HOXB-AS3 wird mittels qRT-PCR in 49 Tumorgewebeproben und 20 Normalproben bestimmt. Von der grafischen Auswertung werden drei Outlier ausgeschlossen. Für ein Normalgewebe und zwei Tumorproben wurden stark abweichende Ergebnisse erhalten, nämlich weitaus höhere Expressionen von HOXB-AS3 im Vergleich zu allen anderen Proben. Dieses Ergebnis ist in der Graphik nicht gezeigt, ist aber bei der statistischen Auswertung berücksichtigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p=0.013$).

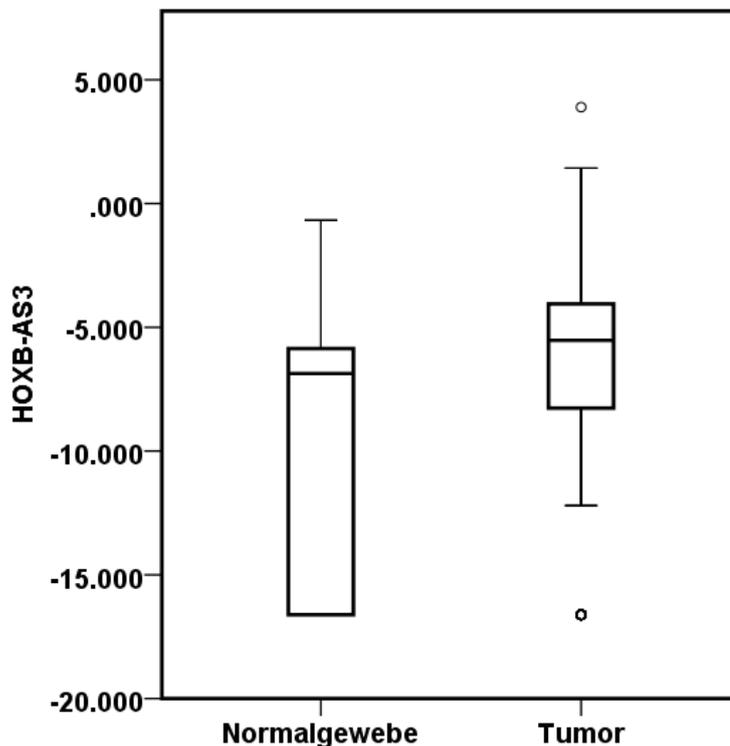


Abb. 6.1b: Relative HOXB-AS3 Expression in Tumor- und Normalgewebe basierend auf Daten der TANRIC-Datenbank: Als Vergleich zu den eigenen Messungen wurde die relative Expression der lncRNA HOXB-AS3 aus RNA-Seq-Messungen in 426 Tumorgeweben und 42 Normalgeweben der *TCGA*-Daten bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p=0.001$).

3.2.4 *TINCR*

Die lncRNA *TINCR* umfasst 1856 Basen und ihr kodierendes Gen liegt auf Chromosom 19p13.3. *TINCR* ist bisher gut im Hinblick auf seine Funktion bei der epidermalen Differenzierung charakterisiert (s. 1.2). Diese lncRNA gehört mit zu den ersten, deren Funktion detailliert charakterisiert wurde [18]. Für das Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals gab es bisher noch keine explizit publizierten Untersuchungen zur Expression.

Die qRT-PCR Messungen ergaben, dass die Expression von *TINCR* in Tumorgeweben im Vergleich zum Normalgewebe signifikant erniedrigt ($p=0.007$) ist.

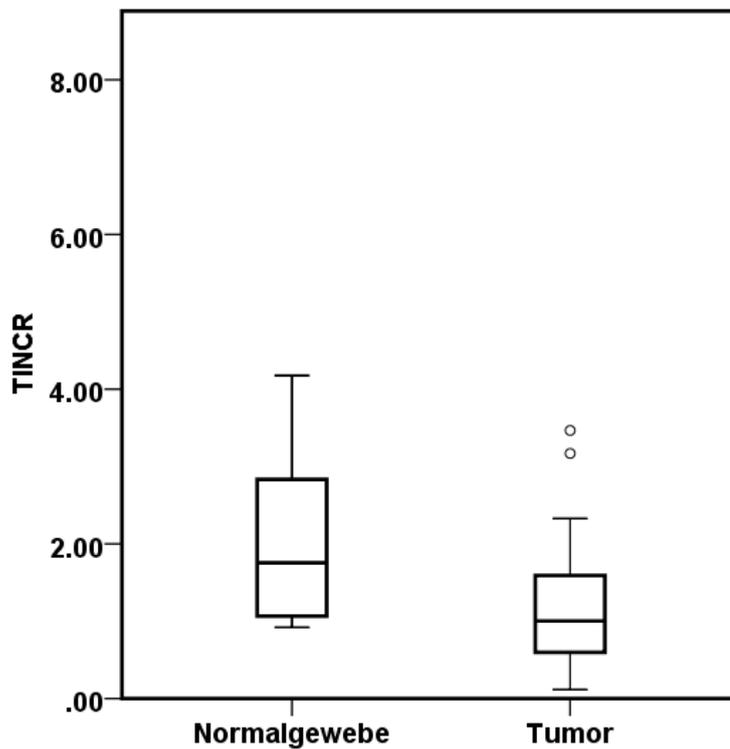
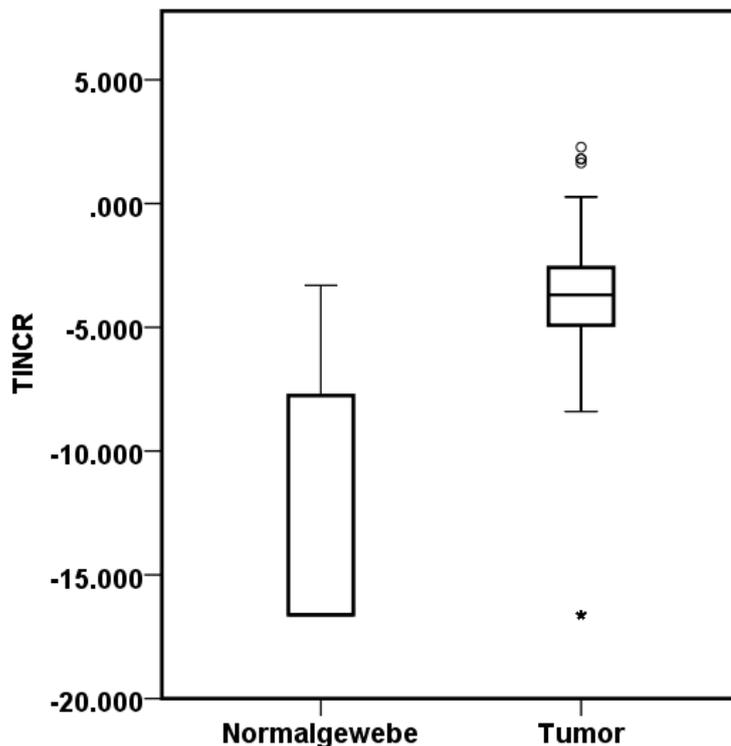


Abb. 7.1a: Relative TINCR Expression in Tumor- und Normalgewebe laut qPCR: Die relative Expression der lncRNA TINCR wird mittels qRT-PCR in 49 Tumorgewebeproben und 20 Normalproben bestimmt. In der Grafik sind drei Outlier nicht gezeigt: Für ein Normalgewebe und zwei Tumorproben wurden stark abweichende Ergebnisse erhalten, nämlich weitaus höhere Expressionen von TINCR im Vergleich zu allen anderen Proben. Dieses Ergebnis ist in der Graphik nicht gezeigt, ist aber bei der statistischen Auswertung berücksichtigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p=0.007$).

In der *TANRIC* Datenbank wird demgegenüber keine signifikante Expressionsveränderung von TINCR in Tumorgeweben im Vergleich zum Normalgewebe beobachtet. TINCR ist jedoch im Tumor stärker exprimiert wird als im Normalgewebe. Die Daten der *TANRIC* Datenbank zeigten sich in ihrer Ausprägung konträr zu den Ergebnissen des hiesigen Labors. Allerdings waren die Ergebnisse nicht statistisch signifikant.



**Abb. 7.1b: Relative TINCR Expression in Tumor- und Normalgewebe basierend auf Daten der *TAN-
RIC*-Datenbank:** Als Vergleich zu den eigenen Messungen wurde die relative Expression der lncRNA
TINCR aus RNA-Seq-Messungen in 426 Tumorgeweben und 42 Normalgeweben der *TCGA*-Daten be-
stimmt. Der Unterschied zwischen Normalgewebe und Tumoren ist nicht signifikant laut Mann-Whitney
Test.

3.2.5 *HOTAIR*

Ebenso wie TINCR ist auch HOTAIR bereits aus der Literatur und verschiedenen Tumorentitäten bekannt (s. 1.2). Für das Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals fehlen allerdings noch Information zur Expression. Das HOTAIR kodierende Gen liegt auf Chromosom 12q13.13 und HOTAIR ist 2362 Basen lang.

Die Untersuchung mittels qRT-PCR ergab, dass die Expression von HOTAIR im Tumorgewebe signifikant im Vergleich zum Normalgewebe ($p=0.006$) erhöht war. Dieses Ergebnis wird auch durch die Daten der *TANRIC* Datenbank unterstützt, die ebenfalls eine hochsignifikante Erhöhung von HOTAIR im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe erkennen ließ ($p<0.001$).

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 8.1a und 8.1b illustriert.

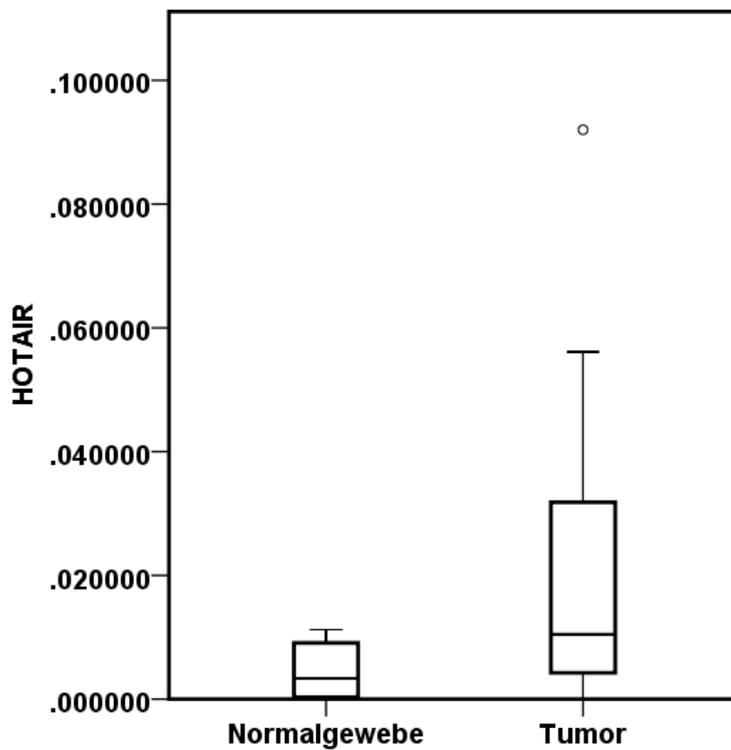


Abb. 8.1a: Relative HOTAIR Expression in Tumor- und Normalgewebe laut qPCR: Die relative Expression der lncRNA HOTAIR wird mittels qRT-PCR in 49 Tumorgewebeproben und 20 Normalproben bestimmt. In der Grafik sind drei Outlier nicht gezeigt. Für eine Tumorseite wurde ein stark abweichendes Ergebnis erhalten, nämlich eine weitaus höhere Expression von HOTAIR im Vergleich zu allen anderen Proben. Dieses Ergebnis ist in der Graphik nicht gezeigt, ist aber bei der statistischen Auswertung berücksichtigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p=0.006$).

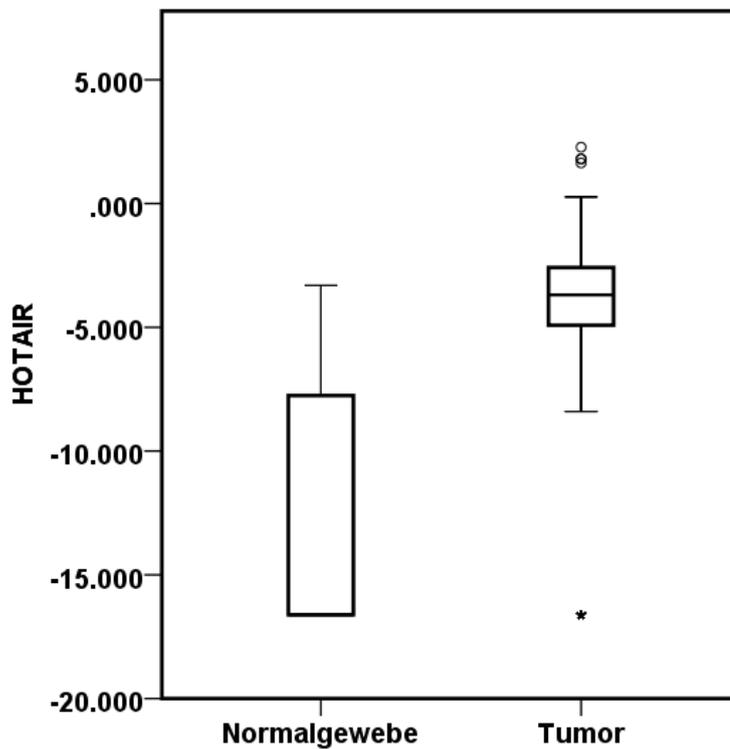


Abb. 8.1b: Relative HOTAIR Expression in Tumor- und Normalgewebe basierend auf Daten der TANRIC-Datenbank: Als Vergleich zu den eigenen Messungen wurde die relative Expression der lncRNA HOTAIR aus RNA-Seq-Messungen in 426 Tumorgeweben und 42 Normalgeweben der TCGA-Daten bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p < 0.001$).

3.2.6 SNHG6

Das Gen, welches SNHG6 codiert, liegt auf Chromosom 8q13.1 bei einer Größe der lncRNA von 472 Basen; es ist bereits aus der Literatur als menschliches *snRNA host gene 6* bekannt.

Bei der Suche nach einem Standard wurde die höchste Expression von SNHG6 in der HN-SCC-Zelllinie UM-SCC-10B gemessen.

Die Ergebnisse der qRT-PCR ergaben keinen signifikanten Unterschied ($p = 0.426$) in der Expression von SNHG6 zwischen Tumorgewebe und Normalprobe. Die Auswertung der

Daten aus der *TANRIC* Datenbank ergab im größeren Patientenkollektiv hingegen eine schwache, jedoch aufgrund der hohen Probenzahl hochsignifikante Expressionssteigerung ($p < 0.001$) im Tumorgewebe (s. Abb. 9.1a und 9.1b).

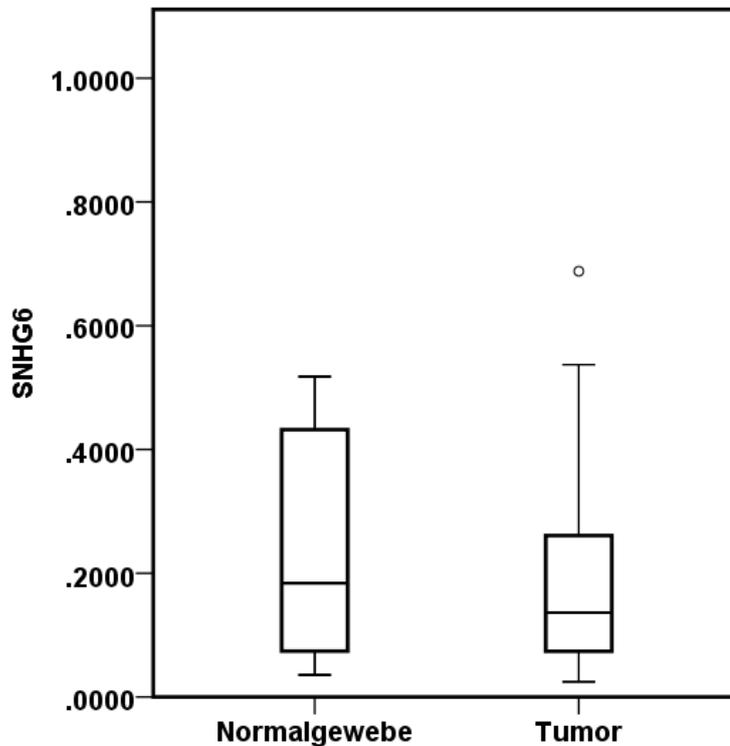


Abb. 9.1a: Relative SNHG6 Expression in Tumor- und Normalgewebe laut qPCR: Die relative Expression der lncRNA SNHG6 wurde mittels qRT-PCR in 49 Tumorgewebeproben und 20 Normalproben bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt; es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe.

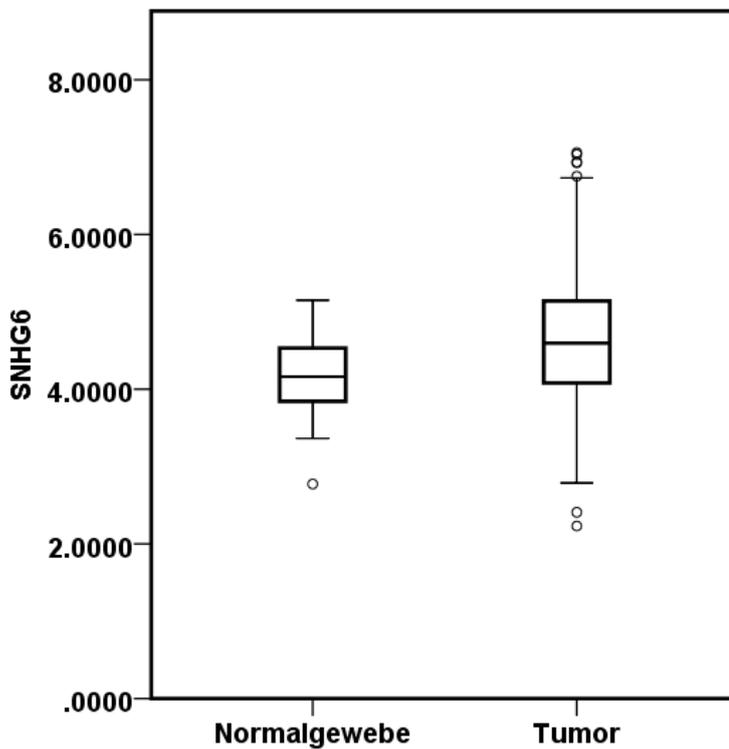


Abb. 9.1b: Relative SNHG6 Expression in Tumor- und Normalgewebe basierend auf Daten der *TAN-RIC***-Datenbank:** Als Vergleich zu den eigenen Messungen wurde die relative Expression der lncRNA SNHG6 aus RNA-Seq-Messungen in 426 Tumorgeweben und 42 Normalgeweben der *TCGA*-Daten bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p < 0.001$).

3.2.7 *Linc01116*

Linc01116 ist eine 838 Basen lange lncRNA, die bis dato noch nicht näher in der Literatur beschrieben ist. Das für *linc01116* kodierende Gen liegt divergent zu dem für *linc01117* auf Chromosom 2q31.1; die lncRNA hat eine Größe von 838 Basen und ist bislang in der Literatur noch nicht näher beschrieben.

In Vorexperimenten wurde die höchste Expression in der UC-Zelllinie T24 gemessen. Somit diente diese Zelllinie als Standard für die Messungen.

Die Auswertung der qRT-PCR ergab keine signifikanten Expressionsunterschiede von *linc01116* zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe, bei insgesamt recht starker Variation. Demgegenüber ergab der Datensatz der *TANRIC* Datenbank eine signifikante Expressionserhöhung ($p < 0.001$) im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe bei gleichfalls starker Variation (s. Abb 9.1a und 9.1b). Die Ergebnisse sind somit diskrepant

zueinander. Ebenfalls auffällig ist die extrem hohe Streuung der Werte in beiden Datensätzen im Vergleich zu anderen gemessenen lncRNAs.

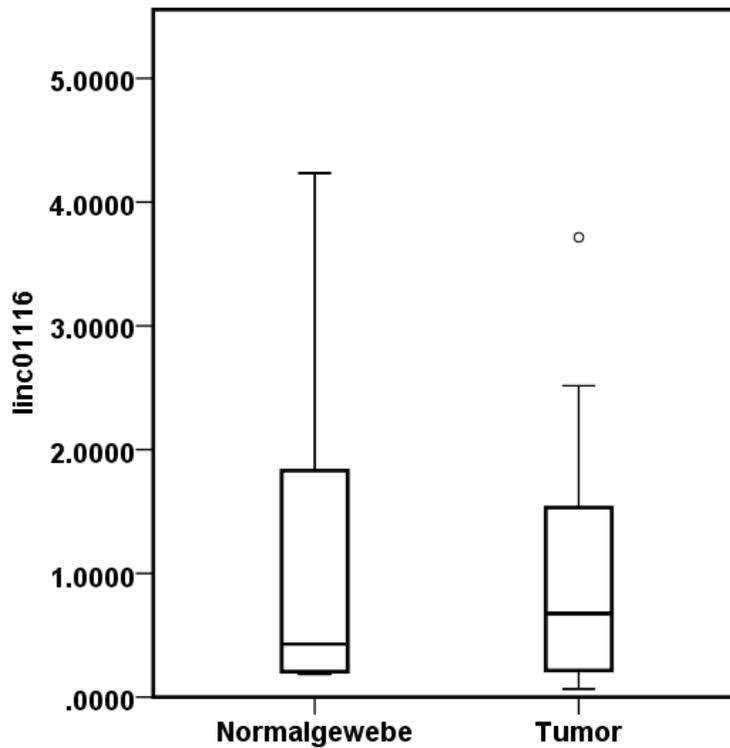


Abb. 10.1a: Relative linc01116 Expression in Tumor- und Normalgewebe laut qPCR: Die relative Expression der lncRNA linc01116 wurde mittels qRT-PCR in 49 Tumorgewebeproben und 20 Normalproben bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt; es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe.

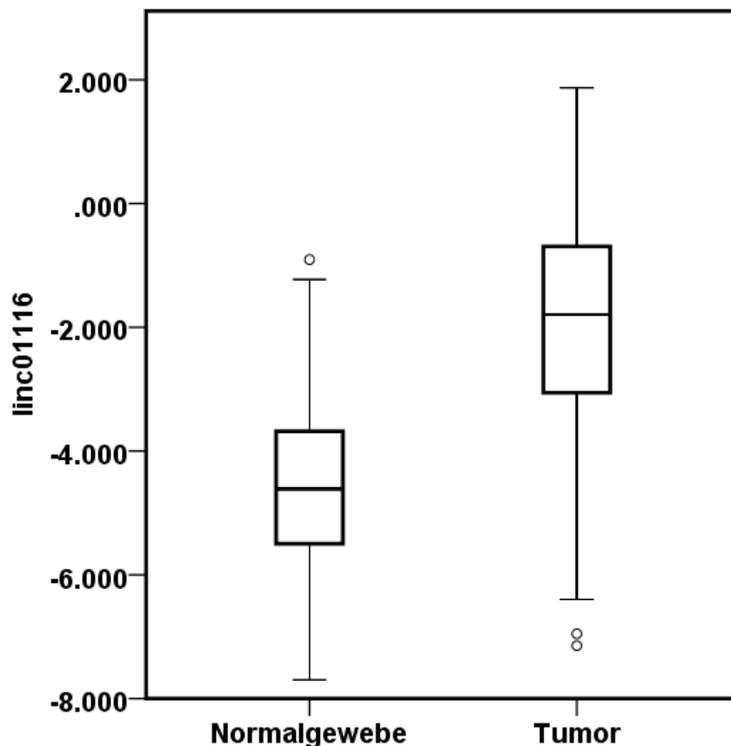


Abb. 10.1b: relative linc01116 Expression in Tumor- und Normalgewebe basierend auf Daten der TANRIC-Datenbank: Als Vergleich zu den eigenen Messungen wurde die relative Expression der lincRNA linc01116 aus RNA-Seq-Messungen in 426 Tumorgeweben und 42 Normalgeweben der TCGA-Daten bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p < 0.001$).

Insgesamt ergab sich bei fünf der gemessenen lincRNAs in beiden Datensätzen ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe. Eine signifikante Expressionssteigerung im Tumorgewebe wurden für CASC9, HOXB-AS3 und HOTAIR gemessen. Signifikante Expressionsminderungen im Tumorgewebe wurden für NKX-2-1-AS1 und TINCR beobachtet.

3.3 Korrelationen mit klinischen Parametern

Ein wichtiges Kriterium für weitergehende Experimente ist zu wissen, inwiefern die gemessenen Expressionsveränderungen von lincRNAs mit klinischen Parametern assoziiert sind.

Zur Auswertung der Messergebnisse wurden verschiedene klinische Parameter gewählt, die in Tabelle 19 (s. 2.9.1) nachvollzogen werden können. Zur Analyse wurden alle lincRNAs ausgewählt, die eine signifikante Veränderung zwischen Tumor- und Normalgewebe aufwiesen. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 23 zusammengestellt.

Tabelle 23: Korrelation der qPCR Messungen mit klinischen Patientenparametern(p= P-Wert, n= Anzahl der Proben, S=Streubereich)

Variablen	CASC9		HOXB-AS3		HOTAIR		TINCR		
	n	Median (S)	p	Median (S)	p	Median (S)	p	Median (S)	p
Alter ≤65	17	0.005 (0.0-0.320)	0,02	0.032 (0.005-0.130)	0.082	0.010 (0.0-0.092)	0.105	0.714 (0.118-1.458)	0.02
Alter >65	15	0.074 (0.0-0.557)		0.082 (0.001-5.875)		0.021 (0.001-0.914)		1.099 (0.229-11.988)	
weiblich	17	0.004 (0.0-0.447)	0,99	0.032 (0.0-7.00)	0.727	0.010 (0.0-0.214)	0.952	1.086 (0.229-3.814)	0.933
männlich	27	0.005 (0.0-0.557)		0.035 (0.0-5.875)		0.008 (0.0-0.14)		1.003 (0.118-11.988)	
T Stadium pT1	6	0.079 (0.0-0.284)		0.103 (0.003-0.951)		0.038 (0.001-0.235)		1.424 (0.475-3.466)	
T Stadium pT2	13	0.037 (0.001-0.557)		0.051 (0.001-5.875)		0.010 (0.0-0.914)		0.714 (0.118-11.988)	
T Stadium pT3	6	0.006 (0.0-0.045)		0.045 (0.01-0.130)		0.011 (0.003-0.046)		0.706 (0.387-2.018)	
T Stadium pT4	7	0.023 (0.0-0.255)		0.027 (0.004-0.366)		0.011 (0.002-0.122)		1.003 (0.286-1.739)	
T Stadium ≤ pT2	19	0.062 (0.0-0.557)	0.041	0.072 (0.001-5.875)	0.17	0.016 (0.0-0.914)	0.705	1.086 (0.118-11.988)	0.88
T Stadium > pT2	13	0.008 (0.0-0.255)		0.032 (0.004-0.366)		0.011 (0.002-0.122)		0.909 (0.286-2.018)	
Lymphknoten pos	17	0.024 (0.0-0.557)	0.769	0.044 (0.001-5.875)	0.922	0.010 (0.0-0.914)	0.83	0.909 (0.118-11.988)	0.922
Lymphknoten neg	14	0.030 (0.0-0.320)		0.048 (0.003-0.449)		0.013 (0.0-0.214)		1.045 (0.229-3.169)	
HPV pos	6	0.006 (0.0-0.255)	0.139	0.018 (0.001-0.046)	0.011	0.004 (0.0-0.021)	0.023	0.535 (0.118-2.018)	0.139
HPV neg	20	0.053 (0.0-0.557)		0.064 (0.012-5.875)		0.014 (0.0-0.914)		1.088 (0.219-11.988)	
tot	3								
lebend	29								
Tumor	32	0.030 (0.0-0.557)	0.001	0.045 (0.001-5.875)	0.006	0.011 (0.0-0.914)	0,001	0.974 (0.118-11.988)	0,062
Normalgewebe	12	0.0 (0.0-0.004)		0.008 (0.0-7.002)		0.0 (0.0-0.011)		1.49 (0.921-3.814)	

*In 6 Fällen gab es keine Angabe zum HPV-Status und in einem Fall gab es keine Angaben zum Lymphknotenstatus der Tumorpatienten.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte CASC9 Expression vor allem bei Patienten unter 65 Jahren in Tumoren mit einem Stadium pT <2 zu finden ist.

Zur Auswertung des Gesamtüberlebens bzw. des Krankheitsspezifischen Überlebens wurde eine univariate Cox-Analyse sowie eine Kaplan-Meier log rank-Analyse anhand von Follow-up Daten durchgeführt. Anhand dieser Auswertungen lässt sich sagen, dass Patienten mit einer hohen CASC9 Expression im Tumorgewebe weniger lange überleben als solche mit niedrig exprimiertem CASC9. Im ersten halben Jahr nach Diagnosestellung unterscheiden sich die Überlebensraten nur wenig, wohingegen man nach einem Jahr schon deutliche Unterschiede feststellen kann, die sich im weiteren zeitlichen Verlauf noch vergrößern.

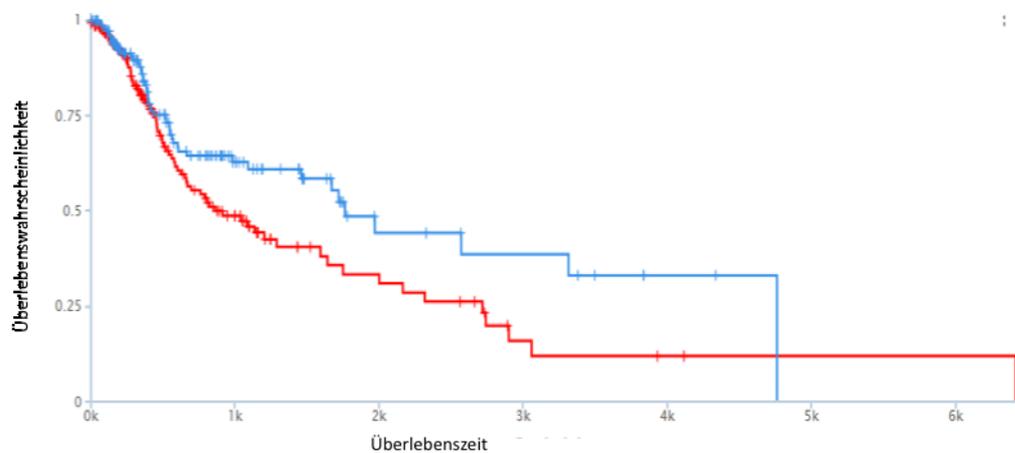


Abb. 11: Einfluss der CASC9-Expression auf das Gesamtüberleben der Patienten: Die Kaplan-Meier-Kurven für Tumorstadien, die eine signifikante Assoziation der lncRNA-Expression mit dem Gesamtüberleben der Patienten aufweisen, wurde der *TANRIC*-Datenbank entnommen. Die Patienten wurden anhand der medianen lncRNA-Expression in Gruppen mit hoher und niedriger Expression eingeteilt. Eine hohe CASC9-Expression ist durch den blauen Graphen dargestellt; eine niedrige CASC9-Expression ist im roten Graphen ersichtlich. Der p-Wert ($p=0.010$) ist für Cox-Regressionsanalysen angegeben, die Überlebenszeit in Tagen (cox $p=0.010$; log Rank $p=0.025$).

3.4 Messung signifikant veränderter lncRNAs in unabhängigen Gewebeproben von Kopf und Hals

Zur Validierung der gemessenen lncRNA Expression wurde folgend in einer weiteren Serie von unabhängigen Gewebeproben (s. 2.1.2) die Messung signifikanter lncRNAs vorgenommen. Dabei wurden im ersten Schritt *SDHA* und *GAPDH* als unabhängige Referenzgene gemessen, bevor die Messung von *CASC9*, *HOTAIR* und *HOXB-AS3* erfolgte. Für die Messungen standen insgesamt 152 Proben zur Verfügung. Nach Messung der Housekeepinggene *SDHA* und *GAPDH* verringerte sich die Probenanzahl auf 133, bestehend aus 73 Tumor- und 60 Normalproben. Die für die weiteren Messungen aussortierten Proben wiesen allesamt eine sehr geringe *SDHA/GAPDH* Expression auf, sodass sie für die Messungen ungeeignet waren. Diese Proben wiesen auch eine sehr niedrige RNA-Konzentration auf, was die fehlende *SDHA* und *GAPDH* Expression erklären kann. Die genaue Zusammensetzung des Probensets kann im Material und Methodenteil dieser Arbeit nachgelesen werden (s. Tab. 2).

CASC9 ist nach den qRT-PCR Messungen in dieser Serie im Tumorgewebe signifikant stärker exprimiert ($p < 0.001$) im Vergleich zum Normalgewebe (s. Abb. 12). Somit konnte die Validierungsmessung die Ergebnisse aus den ersten Messungen bestätigen. Auffällig in dieser Messung ist der große Streubereich, was an der größeren Probenanzahl liegen könnte.

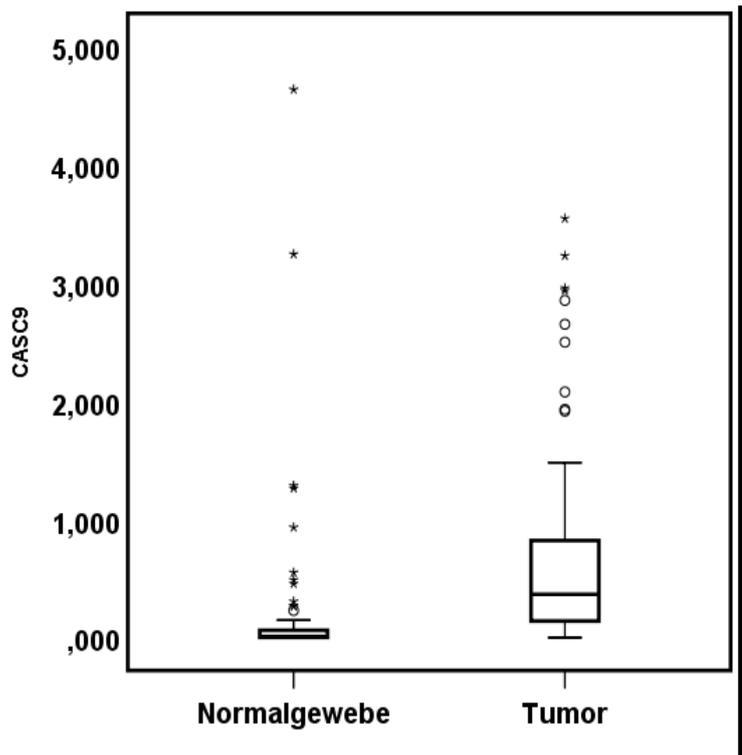


Abb. 12: Relative CASC9 Expression in einem zweiten Gewebeset von Kopf-Halsproben: Die relative Expression der lncRNA CASC9 wurde mittels qRT-PCR in 73 Tumorgewebeproben und 60 Normalproben bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p < 0.001$).

HOTAIR ist nach den qRT-PCR Messungen in dieser Gewebeserie im Tumorgewebe signifikant stärker exprimiert ($p < 0.001$) im Vergleich zum Normalgewebe (s. Abb. 13). Im Vergleich mit den ersten Messungen fällt eine insgesamt höhere Expression von HOTAIR im Tumor wie im Normalgewebe auf. Dennoch konnte die Validierungsmessung die Ergebnisse aus den ersten Messungen bestätigen. Auffällig in dieser Messung ist der große Streubereich, was wiederum an der größeren Probenanzahl liegen könnte.

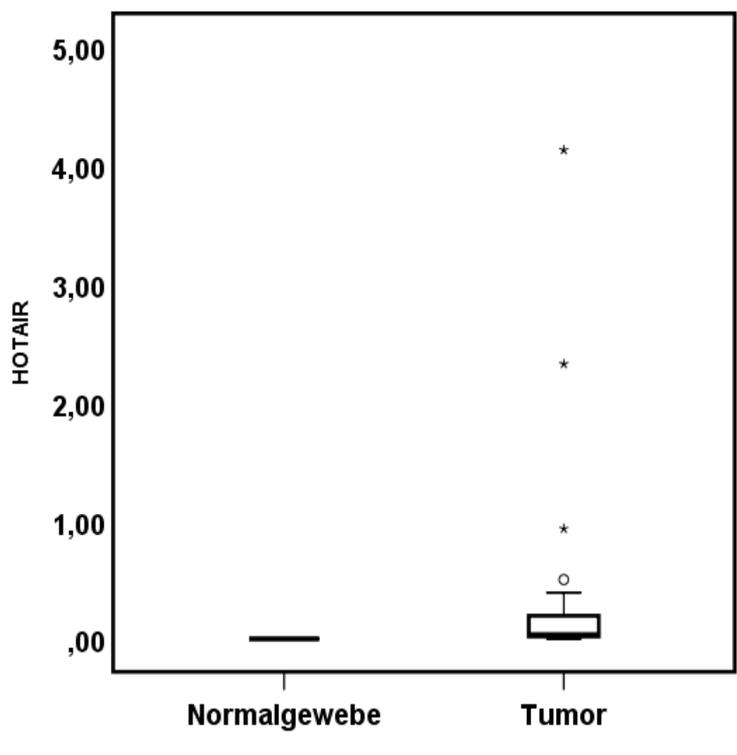


Abb. 13: Relative HOTAIR Expression in einem zweiten Gewebeset von Kopf-Halsproben: Die relative Expression der lncRNA HOTAIR wurden mittels qRT-PCR in 73 Tumorgewebeproben und 60 Normalproben bestimmt. In der Grafik nicht dargestellt sind drei Outlier: Für zwei Tumorproben und eine Normalprobe wurde ein stark abweichendes Ergebnis erhalten, nämlich eine weitaus höhere Expression von HOTAIR im Vergleich zu allen anderen Proben. Dieses Ergebnis ist aber bei der statistischen Auswertung berücksichtigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p < 0.001$).

Für HOXB-AS3 konnten die Messergebnisse aus dem ersten in einem zweiten Gewebeset nicht bestätigt werden. Nach diesen qRT-PCR Messungen ist HOXB-AS3 im Tumorgewebe nicht signifikant höher exprimiert als im Normalgewebe (s. Abb. 14).

HOXB-AS3

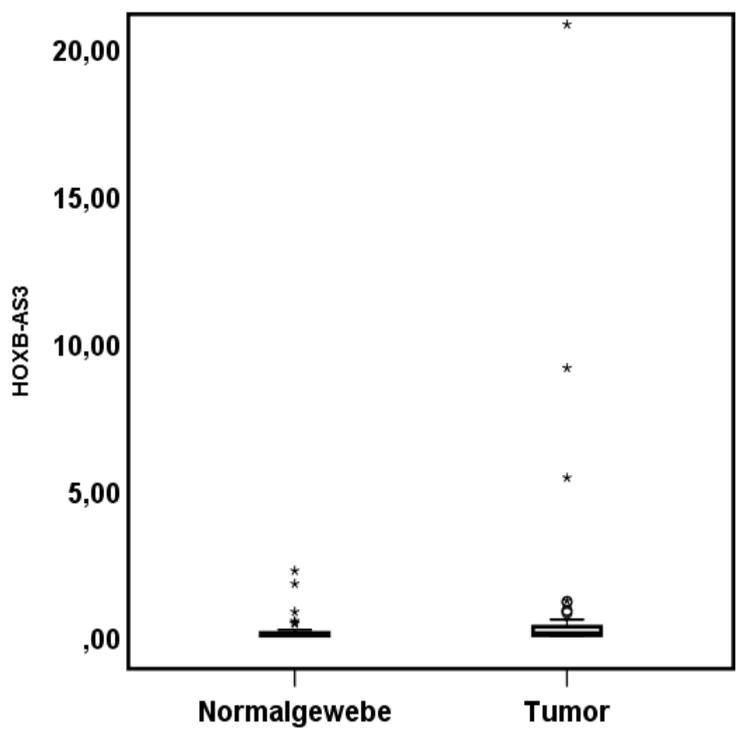


Abb. 14: Relative HOXB-AS3 Expression in einem zweiten Gewebeset von Kopf-Halsproben: Die relative Expression der lncRNA HOXB-AS3 wurde mittels qRT-PCR in 55 Tumorgewebeproben und 36 Normalproben bestimmt. In der Grafik sind drei Outlier nicht dargestellt: Für zwei Tumورproben und eine Normalprobe wurde ein stark abweichendes Ergebnis erhalten, nämlich eine weitaus höhere Expression von HOXB-AS3 im Vergleich zu allen anderen Proben. Dieses Ergebnis ist aber bei der statistischen Auswertung berücksichtigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt; es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe.

Abschließend lässt sich somit sagen, dass die Messungen in einem zweiten, unabhängigen Gewebeset die signifikanten Expressionsunterschiede bei CASC9 und HOTAIR unterstützen. Die Messung von HOXB-AS3 ergab keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Tumor und Normalgewebe.

3.5 CASC9 Messung in Gewebeproben im Vergleich von Primärtumor und Lymphknotenmetastase

Eine weitere Messung von CASC9 erfolgte in Gewebeproben der Chirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf. Die genaue Probenzusammensetzung kann im Material- und Methodenteil nachvollzogen werden (s. Tab. 3). Das Besondere an diesem Probenset war dabei die Möglichkeit, die Expression zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase zu der mit nicht befallenen Lymphknoten zu vergleichen. So konnte untersucht werden- ob und wenn ja- wie stark sich die CASC9 Expression in den unterschiedlichen Proben eines Patienten unterscheiden.

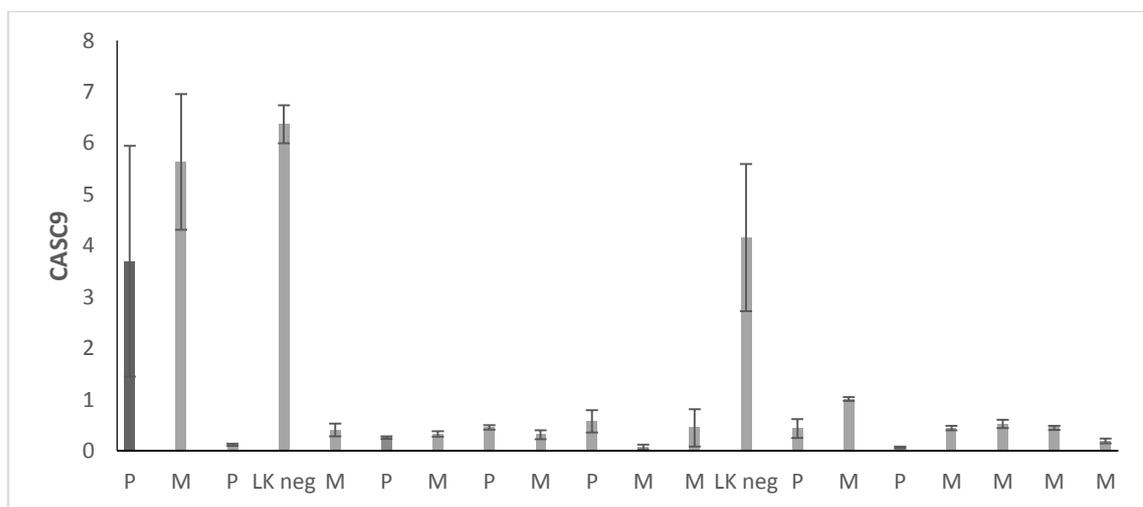


Abb. 15: Relative CASC9 Expression in Gewebeproben der chirurgischen Klinik: Die relative Expression von CASC9 wurde in einer Serie aus Gewebeproben gemessen. Dabei ist P= Primärtumor, M= zugehörige Metastase und LK neg= negativer Lymphknoten aus dem Operationsgebiet. Jeweils von links nach rechts folgend P&M, sowie P& M& LK neg gehören zusammen. Jeder Primärtumor stammt aus einem anderen Patienten.

Die Messungen ergaben keine einheitlichen Tendenzen für die Expression von CASC9 im Primärtumor gegenüber Metastase. Insgesamt ist die CASC9 Expression über alle Proben gemittelt gering. In den vorherigen CASC9 Messungen in anderen Gewebesets zeigte sich CASC9 zwar im Tumor erhöht bei insgesamt schwacher Ausprägung. Einzelne Ausreißer nach oben sind auch hier zu finden. Anhand dieser Proben sollte die Expression im Tumor im Vergleich zur Metastase gemessen werden. Die hohen Werte sind in einer Metastase sowie in den negativen Lymphknoten zu finden.

Anhand der Expressionsmessungen in den verschiedenen Gewebesets wird ersichtlich, dass CASC9 über mehrere Versuche hindurch stabil in Tumoren überexprimiert wird.

Um herauszufinden, ob die Überexpression von CASC9, HOXB-AS3 und HOTAIR im Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals als Diagnosekriterium geeignet sein könnte, wurde daher eine ROC-Analyse (*Receiver-Operating-Kurven-Analyse*), auch Grenzwertoptimierungskurve genannt, durchgeführt. Die Expressionswerte stammen dabei aus der *TCGA*-Kohorte, die über die *TANRIC*-Datenbank abgefragt wurden. Dabei sollte überprüft werden, ob die jeweilige lncRNA eine spezifische Expression im Tumor aufweist. Die *Area Under the Curve* (AUC) beträgt für CASC9 0,851, für HOXB-AS3 0,727 und für HOTAIR 0,786.

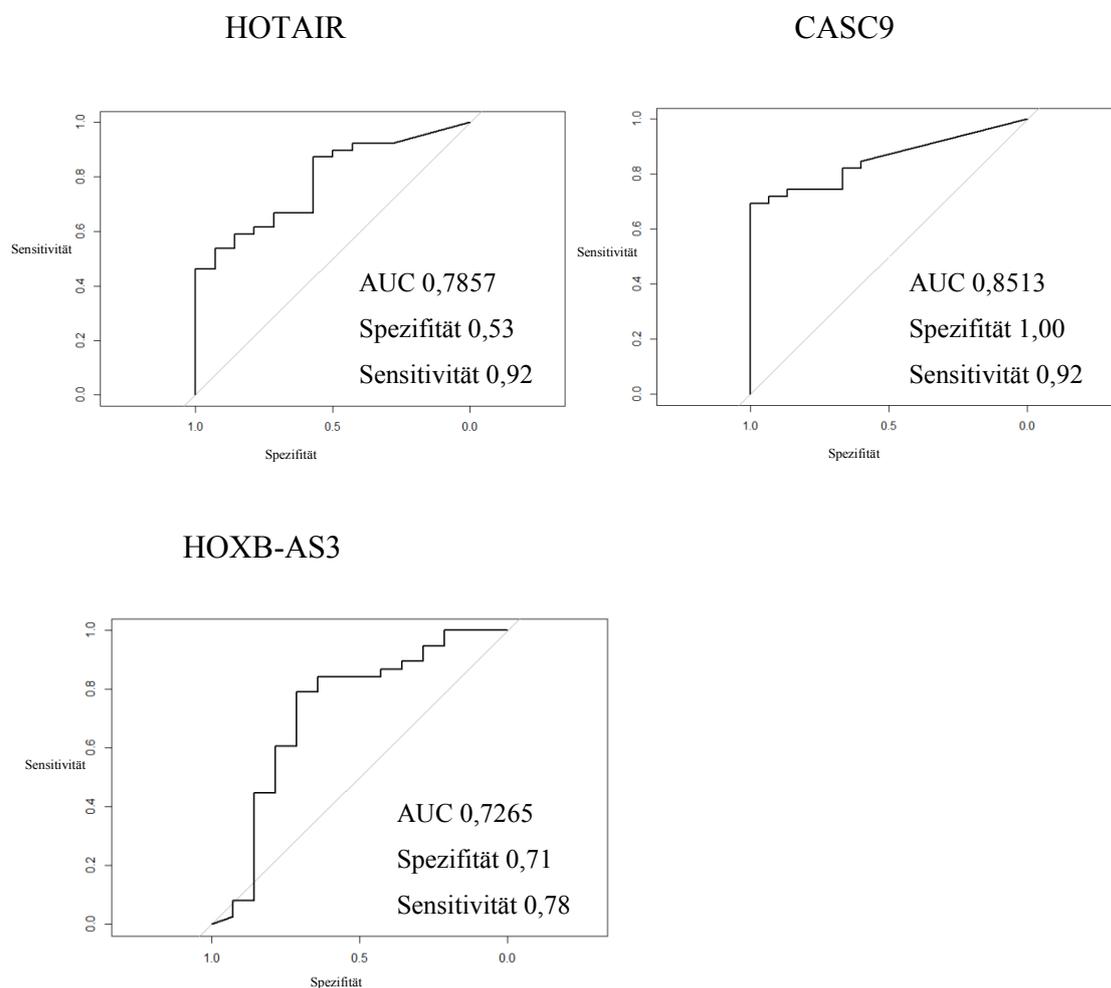


Abb. 16: Eignung der CASC9, HOXB-AS3 bzw. HOTAIR -Expression als diagnostische Biomarker im Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals. Es werden ROC-Kurven-Analysen für die Expression von CASC9, HOXB-AS3 bzw. HOTAIR aus den RNA-Sequenzierungsdaten der *TCGA*-Kohorte für das HNSCC zur Unterscheidung von Tumor- und Normalgewebe durchgeführt. Angegeben ist jeweils die *Area under the Curve* (AUC). Angegeben ist zudem die jeweilige Spezifität und Sensitivität.

ROC- Kurven nahe der eingezeichneten Diagonalen bedeuten, dass die Ergebnisse zufälliger Natur sind. Die AUC beträgt in dem Fall nahe 0,5. Je näher die AUC an 1 liegt, desto aussagekräftiger sind die Ergebnisse. Die ideale ROC-Kurve steigt zunächst senkrecht an. Man hat am Anfang nur Richtig-Positive, während die Quote der Falsch-Positiven noch Null ist; erst bei niedrigeren Cut-Off-Werten steigt die Rate der Falsch-Positiven an. Wie man in Abbildung 15 erkennen kann, zeigt keine der drei lncRNAs eine ROC-Kurve nahe der Diagonalen. Vor allem HOTAIR und CASC9 steigen zunächst nahezu senkrecht an, was bedeutet, dass viele richtig-positive Ergebnisse detektiert werden und die Werte nicht zufällig zu Stande kommen. CASC9 ergibt entsprechend die höchste Sensitivität mit 0,92 und eine perfekte Spezifität von 1. Somit ist es offensichtlich, dass vor allem CASC9 als Biomarker im *HNSCC* geeignet ist.

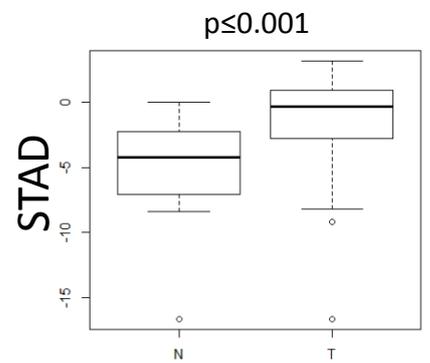
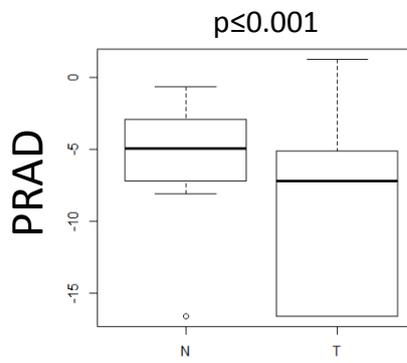
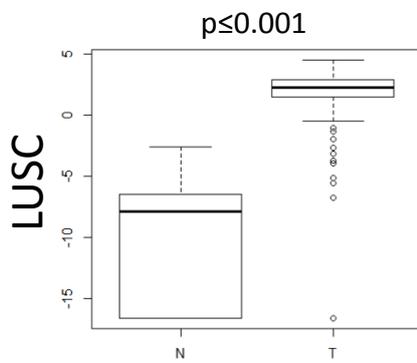
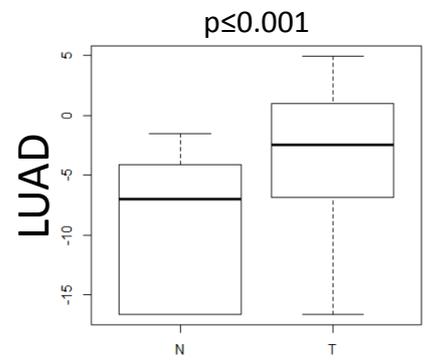
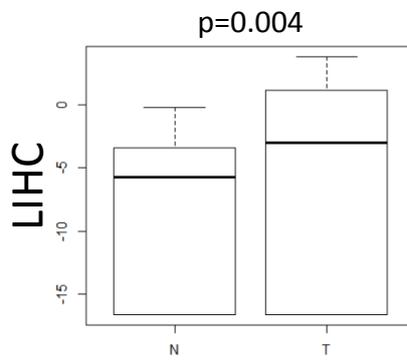
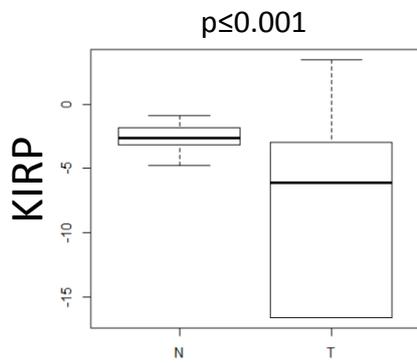
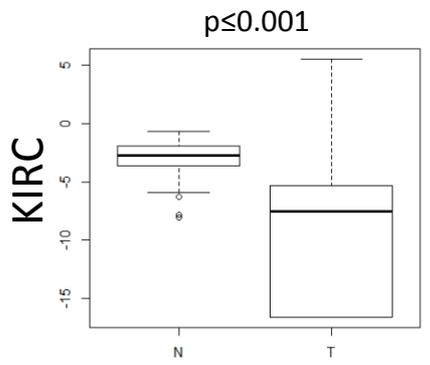
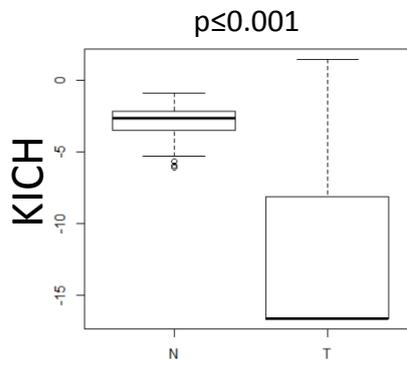
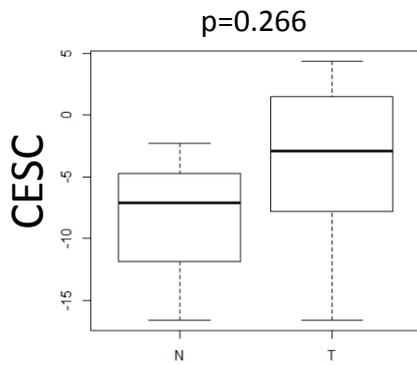
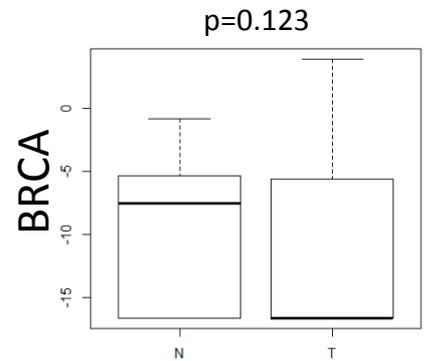
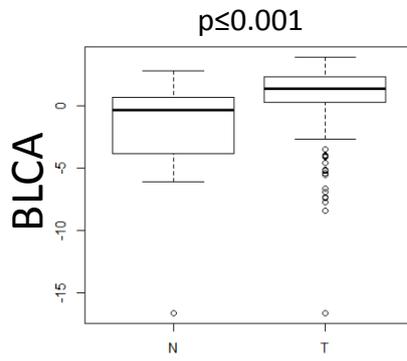
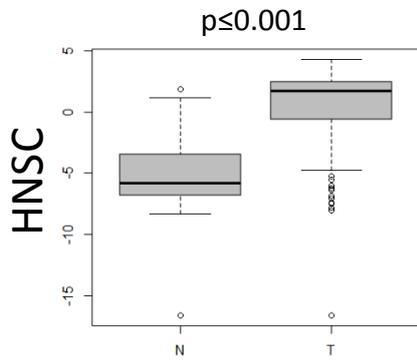
3.6 CASC9 in weiteren Tumorentitäten

Zur Klärung der Fragestellung ob CASC9 in weiteren Tumorentitäten differentiell exprimiert wird, erfolgte eine Auswertung von *CASC9* Messdaten des *TCGA*-Konsortiums aus verschiedenen Tumorentitäten. Die Datensets entstammen dabei der *TANRIC* Datenbank und es wurden jeweils Tumor- und Normalproben gegenübergestellt. Die untersuchten Tumorentitäten sind in Tabelle 24 zusammengestellt.

Tabelle 24: Übersicht über die Tumorentitäten, die für die pan-Cancer-Analyse für die CASC9 Expression herangezogen werden: Angegeben ist jeweils die Anzahl an Normalgewebsproben (N) und Tumorproben (T).

Abkürzung	Tumorentität	N	T
BLCA	Bladder Urothelial Carcinoma	19	252
HNSC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	42	426
BRCA	Breast Invasive Carcinoma	105	837
CESC	Cervical Squamous Cell Carcinoma and Endocervical Adenocarcinoma	3	196
KICH	Kidney Chromophobe	25	66
KIRC	Kidney renal clear cell carcinoma	67	448
KIRP	Kidney renal papillary cell carcinoma	30	198
LIHC	Liver hepatocellular carcinoma	50	200
LUAD	Lung Adenocarcinoma	58	488
LUSC	Lung Squamous cell carcinoma	17	220
PRAD	Prostate Adenocarcinoma	52	374
STAD	Stomach Adenocarcinoma	33	285
THCA	Thyroid Carcinoma	59	497
UCEC	Uterine Corpus endometroid carcinoma	4	316

Die Auswertung der Messwerte ist in Abb. 17 ersichtlich.



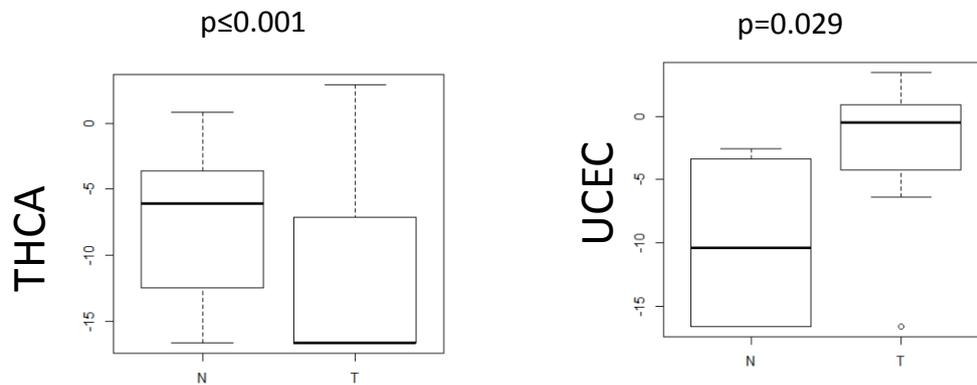


Abb. 17: Relative CASC9 Expression in weiteren Tumorentitäten basierend auf Daten der *TANRIC*-Datenbank: Um die relative CASC9-Expression in verschiedenen Tumorentitäten vergleichen zu können, wurden RNA-Seq-Daten, angegeben als Logarithmus der *reads per million mapped reads* (RPMK), aus der *TCGA*-Kohorte über die *TANRIC*-Datenbank abgerufen.

Dabei fand sich eine Überexpression von CASC9 in sieben Tumorentitäten und eine verminderte Expression in fünf. Anhand der Auswertung wird ersichtlich, dass auch in Plattenepithelkarzinomen anderer Gewebe die CASC9 Expression im Tumor höher ist als im Normalgewebe. Das könnte bedeuten, dass CASC9 nicht nur als Biomarker für *HNSCC*, sondern für verschiedene Plattenepithelkarzinome dienen könnte. Die Expression von CASC9 ist aber auch in einigen anderen Tumorarten, wie dem Hepatozellulären Karzinom oder Adenokarzinomen von Lunge und Magen, deutlich und signifikant erhöht.

3.7 Messung signifikant veränderter lncRNAs in Zelllinien aus *HNSCC*

Da für TINCR und HOTAIR bereits Daten zur Funktion vorliegen, wurde bei diesen beiden lncRNAs von einer weiterführenden funktionellen Charakterisierung abgesehen. Als Voraussetzung für eine weitere funktionelle Charakterisierung der bisher wenig oder nicht erforschten lncRNAs CASC9 und HOXB-AS3 wurde daher die Expression dieser lncRNAs in Zelllinien aus *HNSCC* gemessen, um geeignete Zelllinien für weiterführende Experimente auswählen zu können. Die verwendeten Zelllinien werden in Tabelle 4 (s. 2.1.4) näher beschrieben.

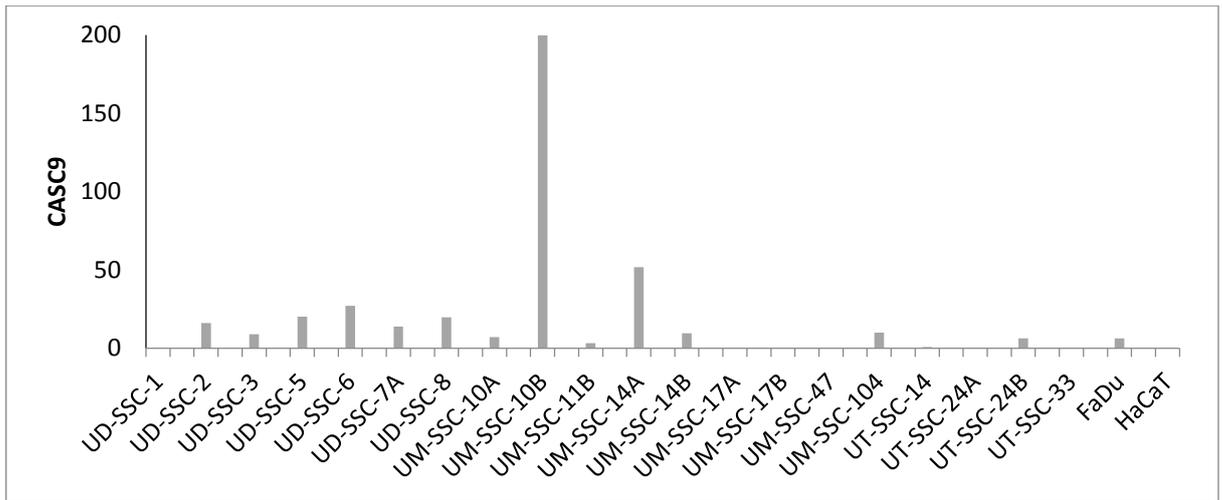


Abb. 18: Relative CASC9 Expression in Zelllinien von Kopf und Hals: Die relative Expression der lncRNA CASC9 wurde in einem Panel aus 22 Plattenepithelkarzinomzellen aus Kopf-Hals-Tumoren inklusive FaDu und HaCaT als Kontrollzelllinien gemessen.

Eine besonders starke Expression von CASC9 ist in den Zelllinien UM-SSC-10B und UM-SSC-14A zu finden; in einigen anderen *HNSCC*- Zelllinien war die Expression dagegen ähnlich niedrig wie in der Kontrollzelllinie HaCaT.

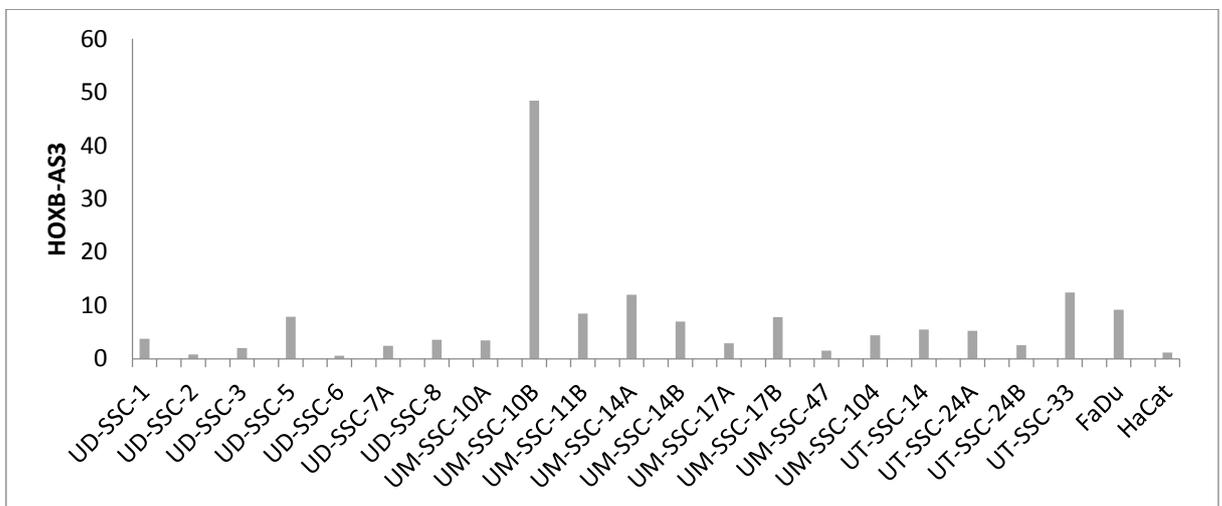


Abb. 19: Relative HOXB-AS3 Expression in Zelllinien von Kopf und Hals: Die relative Expression der lncRNA HOXB-AS3 wurde in einem Panel aus 22 Plattenepithelkarzinomzellen aus Kopf-Hals-Tumoren inklusive FaDu und HaCaT als Kontrollzelllinien gemessen.

Eine besonders starke Expression von HOXB-AS3 ist in den Zelllinien UM-SSC-10B und UM-SSC-14A zu finden.

Diese Expressionsmessung diente dabei als Grundlage für weitere Versuche.

Der weitere Verlauf der Arbeit basiert somit auf den folgenden Ansätzen:

1. shRNA-vermittelter Knockdown von CASC9 in UM-SSC-14A mit besonders hoher CASC9 Expression
2. Überexpression von CASC9 mittels lentiviraler Transfektion in pMF11bdEGNwo in FaDu und HaCaT mit niedriger bzw. fehlender Expression von CASC9

3.8 Funktionelle Experimente

3.8.1 *shRNA-vermittelter Knockdown von CASC9 in UM-SSC-14A*

Der shRNA-vermittelte Knockdown von CASC9 in UM-SSC-14A diente der Untersuchung der Funktion von CASC9 in einer HNSCC-Zelllinie.

Dafür wurden die Zellen stabil mit einem lentiviralen Konstrukt transduziert, das zur Expression einer shRNA gegen CASC9 führt. Zur Kontrolle wurde ein anderer Teil der Zellen mit einem Konstrukt mit einer Kontroll shRNA transduziert, die keine zellulären RNAs erkennt. Die Effektivität der shRNA wurde mit Hilfe einer qRT-PCR in Abhängigkeit von TBP überprüft. Das Ergebnis des Knockdowns ist der Abbildung 20 zu entnehmen.

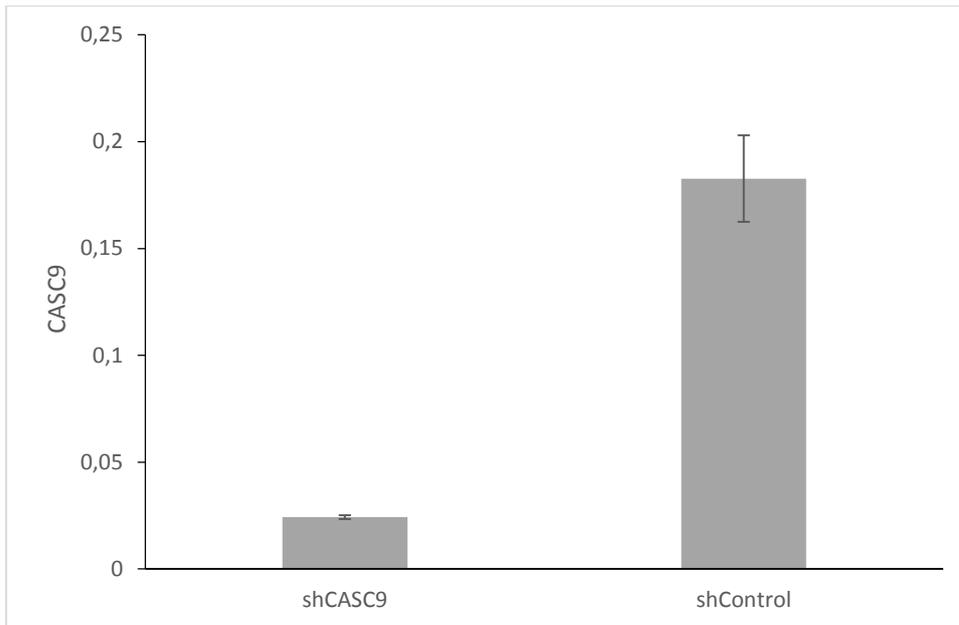


Abb. 20: Knockdown-Effizienz in UM-SCC-14A: Die relative CASC9-Expression wurde in mit shRNA behandelten Zellen der Zelllinie UM-SCC-14A gemessen. Pro Bedingung wurden jeweils vier Versuchsansätze hergestellt. Zur Kontrolle der erzielten Ergebnisse wurden die Knockdown-Versuche jeweils drei Mal durchgeführt. Die Standardabweichung für shControl liegt bei 0,036 und für shCASC9 bei 0,025.

Anhand dieser Daten lässt sich sagen, dass der shRNA vermittelte Knockdown von CASC9 in UM-SCC-14A erfolgreich verlaufen ist (Abnahme um $\cong 87\%$) und weitere funktionelle Experimente mit diesen Zellen sinnvoll sind.

3.8.1.1 *Bestimmung der relativen Zellviabilität nach Transduktion von shCASC9 und shControl in UM-SCC-14A*

In einem weiterführenden Experiment wurde die metabolische Aktivität, als Maß der Zellvermehrung, der mit shRNA gegen CASC9 transduzierten UM-SCC-14A *HNSCC* Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. Dafür wurde der MTT-Assay zu vier verschiedenen Zeitpunkten jeweils im Abstand von 24 h durchgeführt; der erste Messpunkt war 24 h nach Aussäen und die letzte Messung erfolgte 96 h nach dem Aussäen der Zellen.

Die Messergebnisse können der Abbildung 21 entnommen werden.

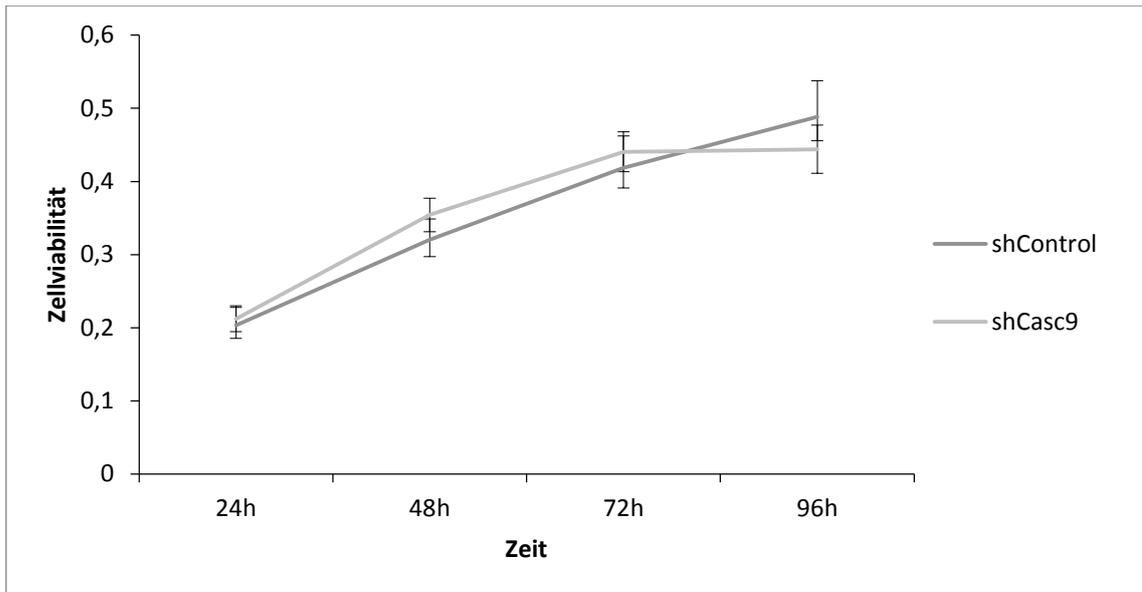


Abb. 21: Relative Zellviabilität nach Behandlung mit shCASC9 in UM-SCC-14A: In der Kopf-Hals-Zelllinie UM-SCC-14A wurde ein shRNA vermittelter Knockdown von CASC9 (shCasc9) durchgeführt oder die Zellen mit Kontroll-shRNA (shControl) transduziert. Mittels MTT-Assay wurde die relative Zellviabilität nach 24, 48, 72 und 96 h bestimmt.

Anhand dieser Graphik wird deutlich, dass mit shRNA behandelte Zellen sich in ihrer metabolischen Aktivität kaum von Kontrollzellen unterscheiden. Auch in den Wiederholungen des Experiments wurde kein anderes Ergebnis erzielt. Die o.g. Graphik enthält die gemittelten Werte aus allen drei Versuchen.

3.8.1.2 *Bestimmung der Migrationsfähigkeit von shCASC9-behandelten UM-SCC-14A Zellen*

Im nächsten Schritt wurden die mit shRNA gegen CASC9 behandelten Zellen auf ihre Migrationsfähigkeit untersucht. Erhöhte Migration wird dabei als eine Eigenschaft aggressiver Tumoren angesehen.

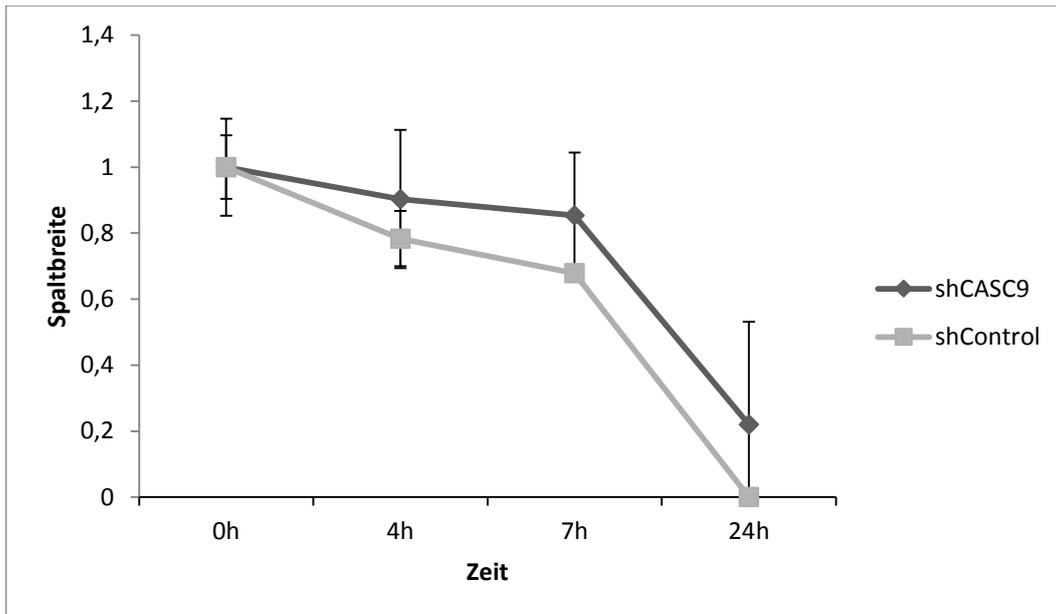


Abb. 22: Migrationsfähigkeit von UM-SCC-14A Zellen nach shRNA Knockdown von CASC9: Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit von mit shRNA gegen CASC9 oder shControl-RNA behandelten UM-SCC-14A wurde ein Migrationsassay über 24 h durchgeführt und an verschiedenen Zeitpunkten die relative Spaltbreite bestimmt. Der t-Test ergab zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Behandlungen.

Anhand dieser Grafik lässt sich vermuten, dass die Migrationsfähigkeit von mit shCASC9 behandelten Zellen weniger stark ist als die mit der Kontroll-shRNA. Die shCASC9 Zellen migrieren somit langsamer, der Unterschied ist aber nicht statistisch signifikant. Daraus lässt sich schließen, dass ein Knockdown von CASC9 keinen wesentlichen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen nimmt.

3.8.1.3 *Bestimmung der relativen Zellviabilität von shCASC9-behandelten UM-SCC-14A Zellen nach Cisplatinbehandlung*

Zur Bestimmung der Cisplatinsensitivität erfolgte die Zugabe von Cisplatin in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Zellen, die mit shCASC9 oder shControl transduziert waren. Die Behandlungsdauer lag bei 72 h.

Die IC_{50} Werte lagen bei diesen Versuchen bei 0,56 $\mu\text{g/ml}$ für shControl und 0,7 $\mu\text{g/ml}$ für shCASC9. Somit lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Cisplatinsensitivität zwischen den beiden Zelllinien feststellen. Dieses wird auch im Diagramm ersichtlich. Man erkennt eine schrittweise abnehmende metabolische Aktivität beider Zellvarianten bei steigenden Cisplatinkonzentrationen.

Auch bei weiteren Wiederholungen des Versuchs konnten keine signifikanten Veränderungen zwischen den beiden Ansätzen erzielt werden.

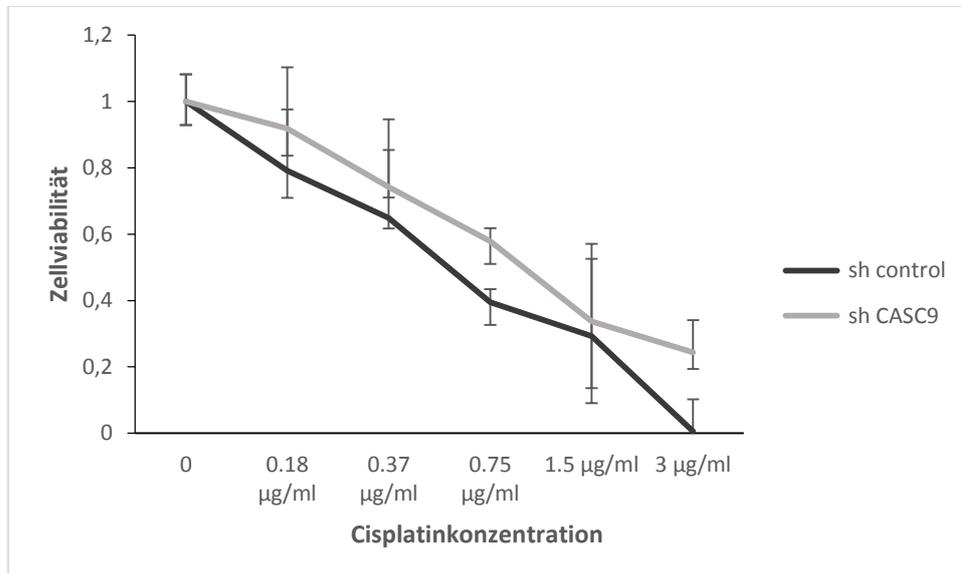


Abb. 23: Relative Zellviabilität von shCASC9 und CASC9 in UM-SCC-14A nach Cisplatinbehandlung: In der Kopf-Hals-Zelllinie UM-SCC-14A wurde ein shRNA vermittelter Knockdown von CASC9 oder eine Behandlung mit Kontroll-shRNA durchgeführt. Mittels MTT-Assay wird die relative Zellviabilität nach Behandlung mit unterschiedlichen Cisplatinkonzentrationen bestimmt. Der t-Test ergab zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungen.

3.8.2 Stabile Überexpression von CASC9 mittels lentiviraler Transduktion

Ein weiterer Ansatz zur funktionellen Charakterisierung von CASC9 stellte die Überexpression mittels lentiviraler Transduktion dar. Die Überexpression diente der Untersuchung der Funktion von CASC9 in der humanen Hypopharynxkarzinomzelllinie FaDu und der nicht tumorigenen Keratinozytenzelllinie HaCaT (*Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes*).

Nach erfolgreicher Vektorherstellung werden die beiden Zelllinien entweder mit einem Leervektor (EGN) oder mit dem CASC9 Vektor (CASC9) transduziert. Die erfolgte Überexpression wurde per qRT-PCR nachgewiesen.

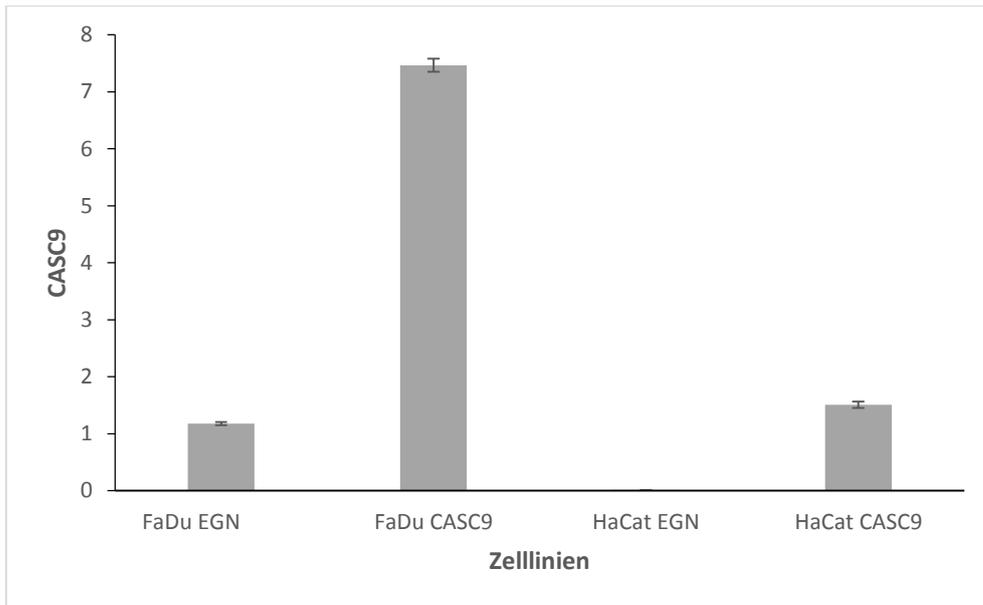


Abb. 24: Stabile Überexpression von CASC9 in FaDu und HaCaT: In den Zelllinien FaDu und HaCaT wurde die lncRNA CASC9 mittels lentiviraler Transduktion stabil überexprimiert. Die relative CASC9 Expression wurde durch qRT-PCR ermittelt. Die Messung erfolgte jeweils im Duplikat.

3.8.2.1 *Bestimmung der relativen Zellviabilität von CASC9 überexprimierenden FaDu und HaCaT Zellen im zeitlichen Verlauf*

Zur funktionellen Charakterisierung von CASC9 in FaDu und HaCaT wurde die metabolische Aktivität als Maß für die Zellviabilität bestimmt. Die Versuche wurden mit unterschiedlichen Zellzahlen durchgeführt, entweder 2000, 4000, 5000 oder 8000 Zellen. Nach insgesamt 96 h konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen mit dem Leervektor EGN oder dem CASC9 Vektor festgestellt werden. Die folgende Abbildung enthält die gemittelten Ergebnisse aus mehreren Versuchen.

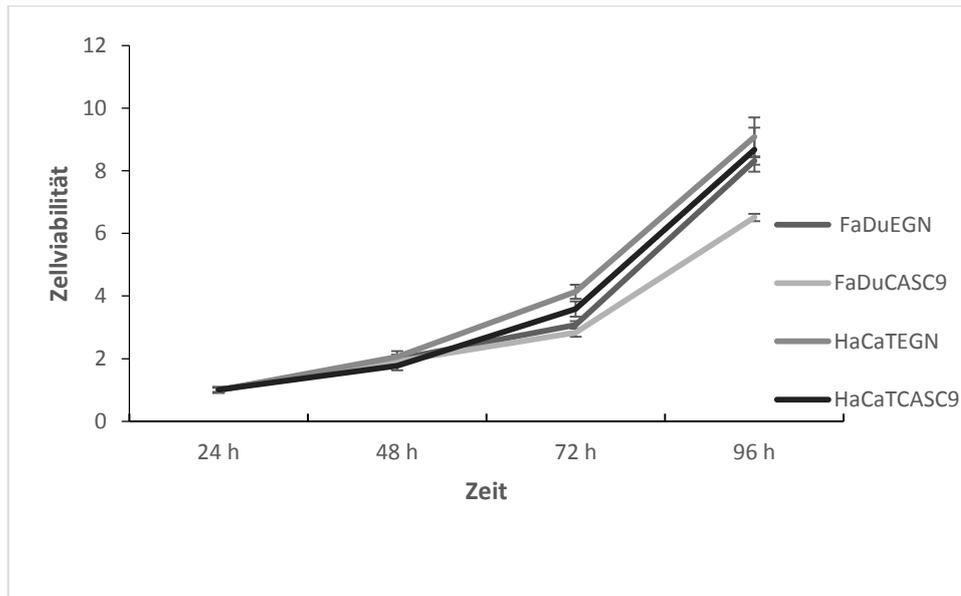


Abb. 25: Relative Zellviabilität von CASC9 überexprimierenden HaCaT und FaDu Zellen: In HaCaT EGN und HaCaT CASC9 sowie in FaDu EGN und FaDu CASC9 wurde mittels MTT-Assay die relative Zellviabilität nach 24, 48, 72 und 96 h bestimmt. Der t-Test ergab zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungen.

Insgesamt lässt sich somit sagen, dass eine Überexpression von CASC9 in den Zelllinien FaDu und HaCaT keinen nennenswerten Einfluss auf die Zellviabilität hat.

3.8.2.2 *Bestimmung der relativen Zellviabilität von CASC9 überexprimierenden FaDu und HaCaT Zellen nach Cisplatinbehandlung*

Zur Bestimmung der relativen Zellviabilität von CASC9 überexprimierenden FaDu und HaCaT erfolgte die Zugabe von Cisplatin in verschiedenen hohen Konzentrationen. Die Bestimmung der Cisplatinsensitivität in HaCaT ergab bis zu einer Cisplatinkonzentration von 0,5 µg/ml keine Änderung der metabolischen Aktivität zwischen den beiden „Subzelllinien“ HaCaT EGN und HaCaT CASC9.

Bei einer höheren Cisplatinkonzentration erkennt man eine lineare Abnahme der metabolischen Aktivität sowohl für mit CASC9 als auch für mit dem Leervektor transduzierte Zellen. Etwas heterogener erscheint das Verhalten in FaDu. Hier lässt sich bereits bei einer Anfangskonzentration von 18 µg/ml Cisplatin eine kontinuierliche Abnahme der metabolischen Aktivität in FaDuEGN und FaDuCASC9 beobachten. Ein

Anfangsplateau wie bei HaCaT lässt sich in dieser Zelllinie nicht erkennen. Allerdings weisen die Messwerte hohe Standardabweichungen auf.

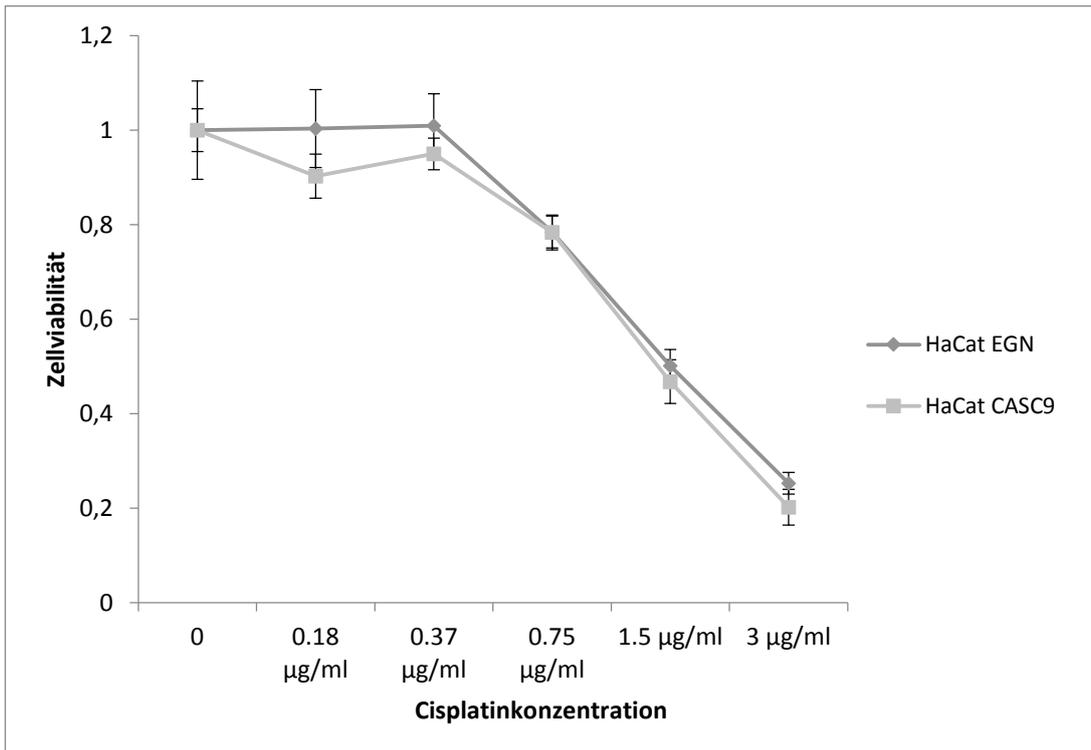


Abb. 26: Relative Zellviabilität von CASC9 überexprimierenden HaCaT Zellen nach Cisplatinbehandlung: Die stabil transfizierten Zelllinien HaCaTEGN und HaCaTCASC9 wurden mit unterschiedlichen Cisplatinkonzentrationen für 72 h behandelt. Mittels MTT-Assay wurde die relative Zellviabilität bestimmt. Der t-Test ergab zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungen.

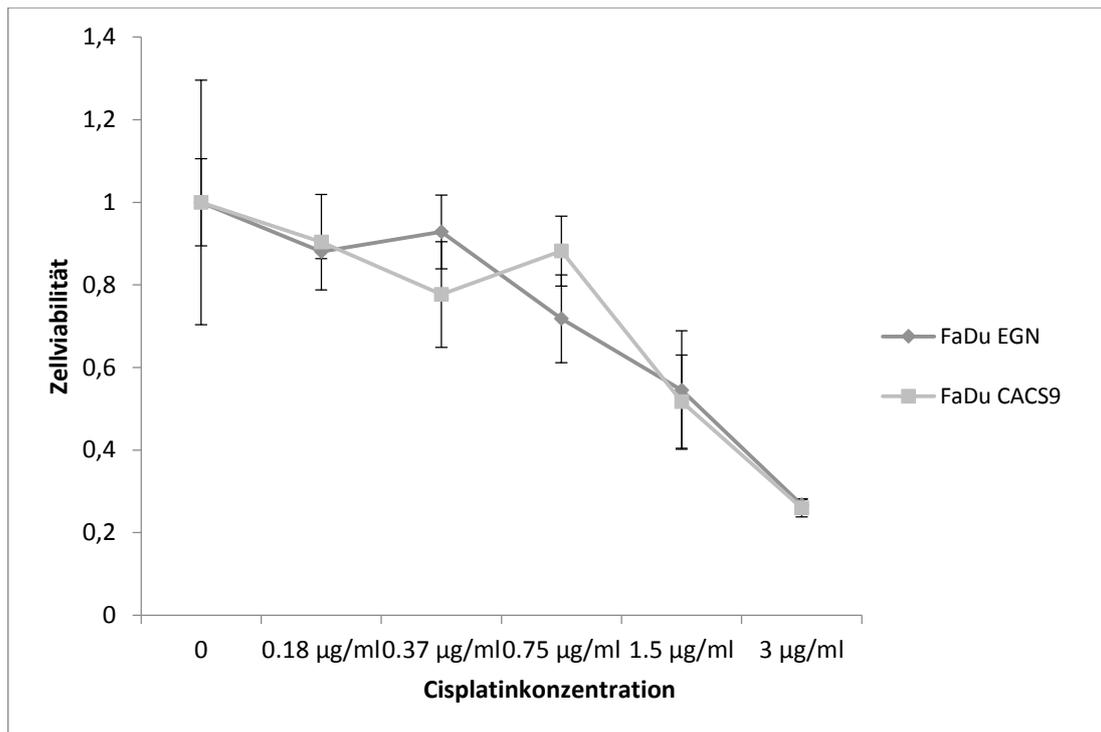


Abb. 27: Relative Zellviabilität von CASC9 überexprimierenden FaDu Zellen nach Cisplatinbehandlung: Die stabil transfizierten Zellen FaDuEGN und FaDuCASC9 wurden mit unterschiedlichen Cisplatinkonzentrationen für 72 h behandelt. Mittels MTT-Assay wurde die relative Zellviabilität bestimmt. Der t-Test ergab zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungen.

3.8.2.3 Fähigkeit zur Koloniebildung von FaDu und HaCaT Zellen nach Überexpression von CASC9

Zur Bestimmung der Koloniebildung in FaDu und HaCaT erfolgten mehrere Klonogenitätsassays. Hierbei wurden die Zellen in unterschiedlichen Anfangszellzahlen (1000, 3000, 5000 Zellen/Well) ausgesät und ihre Fähigkeit zur Koloniebildung bestimmt. Nach neun Tagen erfolgte die Auszählung, deren gemittelte Ergebnisse in nachfolgender Abbildung grafisch dargestellt sind.

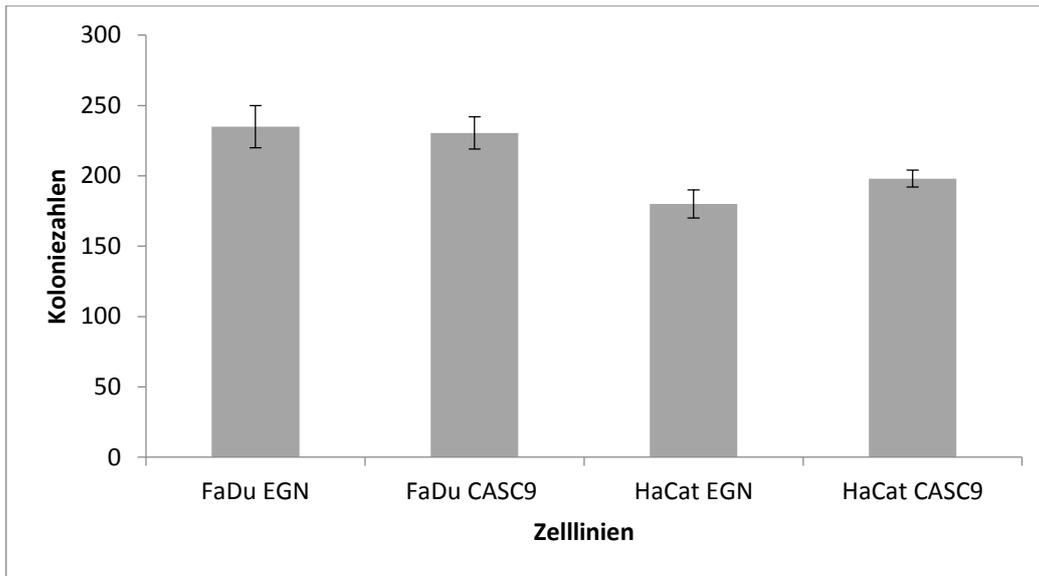


Abb. 28: Koloniebildung von FaDu und HaCaT Zellen nach Überexpression von CASC9: In FaDu und HaCaT Zellen wurde nach stabiler Überexpression von CASC9 im Vergleich zum Leervektor die Fähigkeit zur Koloniebildung gemessen. Die Auszählung der Kolonien erfolgte nach neun Tagen. Der p-Wert wurde mit Hilfe des t-Tests bestimmt und ergab sowohl in FaDu als auch in HaCaT keine signifikanten Unterschiede in den Koloniezahlen.

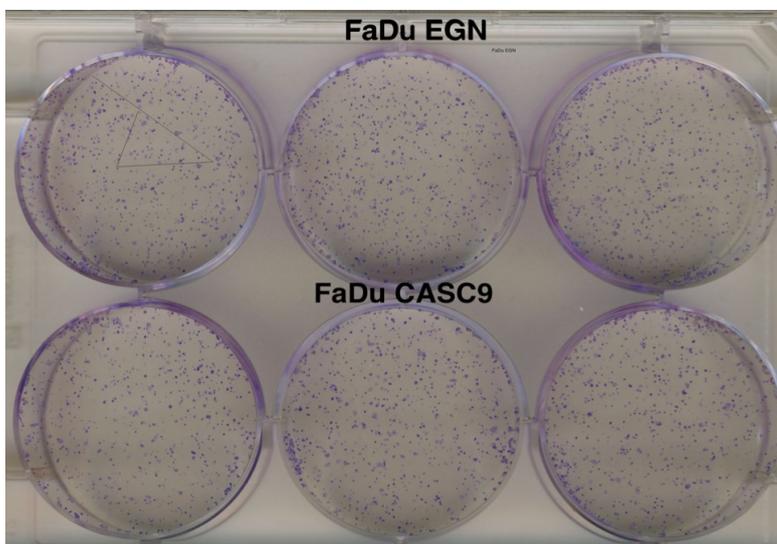


Abb. 29: Koloniebildung von FaDu Zellen nach Überexpression von CASC9: In FaDu Zellen wurde nach stabiler Überexpression von CASC9 im Vergleich zum Leervektor die Fähigkeit zur Koloniebildung gemessen. Die Auszählung der Kolonien erfolgte nach neun Tagen.

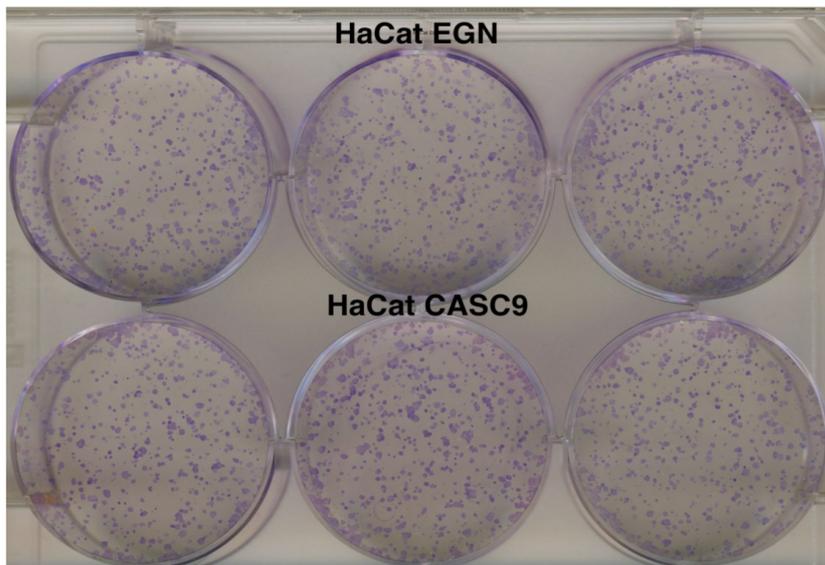


Abb. 30: Koloniebildung von HaCaT Zellen nach Überexpression von CASC9: In HaCaT Zellen wurde nach stabiler Überexpression von CASC9 im Vergleich zum Leervektor die Fähigkeit zur Koloniebildung gemessen. Die Auszählung der Kolonien erfolgte nach neun Tagen.

Anhand dieser Abbildungen wird deutlich, dass eine Überexpression von CASC9 in HaCaT und FaDu keine signifikanten Auswirkungen auf die Koloniebildung hat. Die Zahl der gebildeten Kolonien in den Kontrollzelllinien lag dabei bei ≈ 235 in FaDu und ≈ 180 in HaCaT. Demgegenüber stehen ≈ 231 bzw. ≈ 247 gebildete Kolonien in FaDuCASC9 und ≈ 198 bzw. ≈ 224 in HaCaTCASC9. In den HaCaTCASC9 Zellen sind somit ca. 17% mehr Kolonien zu finden im Vergleich zu HaCaTEGN, wohingegen die Koloniezahlen der FaDu Zellen einmal unter und einmal über denen der Kontrollzellen liegen.

3.8.2.4 Zellzyklusanalyse von EGN und CASC9 in FaDu und HaCaT mittels

Durchflusszytometrie

Auswirkungen der CASC9 Transfektion auf den Zellzyklus von FaDu und HaCaT wurden weiterhin mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei konnte die Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen gemessen werden. In den mit CASC9 transfizierten HaCaT Zellen war ein leicht erhöhter Anteil an Zellen in der G2/M-Phase zu finden (s. Abb. 31). Die Durchflusszytometrie von FaDu Zellen ergab keine nennenswerten Unterschiede zwischen mit Leervektor und mit CASC9 transduzierten Zellen (s. Abb. 32).

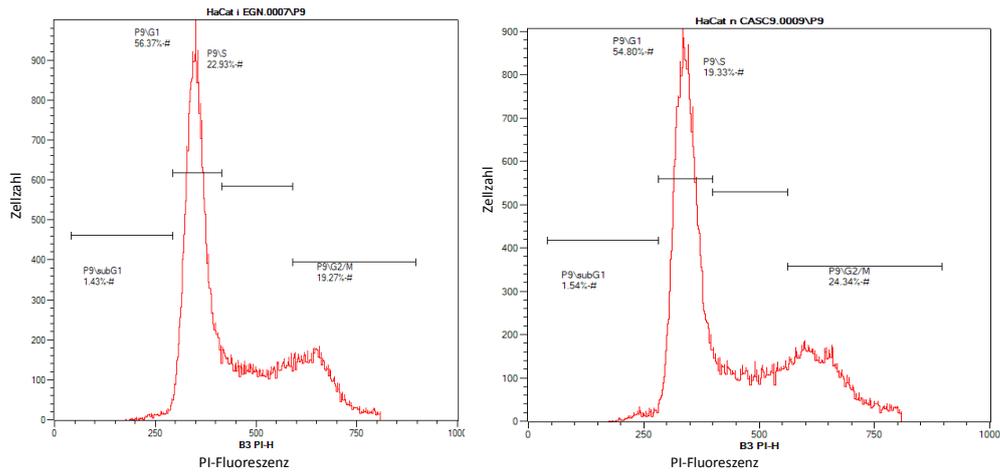


Abb. 31: Zellzyklus-Analyse von HaCaT EGN und HaCaT CASC9: HaCaT Zellen wurden nach stabiler Überexpression von CASC9 im Vergleich zum Leervektor auf Zellzyklusveränderungen mittels Propidium-Iodid-Färbung und Durchflusszytometrie untersucht. Die PI-Fluoreszenz entspricht dabei dem DNA-Gehalt; die Intervalle kennzeichnen die verschiedenen Zellzyklusphasen.

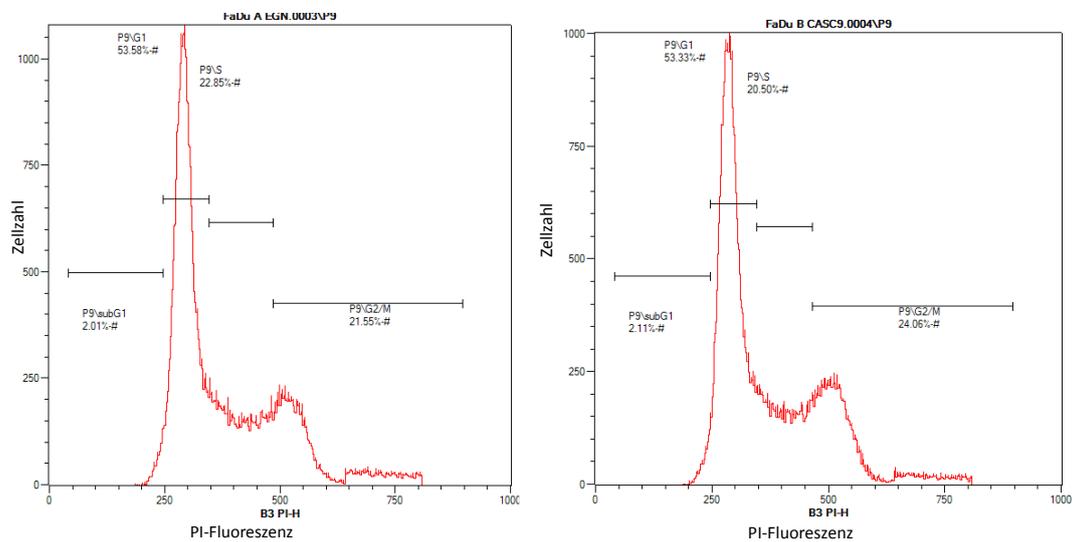


Abb. 32: Zellzyklus-Analyse von FaDu EGN und FaDu CASC9: FaDu Zellen wurden nach stabiler Überexpression von CASC9 im Vergleich zum Leervektor mittels Propidium-Iodid-Färbung und Durchflusszytometrie auf Zellzyklusveränderungen untersucht.

3.8.2.5 Bestimmung der Migrationsfähigkeit von FaDu und HaCaT Zellen nach Überexpression von CASC9

Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit von FaDu Zellen mit oder ohne Überexpression von CASC9 wurden mehrere Versuche durchgeführt, deren gemittelte Ergebnisse in Abbildung 33 zu sehen sind.

Anhand der Abbildungen wird deutlich, dass die Migrationsfähigkeit der mit CASC9 transfizierten Zellen ungefähr der der Kontrollzellen mit Leervektor entspricht. Der zeitliche Verlauf ist in beiden Versuchsansätzen sehr ähnlich. Zelllinienübergreifend lassen sich ebenso keine Unterschiede in der Migrationsfähigkeit der Zellen feststellen.

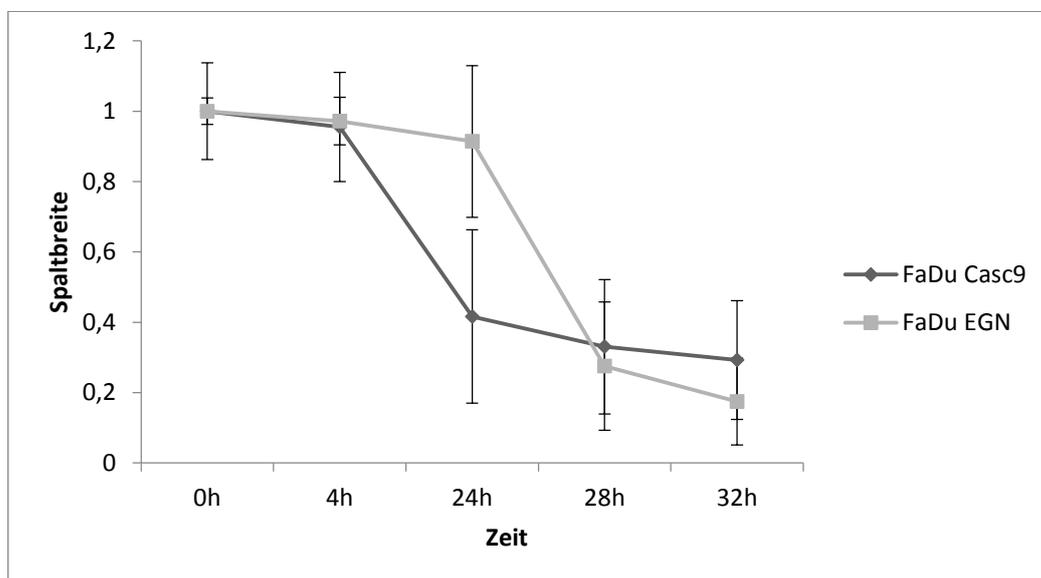


Abb. 33: Migrationsfähigkeit von FaDu CASC9 und FaDu EGN: Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit von FaDuEGN und FaDuCASC9 wurde ein Migrationsassay über 32 h durchgeführt und an verschiedenen Zeitpunkten die relative Spaltbreite bestimmt.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Migrationsfähigkeit von transfizierten HaCaT-Zellen über einen längeren Zeitraum betrachtet. Endpunkt der Beobachtungen war dabei 32 h nach Aussäen der Zellen. Hierbei zeigte sich, dass die Migrationsfähigkeit der Zellen mit zunehmender Zeit voneinander abweicht (s. Abb. 34).

In den HaCaT Zellen ist zu beobachten, dass die mit CASC9 transfizierten Zellen in ihrer Migrationsfähigkeit eingeschränkter schienen als die Kontrollzellen. Diese Ergebnisse sind allerdings nicht als signifikant zu werten, da die Unterschiede erst am Ende des Untersuchungszeitraumes auftraten.

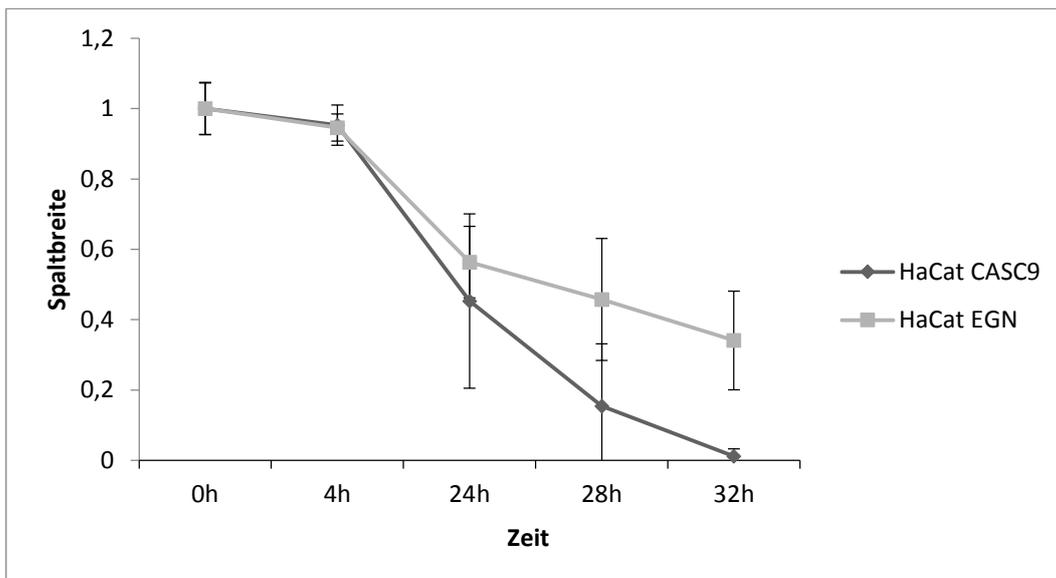


Abb. 34: Migrationsfähigkeit von HaCaT CASC9 und HaCaT EGN: Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit von HaCaTEGN und HaCaTCASC9 wurde ein Migrationsassay über 32 h durchgeführt und zu verschiedenen Zeitpunkten die relative Spaltbreite bestimmt.

3.8.2.6 *Bestimmung der Invasionsfähigkeit von EGN und CASC9 in FaDu und HaCaT im zeitlichen Verlauf*

Die Bestimmung des invasiven Wachstums von CASC9 überexprimierenden Zellen erfolgte mittels Invasionsassay. Es wurden jeweils mehrere Versuche durchgeführt, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen. Trotzdem waren die Ergebnisse für FaDu zu uneinheitlich und konnten somit nicht zuverlässig ausgewertet werden.

Die nachfolgende Abbildung enthält daher die gemittelten Ergebnisse aus allen durchgeführten Versuchen mit HaCaT Zellen.

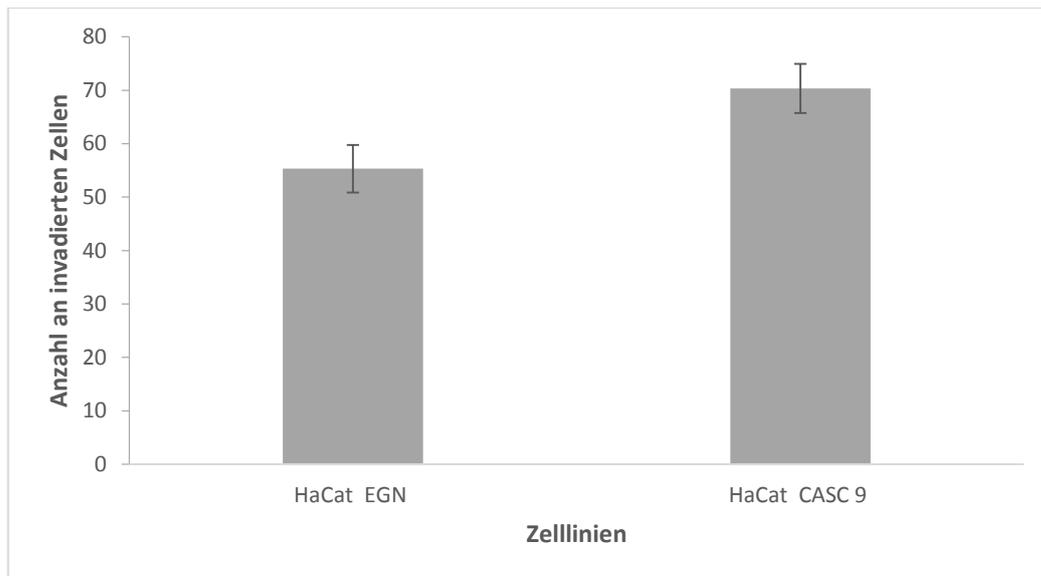


Abb. 35: Invasionsassay von HaCaT EGN & CASC9: Zur Bestimmung der Invasionsfähigkeit von HaCaTEGN und HaCaTCASC9 wurde ein Invasionsassay durchgeführt. Dabei wurden die Zellen ausgezählt, die durch die Matrigelbeschichtung auf die Rückseite der Transwells invadiert sind.

Anhand dieser Abbildung ist ersichtlich, dass mit CASC9 transfizierte Zellen eine gesteigerte Invasivität aufzuweisen schienen; der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant ($p=0,43$).

4 Diskussion

4.1 Identifikation von Biomarkern im Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer und effektiver Biomarker zur Früherkennung und Behandlungsoptimierung von Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals. Dieses Ziel wurde als primäres gesetzt, da es für diese Tumore trotz aller Forschung in den letzten Jahren nur begrenzte Früherkennungsmaßnahmen gibt und die Prognose besonders für Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen schlecht ist.

Als bekanntester Biomarker für das Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals gilt bisher der HPV-Status der Patienten. HPV-positive Tumore scheinen dabei eine eigene Entität darzustellen [26]. Dieses lässt sich am Beispiel genomischer Veränderungen verdeutlichen. HPV-negative Tumore besitzen in 50-80% aller Fälle Mutationen von $p16^{INK4A}$ oder $p53$, welche in HPV-positiven Tumoren selten bis gar nicht vorkommen [27, 28].

Patienten mit einem HPV-positiv getesteten Tumor haben aktuell in der Therapie ihrer Krebserkrankung Vorteile gegenüber negativ getesteten, da die positiven Tumore verstärkt auf Radiotherapie ansprechen und somit eine größere Heilungswahrscheinlichkeit besteht. Dieses weist auf einen weiteren wichtigen Punkt hin. Es fehlt aktuell nicht nur an Biomarkern zur Früherkennung, sondern auch an geeigneten individualisierten Therapien für die Patienten mit Tumoren im Kopf-Hals-Bereich mit schlechter Überlebensprognose. Die einzig bekannte molekular zielgerichtete Therapie ("targeted therapy") des *HNSCC* stellt Cetuximab dar. Dies ist ein monoklonaler Antikörper gegen den EGFR, welcher im *HNSCC* häufig überexprimiert wird. Diese Therapie ist jedoch mit einer Ansprechrate von 10-15% in metastasierten Tumoren wenig erfolgreich [29].

Das am häufigsten mutierte Gen im *HNSCC* ist *TP53* [2, 5]. Mutationen in *TP53* bedingen im Tumor eine unkontrollierte Proliferation, vor allem durch fehlende Apoptose. Schlüsselgene dabei sind $p14^{ARF}$, *MDM2* sowie HPV-Viren, wodurch sich nur wenig Ansätze für zielgerichtete Therapien ergeben [5]. Mit 10-15% aller Mutationen stellen Inaktivierungen von *NOTCH1* oder *NOTCH2* die zweithäufigste Mutation im *HNSCC* dar. Diese Membranproteine wirken als Rezeptoren für Liganden wie JAG1 oder JAG2. Die NOTCH Liganden weisen eine vermehrte Expression im Tumor auf [30]. Der NOTCH-Signalweg übt verschiedene, sogar entgegengesetzte Funktionen je nach Gewebe aus. Dazu zählen die Verstärkung der Fähigkeit zur Selbsterneuerung oder im

Gegenteil die Förderung der Differenzierung, entsprechend eine Förderung der Proliferation oder ein Stopp des Zellzyklus. Im *HNSCC* führen beispielsweise Mutationen im NOTCH Signalweg zu einer gesteigerten Tumorgenese und einer gesteigerten Expression von β -Catenin, einem Effektor des WNT-Signalwegs und Marker für tumoröse Entartung [31]. Somit deutet vieles auf eine tumorhemmende Funktion des NOTCH-Signalwegs hin; es gibt aber auch gegenteilige Befunde [30]. Daher ist fraglich, ob sich dieser Signalweg als Ansatz für die Therapie eignet.

Sun et al. betonen, dass - trotz verbesserter Therapien - in den letzten Jahren nur gering erhöhte Überlebenschancen bei *HNSCC* Patienten erreicht werden konnten [30]. Das mittlere Überleben der Patienten mit metastasiertem *HNSCC* liegt aktuell bei 20 Monaten; das progressionsfreie Überleben nur bei 15 Monaten [29]. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, warum trotz vieler neuer Einsichten in die Tumorbiologie bisher keine Verbesserung in der Therapie und somit dem Outcome der Patienten erzielt werden konnte. Offensichtlich besteht erheblicher Forschungsbedarf zur Frage zielgerichteter Therapien bei dieser Tumorart.

4.2 LncRNAs als potentielle Biomarker in Tumoren

Vor diesem Hintergrund konzentrierte sich diese Arbeit auf die Entwicklung von diagnostischen Biomarkern und explizit auf lncRNAs, da über diese bekannt ist, dass sie in vielfältiger Weise in der Pathophysiologie von spezifischen Tumoren involviert sind.

Bis vor wenigen Jahren waren Proteine der traditionelle Ansatz zur Identifikation von Biomarkern in Tumoren; mittlerweile liegen auch nicht kodierende RNAs im Fokus, zudem deren Funktionen im Gewebe [32]. LncRNAs sind insofern attraktiv für die Tumorforschung, als dass einige von ihnen eine größere Gewebespezifität als protein-kodierende Gene aufweisen und somit ideale Biomarker für Tumore darstellen könnten [33]. In einer Studie waren 78% der detektierten lncRNAs gewebespezifisch, verglichen mit nur 19% der mRNAs [34]. Einige lncRNAs sind allerdings in mehreren Tumor-entitäten verändert, beispielsweise HOTAIR [35]. LncRNAs können prognostische Biomarker sowohl für das Gesamtüberleben, als auch für das krankheitsfreie Überleben sein [36].

Ein großer Vorteil von lncRNAs als diagnostische und prognostische Biomarker ist die Messbarkeit in verschiedenen Probenarten. So können lncRNAs sowohl in Geweben als auch in Blut oder Urin gemessen werden. Beispielsweise lässt sich die lncRNA PCA3,

ein Biomarker des Prostatakarzinoms, im Urin nachweisen [37]. Solche Möglichkeiten der nicht invasiven Messung erleichtern erheblich die Anwendung im klinischen Setting. Als ideales Ziel der Erforschung von lncRNAs im Tumor steht aber nicht nur die Identifikation als Biomarker, sondern eine gezielte Therapie anhand der veränderten Expression. Eine „*targeted therapy*“ nutzt die Überexpression der lncRNA H19. Das plasmid-basierte Medikament BC-19 führt über die Induktion eines spezifischen Diphtherie-Toxins bei Überexpression von H19 im Tumor zum Tod von Tumorzellen [38]. Um lncRNAs als Biomarker verwenden zu können, müssen einige Kriterien erfüllt werden. Zu allererst ist es notwendig, dass die lncRNA eine hohe Sensitivität und Spezifität für den einzelnen Tumor besitzt, unabhängig von weiteren intrinsischen und extrinsischen Faktoren. Zum anderen ist es wichtig, dass das Vorliegen von lncRNAs in Geweben auch quantitativ genau und reproduzierbar erfasst werden kann. So kann die individuelle lncRNA Konzentration im Tumor mit Referenzwerten verglichen werden, um eine genaue Aussage über den Gesundheitsstand der Patienten oder die Dignität der Tumoren treffen zu können [32].

Beim aktuellen Forschungsstand sind für die meisten lncRNAs ihre genauen Funktionen nicht zureichend beschrieben [9, 39]. Deshalb bedarf es in diesem Bereich noch einiges an Weiterentwicklung der Forschung.

Maligne Tumore entstehen durch die Akkumulation von molekularen Veränderungen, hervorgerufen durch Mutationen oder epigenetische Veränderungen wie zum Beispiel DNA-Methylierung oder bestimmte Histonmodifikationen. Diese Veränderungen betreffen häufig Schlüsselgene, die in normalen Zellen an der Regulation der Proliferation, Apoptose oder Stammzelldifferenzierung beteiligt sind [33]. Einige solcher Schlüsselgene und ihre Produkte interagieren mit lncRNAs (vgl. z.B. Tab. 26), sodass sich sagen lässt, dass lncRNAs sowohl direkt als auch indirekt an der Tumorgenese beteiligt sein können. Aktuell lässt sich die tatsächliche Anzahl an Interaktionspartnern von lncRNAs aufgrund der Komplexität der Zusammenhänge nicht vollständig bestimmen. Für Untersuchungen dieser Art werden neuartige experimentelle Ansätze und Werkzeuge gebraucht, um die genaue Wirkweise von lncRNAs zu verstehen und spezifische Inhibitoren (oder Aktivatoren) für sie zu erschaffen [11].

Aus vorherigen Forschungsarbeiten ist bekannt, dass bei Dysplasien der Mundschleimhaut 60% aller identifizierten lncRNA differentiell exprimiert sind [40]. Man kann also davon ausgehen, dass die Bedeutung von lncRNAs in anderen Tumorentitäten auf das

HNSCC übertragbar ist, also beispielsweise bestimmte lncRNAs ebenfalls in den Zellzyklus eingreifen und Veränderungen der Zelle bewirken, die zu malignen Entartungen führen [40]. Neuerdings wird berichtet, dass im *OSCC* (basierend auf Analysen der *TCGA* Datenbank) 1716 lncRNAs verändert gegenüber dem normalen Gewebe exprimiert werden; 1044 davon waren herauf- und 672 herabreguliert [41]. Von dieser großen Anzahl an veränderten lncRNAs ist allerdings nur ein Bruchteil hinsichtlich ihrer Funktion und Regulation im *HNSCC* erforscht. Wie viele dieser Veränderungen Ursache und wie viele Begleiterscheinung der Erkrankung darstellen, ist unbekannt. Bei einer solchen Fülle lässt sich zudem nicht eindeutig sagen, ob eine spezielle lncRNA an der malignen Entartung des Gewebes maßgeblich beteiligt ist oder ob die Kombination aus vielen verschiedenen veränderten lncRNAs verantwortlich ist. Auch wenn einzelne lncRNAs hinsichtlich ihrer Funktion und Regulation bekannt sind, so kann man nicht genau sagen, inwiefern ihre Wirkungsweise in Kombination mit anderen lncRNAs dieselbe bleibt.

4.3 Identifikation von lncRNAs als Biomarkerkandidaten im HNSCC

Am Anfang meiner Untersuchung erfolgte die ausführliche Datenbankrecherche mit der Intention, bislang nicht näher untersuchte lncRNAs zu identifizieren, die im *HNSCC* überexprimiert bzw. herunterreguliert sind. Es war somit nicht primär die Absicht, lncRNAs, die in anderen Tumorentitäten bereits als differentiell exprimiert gefunden wurden, in Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals hinsichtlich ihrer Expression zu prüfen.

Die Arbeit der Forschungsgruppe um *Zou et al.* [22] stellte einen der beiden Grundpfeiler der Kandidatensuche dar. Ihre insgesamt 222 als in *HNSCC* Proben dereguliert beschriebenen lncRNAs reduzierten sich im Verlauf der Recherche zunächst auf 65, da der Fokus auf der Assoziation mit dem Überleben der Patienten lag. Vor dem oben beschriebenen Hintergrund erschien es sinnvoll, sich vorrangig auf diejenigen lncRNAs zu konzentrieren, die auch als prognostische Biomarker in Frage kommen könnten. Die weitere Reduktion des Kandidatensatzes ergab sich durch die genauere Begutachtung der Expressionsdaten, wobei nur solche lncRNAs ausgewählt werden, deren Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe mindestens dreifach waren. Diese Bedingung begünstigt eine hohe Sensitivität und Spezifität diagnostischer Biomarker.

Die letztendlich verbliebenen 15 lncRNAs stellen somit potentielle diagnostische wie prognostische Biomarker für das Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals dar.

Neben potentiellen Kandidaten werden in der Arbeit von *Zou et al.* [22] Zusammenhänge zwischen den lncRNAs und Mutationen von Genen in den Tumoren festgestellt. Demnach stehen diese, mit hoher Signifikanz differentiell exprimierten, lncRNAs mit Mutationen in Genen wie *TP53*, *CDKN2*, *CASP8*, *PRDM9* oder *FBXW7* in Zusammenhang [42]. In Tumoren mit bestimmten Genmutationen scheinen Expressionsveränderungen von lncRNAs besonders häufig zu sein, auch wenn der Zusammenhang weiterer Klärung bedarf (vgl. HOTAIR im *OSCC* [43]).

Anhand der lncRNA HOTAIR und ihrer Expressionsveränderung und Wirkung im *OSCC* wird ebenfalls deutlich, dass es einen funktionellen Zusammenhang zwischen einer veränderten HOTAIR Expression und Genmutationen von E-Cadherin (*CDH1*) zu geben scheint [44]. Die verminderte E-Cadherin Expression erleichtert die Metastasierung des Tumors durch Verlust der Zell-Zellverbindungen [44].

Dies ist ein Anhalt dafür, dass Genmutationen mit lncRNA Expressionsveränderungen in Zusammenhang stehen und einander bedingen. Um allerdings genaue Aussagen treffen zu können ist es erforderlich, dass man den Wirkmechanismus relevanter lncRNAs in Tumoren vollständig beleuchten kann, was durch weitere Forschungen in der Zukunft wahrscheinlich ermöglicht wird (vgl. 4.7).

Den zweiten Grundpfeiler der Recherchen bildeten die Daten der *TANRIC* Datenbank. Hierbei wurden die Kandidaten eingegrenzt, indem deren Expression im *HNSCC* Tumorgewebe mindestens dreimal so hoch sein sollte wie die Expression im Normalgewebe. Dass somit nur lncRNAs zur weiteren Betrachtung übrig blieben, deren Expression im Tumor erhöht war, während *Zou et al.* [22] auch herunterregulierte lncRNAs identifizierten, erklärt teilweise die geringe Schnittmenge an Kandidaten aus beiden Datensatzanalysen. Insgesamt gab es nur drei lncRNAs, die in den beiden Primärdatensätzen gemeinsam vorkamen (*CASC9*, *LINC01296*, *LINC01615*).

Vor der Expressionsmessung der lncRNA-Kandidaten wurde ihre genomische Lokalisation genauer betrachtet. Einige der lncRNAs waren überlappend mit anderen Genen im Genom zu finden. Von der Messung solcher lncRNAs im Gewebe wurde abgesehen, da man mit fragwürdigen Ergebnissen rechnen musste. Als Beispiel mag die 1980 bp lange lncRNA HCG22 auf Chromosom 6p21.33 dienen. Sie liegt intergenisch so eingebettet in dem proteinkodierenden Gen *MUC22*, dass Messungen nur schwierig eindeutige

Aussagen zur Expression liefern können, da sich die Transkripte der zwei Gene stark überlappen.

Der nächste Schritt bestand in der Etablierung von Messprotokollen. Da einige ausgewählte lncRNAs erst neuerdings annotiert waren, gab es für sie keine publizierten Expressionsdaten, sodass man aus Datenbanken keine Positivkontrolle definieren konnte. Besonders problematisch war in solchen Fällen, wenn die zu messenden lncRNAs auch in den eigentlichen Messproben nicht ohne weiteres nachweisbar waren. Beispielhaft dafür ist NKX-2-1-AS1. Diese lncRNA wird in keiner der zur Verfügung stehenden Zelllinien (sowohl aus Tumor- als auch Normalgeweben) exprimiert, so dass als Referenz auf eine Normalprobe aus dem späteren Probenstapel zurückgegriffen werden musste. Sie zählt offenbar zu den vielen lncRNAs, die in Geweben nur sehr gering exprimiert werden [45], was die Verlässlichkeit von Messungen weiter erschwerte.

Insgesamt minimierte sich durch die Summe derartiger Problematiken die Liste der Kandidaten für die Gewebemessungen auf sieben lncRNAs.

4.4 Messung der lncRNAs in Gewebeproben von Kopf und Hals

Von diesen sieben ausgewählten lncRNAs wiederum wiesen SNHG6 und linc01116 in unserem Gewebeset keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe auf. Die Vergleichsdaten der *TANRIC* Datenbank zeigten bei beiden Kandidaten dagegen signifikante Expressionserhöhungen in den Tumorproben. Es stellt sich also die Frage, wie diese Unterschiede zu Stande kommen konnten. Ein wichtiger Unterschied zwischen dem hiesigen Probenkollektiv und dem der *TCGA*-Proben der *TANRIC* Datenbank besteht in der Größe des Probenstapels. Das hiesige Probenstapel, in denen diese Messungen durchgeführt wurden, bestand aus 46 Tumor- und 20 Normalproben, wohingegen die *TANRIC* Datenbank 426 Tumor- und 42 Normalproben umfasst. Bei einer zehnfach höheren Probenanzahl sind die Streubereiche der Daten weniger gering und es können somit auch zutreffendere Aussagen getätigt werden (v.i).

Die Expression bei linc01116 stimmt in der Tendenz mit den Daten des großen Probenkollektivs der *TANRIC* Datenbank überein. Beide Probenstapel zeigen erhöhte Expressionen im Tumor. Bei SNHG6 hingegen sprechen die gemessenen Expressionswerte für eine verminderte Expression im Tumor; die *TANRIC*-Referenzwerte hingegen zeigen eine Überexpression.

Die weiteren fünf gemessenen lncRNAs wiesen signifikante Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe auf. Bei *CASC9*, *HOXB-AS3*, *HOTAIR* und *NKX-2-1-AS1* stimmte die Richtung der gemessenen Expressionsunterschiede mit denen der *TANRIC* Datenbank überein, wobei man auch hier erwähnen muss, dass die Expressionsunterschiede in den Referenzdaten wesentlich größer waren als im eigenen Proben-set.

Zudem muss man bedenken, dass die Gewebeproben des *TCGA*-Konsortiums, auf die sich die *TANRIC* Datenbank bezieht, aus dem angloamerikanischen Raum stammen. Dort werden sowohl Tumore des Mundraumes als auch Tumore des Halsbereiches unter dem Oberbegriff *HNSCC* zusammengefasst. Die hiesigen Proben stammen aus Tumorexzisionen der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde. Dieses Fachgebiet beschäftigt sich stärker mit Tumoren im Halsbereich, z.B. Larynx- oder Pharynxkarzinomen. Tumore des Mundraumes werden eher von der Klinik für Kieferchirurgie entfernt und sind somit im hiesigen Probenkollektiv vergleichsweise unterrepräsentiert.

Eine weitere mögliche Erklärung der Unterschiede zwischen den eigenen Messungen und den Ergebnissen der *TANRIC* Datenbank liegt in der Zusammensetzung der Probenserien nach Alter, Geschlecht und Tumorstadien.

Aufgrund bereits bekannter Risikofaktoren wie Rauchen oder Alkoholkonsum würde man vorhersagen, dass hauptsächlich Männer vom *HNSCC* betroffen sind. Dieses zeigte sich auch in unseren Messungen; der Großteil der Tumorpatienten war männlich (n=21). Bestätigt werden konnten diese Tendenzen in der Datenbank der *TCGA*. Stand Juli 2019 sind mehr als 2/3 der Patienten mit einem *HNSCC* männlich (n=385).

Die *TANRIC* Datenbank gibt keine genauen Informationen zum Alter der Patienten. Die bekannten Risikofaktoren wie Rauchen oder Alkoholkonsum wirken kumulativ im Laufe der Expositionszeit, was ein späteres Krankheitsalter bedingt. Dies ließ sich sehr gut anhand der eigens getätigten *CASC9* Messungen verdeutlichen. Bis auf vier waren alle Tumorpatienten 55 Jahre oder älter.

Ein weiterer wichtiger Erklärungsgrund für unterschiedlich hoch ausgeprägte lncRNA Expressionen ist die weitere Charakterisierung der Tumore. Anhand von Literaturrecherche ist bekannt, dass Tumore des Kopf-Hals-Bereiches oftmals erst in späten Stadien (T=IVa) erkannt werden [46].

Aus verschiedenen Tumorentitäten weiß man, dass *CASC9* Einfluss auf die Tumorgroße und die Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen nehmen kann (s. Tab. 26). Der Datensatz der *TANRIC* Datenbank beinhaltet 27 Tumorproben im Stadium pT1, 128 im

Stadium pT2, 117 im Stadium pT3, und 139 im Stadium pT4. Mehr als die Hälfte der Patienten leidet somit an einem weit fortgeschrittenen Tumor (pT3 oder mehr). Im Vergleich dazu bestehen die hiesigen Gewebeserien aus Düsseldorf aus 7 Tumoren im Stadium pT1, 13 im Stadium pT2, 6 im Stadium pT3 und 7 im Stadium pT4 und aus Bonn aus 11 Tumoren im Stadium pT1, 33 im Stadium pT2, 24 im Stadium pT3 und 10 im Stadium pT4. In den hiesigen Gewebeproben ist CASC9 eher in niedrigen Tumorstadien verstärkt exprimiert, in der *TCGA*-Serie eher in höheren Tumorstadien. Neben den unterschiedlichen Lokalisationen der Tumore könnten somit auch die Expressionsunterschiede auf der unterschiedlichen Zusammensetzung nach Tumorstadien beruhen. Schließlich ist zu bedenken, dass globale RNA-Sequenzierungen, wie sie den *TCGA*-Daten zugrunde liegen, abweichende Ergebnisse gegenüber gezielten quantitativen PCR-Messungen liefern können, wie sie für die hiesigen Gewebeproben eingesetzt wurden. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine einzelne Ursache für die Unterschiede nicht wirklich auszumachen ist. Vielmehr wird es sich um ein Zusammenspiel aus vielen verschiedenen Faktoren handeln, deren Zusammenschau die Expressionsunterschiede ergibt. Festzuhalten ist allerdings, dass trotz aller Unterschiede zwischen dem hiesigen Probenet und dem *TCGA*-Probenet CASC9 - ebenso wie HOTAIR - robust zwischen Tumor- und Normalgeweben differentiell exprimiert waren.

Des Weiteren war auffällig, dass in der RT-PCR-Analyse jeweils für zwei Tumorproben und eine Normalprobe stark abweichende Ergebnisse für CASC9 (oder aber auch z.B. für HOXB-AS3, TINCR und HOTAIR) gemessen wurden. Dieses war verwunderlich, da die Expressionsmessungen von *SDHA* und *GAPDH* in diesen Proben unauffällig waren, sodass sie mit Hinblick auf die RNA-Qualität als technisch geeignet eingestuft wurden. Am ehesten könnte es sich hier also um eine spezielle Zusammensetzung der Gewebeproben handeln, wie z.B. ein hoher Anteil an Entzündungszellen; möglicherweise könnten diese Normalproben auch dysplastische Zellen enthalten haben, sodass die Ergebnisse hierdurch verfälscht wurden.

Abweichende Ergebnisse wurden für TINCR erzielt. Im hiesigen Probenkollektiv wurde eine signifikante Expressionsminderung im Tumor festgestellt, wohingegen die Daten der *TANRIC* Datenbank für eine – wenn auch leichte - Überexpression im Tumor sprachen. Auch hier gelten die oben ausgeführten Überlegungen.

Als abschließendes Fazit zu den Expressionsmessungen lässt sich festhalten, dass sich mithilfe der Messungen im ersten Probenet nur Expressionstendenzen feststellen ließen, da es für definitive Aussagen einen zu geringen Umfang hat. Aus diesem Grund erfolgte

der Versuch der Bestätigung der Messwerte in einem weiteren Gewebeset, welches 73 Tumor- und 60 Normalproben beinhaltete. Dabei wurden nur CASC9, HOTAIR und HOXB-AS3 gemessen, also diejenigen lncRNAs, die bereits in Übereinstimmung mit den Datenbankanalysen eine signifikante Überexpression im ersten Gewebeset aufwiesen.

Anhand der Auswertungen dieser Messungen konnten die Tendenzen für CASC9 und HOTAIR bestätigt werden. Beide lncRNAs waren in den Tumorgeweben signifikant höher exprimiert als in den Normalgeweben. Für HOTAIR entsprechen sie den Erwartungen aus anderen Tumorarten. HOTAIR ist bereits in zahlreichen Tumorentitäten in veränderter Expression nachgewiesen worden und zählt zu den wenigen lncRNAs, die spezifische Biomarker für mehrere Tumorentitäten darstellen [16]. Auch zum HNSCC gibt es bereits einschlägige Arbeiten [4-6, 12, 27, 41, 43, 44]. So sind hohe Expressionen dieser lncRNA im OSCC mit Tumorstadium, histopathologischer Differenzierung, Metastasierung und Tumorstadium assoziiert. Funktionelle Experimente legten auch eine biologische Erklärung dieser Assoziation nahe [43].

Demnach korreliert HOTAIR negativ mit der E-Cadherin Expression der Zelle; eine hohe Expression von HOTAIR vermindert E-Cadherin. Da E-Cadherin die Epithelzellen miteinander verbindet bzw. den Gewebeverband zusammenhält, erleichtert der Verlust die (lymphogene) Metastasierung, da die Tumorzellen sich schneller und einfacher aus ihrem Verbund lösen können [44]. Der Gesamtprozess wird als EMT (epithelial-mesenchymale Transition) bezeichnet [44].

Ein systematischer Knockdown von HOTAIR im OSCC bewirkte eine verminderte Zellproliferation sowie eine vermehrte Invasion und Migration [43]. Die wohl am aussagekräftigste Auswirkung eines HOTAIR Knockdowns war allerdings die Induktion der Apoptose [43]. HOTAIR Expressionsveränderungen stehen zudem im Zusammenhang mit dem Therapieansprechen von Patienten. So wird berichtet, dass eine hohe HOTAIR Expression mit einer Hemmung der Expression von *p21* und einem verminderten Ansprechen auf eine Radiotherapie assoziiert war [47].

Die in der ersten Serie erzielten Messergebnisse von HOXB-AS3 konnten in der Validierungsmessung dagegen nicht bestätigt werden. Bei genauerem Betrachten der Ergebnisse fällt auf, dass die Messergebnisse von Tumor- und Normalgewebe sehr nah beieinander lagen und auch generell nur sehr niedrige Expressionen sowohl im Tumor als auch im Normalgewebe gemessen wurden. Die insgesamt niedrige Expression von HOXB-AS3 steht einer Nutzung als Biomarker in jedem Falle im Wege.

4.5 Korrelation der lncRNAs mit klinischen Patientenparametern

Abschließend wurde im ersten Teil der Arbeit nach Zusammenhängen zwischen Expressionsdaten und klinischen Patientendaten gesucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf das Überleben der Patienten gelegt, da anhand dieses Kriteriums eine erste Filterung der potentiellen Kandidaten erfolgt war. Hierbei zeigte sich, dass eine hohe CASC9-Expression mit einem kürzeren Überleben der Patienten assoziiert ist. Zudem fanden sich Korrelationen zwischen dem Alter, dem Tumorstatus sowie dem HPV-Status der Patienten. Eine erhöhte CASC9 Expression war besonders bei Patienten unter 65 Jahren mit weniger stark fortgeschrittenen Tumoren ($T \leq pT2$) zu finden. Hohe Expression von HOTAIR und HOXB-AS3 hingegen korrelierten positiv mit dem HPV-Status der Patienten.

Auch von daher erscheint die weitere Charakterisierung von CASC9 lohnend, da damit die Hauptintention der vorliegenden Arbeit verfolgt wird - nämlich die Früherkennung von Tumoren mittels neuartigen Biomarkern zu verbessern. Gerade die Früherkennung von Tumoren im Kopf-Hals Bereich gestaltet sich aktuell noch sehr schwierig. 77 % der Tumore werden erst in weit fortgeschrittenem Stadium ($T= pT4a$) erkannt [46]. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt in unserer Serie bei 68 Jahren. Mittels CASC9 Messung können somit Tumore in niedrigen Stadien bei Patienten unter 65 Jahren frühzeitig detektiert werden. Dadurch ergeben sich weitaus bessere therapeutische Möglichkeiten und das Überleben der Patienten kann verbessert werden. Somit greift eine Detektion von CASC9 genau da, wo aktuell besonders deutlich Mängel in der Diagnostik und Früherkennung bestehen.

HOXB-AS3 und HOTAIR hingegen korrelieren positiv mit dem HPV-Status der Patienten und können somit in der Diagnostik zur Bestätigung dienen, zusätzlich zu CASC9. Im Hinblick auf bereits bekannte lncRNAs im *HNSCC* wäre es ein interessanter Ansatz nicht nur eine lncRNA als Tumormarker zu untersuchen, sondern verschiedene lncRNAs miteinander zu kombinieren und somit den Patienten diagnostische und prognostische Vorteile zu bieten. Ein positiver HPV-Status der Patienten steht bereits bewiesenermaßen im Zusammenhang mit dem Auftreten von Tumoren und kann durch diese beiden lncRNAs ergänzt werden. Eine Kombination aus CASC9 und HOTAIR würde besonders die

Sensitivität als diagnostischer Marker erhöhen. Für den Fall, dass HOTAIR ebenfalls erhöht ist, ist zudem die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass es sich um einen HPV-positiven Tumor handelt.

Eine Kombination aus HOTAIR und CASC9 wäre ein mögliches Ziel für eine Therapie. Sowohl CASC9 als auch HOTAIR bewirken eine verstärkte Invasion und Migration der Tumorzellen. Ein gezielter Knockdown beider lncRNAs könnte somit die Tumore in ihrem Metastasierungsverhalten und ihrer Invasionstiefe einschränken. Dadurch würden die Patienten womöglich Zeit gewinnen, um mit weiteren gezielten Therapien den Tumor zu verkleinern oder gar vollständig zu entfernen.

4.6 CASC9 Überexpression in anderen Tumoren

Aufgrund der vorangegangenen Literaturrecherche und den getätigten Messungen erschien CASC9 ein sehr vielversprechender Kandidat für eine tiefergehende Untersuchung zu sein. In weiterführenden Literatur- und Datenbankrecherchen zeigte sich eine Überexpression von CASC9 in vielen anderen Tumorentitäten (s. Abb. 17 und Tab. 25). Bislang sind keine Daten zu einer Herunterregulation von CASC9 in Tumorgewebe speziell publiziert. Hinweise darauf gibt es nur in genomweiten Datensätzen von beispielsweise Nierenkarzinomen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass CASC9 in vielen Tumorarten überexprimiert ist. In Tabelle 25 werden alle mit einer erhöhten CASC9 Expression vergesellschafteten Tumore aufgeführt, zu denen bisher Publikationen vorliegen.

Tabelle 25: Zusammensetzung und klinische Assoziation von Tumoren mit erhöhter CASC9 Expression

Tumorentität	Tumorproben	Normalproben	Referenz
Adeno-CA der Lunge	40 Tumorproben	40 gepaart	Zhou et al.[48]
Blasen- CA	1 Tumorprobe	1 gepaart	Barron et al. [49]
Cervix-Ca	119 Tumorproben	96 unabhängige Normalproben	Zhang et al.[50]

ESCC	115 Tumorproben	115 gepaart	Liang et al. [51]
Gliom	28 Tumorproben	28 gepaart	Zhang et al. [50]
Hämangiom	43 Tumorproben	43 gepaart	Li et al. [52]
HCC	HCC-Zelllinienexperimente 28 Tumorproben	28 gepaart	Klingenberg et al. [53], Gramantieri et al. [54]
Kolon-Ca	40 Tumorproben	40 gepaart	Luo et al. [55]
LUSCC	20 Tumorproben	20 gepaart	Gao et al. [23]
Magen-Ca	89 Tumorproben	89 gepaart	Shang et al. [56]
Mamma-Ca	17 Tumorproben	17 gepaart	Shao et al. [57]
OSCC	84 Tumorproben	35 unabhängige Normalproben	Yang et al. [58]
Ovar-Ca	43 Tumorproben	43 gepaart	Hu et al. [59]

Anhand der Literaturrecherchen wird deutlich, dass eine erhöhte CASC9 Expression in vielen Tumorarten, z.B. dem Adeno-CA der Lunge, dem Gliom oder dem Magen-CA, mit der Tumorgröße und Metastasierung in Zusammenhang steht. Dies passt zu Untersuchungen in Modellsystemen, wonach CASC9 Eigenschaften wie Invasivität und Proliferation fördert (s. nächster Abschnitt).

Zudem stehen erhöhte CASC9 Expressionen im Adenokarzinom der Lunge in direktem Zusammenhang mit dem TNM Stadium des Tumors. Je weiter fortgeschritten und metastasiert der Tumor, desto höher die CASC9 Expression und desto schlechter die Überlebensprognose der Patienten [48]. Ähnliche Ergebnisse konnte man in Magen-

karzinomen feststellen. Als Besonderheit für diese Tumorentität lässt sich noch hinzufügen, dass sich eine erhöhte CASC9 Expression ebenfalls in chemoresistenten Subtypen zeigt [53, 56, 60].

Bei genauerer Betrachtung dieser Tabelle wird aber deutlich, dass jede durchgeführte Studie kritisch hinsichtlich ihrer Aussagekraft betrachtet werden muss. Dafür stellen die Untersuchungen im *ESCC* ein positives Beispiel dar. Die Probenkohorte ist mit 115 Tumorproben ausreichend groß, um generelle Aussagen treffen zu können. Ein weiterer positiv hervorzuhebender Aspekt ist, dass Paare aus Tumor- und Normalproben für die Untersuchungen verwendet wurden. So kann in jedem Paar direkt verglichen werden, ob es im Tumor eine CASC9 Erhöhung im Vergleich zum passenden Normalgewebe gibt. Bei dieser Tumorart ist die Überexpression auch in einer unabhängigen Arbeit bestätigt worden [24], was bisher nur für wenige Entitäten erfolgt ist. Kritischer sind beispielsweise die Ergebnisse aus dem Mamma-Ca zu betrachten. In dieser Kohorte gab es insgesamt nur 17 Gewebepaare, sodass es fraglich ist, ob sich die Ergebnisse verallgemeinern lassen.

Auffällig ist eine verstärkte Expression von CASC9 in Tumoren mit squamöser Differenzierung, beispielhaft beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Dort wird CASC9 verstärkt im Tumor exprimiert und reguliert in Zelllinien dieser Entität die Migration und Invasion der Tumorzellen [24]. Der Zusammenhang zwischen vermehrter CASC9 Expression und squamöser Differenzierung von Tumoren bedarf demnach näherer Betrachtung. Eine erhöhte Expression von CASC9 fand sich jedoch auch in anderen Tumorarten, wie dem duktalem Pankreas-Adenokarzinom, obwohl in Adenokarzinomen anderer Gewebe die CASC9 Expression im allgemeinen vermindert ist [61]. In den weiterführenden funktionellen Experimenten im Pankreaskarzinom bedingte ein Knockdown von CASC9 wiederum verminderte Zellproliferation und Invasion. CASC9 scheint also auch in dieser Tumorart als Onkogen zu fungieren [61].

Insgesamt lässt sich aber festhalten, dass CASC9 über verschiedene Tumorentitäten hinweg überexprimiert wird und daher auch über das *HNSCC* hinaus als Tumor-Biomarker geeignet sein könnte.

4.7 Funktionelle Untersuchungen von CASC9

Um die funktionellen Auswirkungen der erhöhten CASC9 Expression im *HNSCC* zu untersuchen, wurde die Expression in *HNSCC* Zelllinien bzw. der nicht-transformierten HaCaT-Zelllinie experimentell moduliert.

Ein Ansatz war dabei der Knockdown von CASC9 mittels shRNA in Zelllinien aus Kopf- und Hals-Karzinomen mit hoher CASC9 Expression. Die anschließend durchgeführten Messungen zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit, Klonogenität und Cisplatin-Sensitivität ergaben allerdings in der ausgewählten Zelllinien keine signifikanten Unterschiede zwischen Knockdown und Kontrolle, sodass man davon ausgehen muss, dass CASC9 keine entscheidenden Auswirkungen auf diese Funktionen hat.

Ähnliche Knockdownversuche sind mit Zelllinien anderer Entitäten publiziert worden (s. Tab. 26). Dort übte CASC9 *in vitro* ebenso wie in *in vivo* Mausmodellen (*ESCC*, *LUAD*) [25, 48, 51], sowie in *CAM* Modellen beim *HCC* [53] signifikante Wirkungen auf die Zellproliferation aus.

Ähnlich berichteten eine Reihe von Arbeiten (s. Tab. 26), dass eine experimentelle Überexpression von CASC9 in Zelllinien anderer Tumorentitäten deren Migrationsfähigkeit fördert. In dieser Arbeit werden gleichermaßen Migrations-, Invasions-, Proliferations- und Klonogenitätsassays nach CASC9 Überexpression durchgeführt. Diese Versuche machten jedoch keine direkten Einflüsse einer Überexpression von CASC9 sichtbar. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen mit oder ohne Überexpression von CASC9. Einzig die Wirkung auf den Zellzyklus sprach für eine Wirkung von CASC9; dort konnte eine leichte Erhöhung der G2-Fraktion festgestellt werden. Daher stellt sich die Frage, weshalb in dieser Arbeit keine entscheidenden Auswirkungen auf neoplastische Eigenschaften der Zellen beobachtet werden konnten.

Seit Beginn der Forschungsarbeiten zu CASC9 im *HNSCC* wurden parallel Regulationsmechanismen von CASC9 in anderen Tumorentitäten umfassend behandelt und analysiert. So gibt es mittlerweile Vorstellungen dazu wie CASC9 die Proliferation, Migration und Invasion von Tumorzellen in Lunge, Ösophagus, Magen und Leber beeinflusst [23-25, 48, 51, 53, 56]. Einen Überblick über alle aktuell bekannten Regulationsmechanismen von CASC9 in Tumoren ist in Tabelle 26 zu finden.

Tabelle 26: Übersicht über CASC9 Wirkmechanismen in unterschiedlichen Tumorentitäten

Tumoren- tität	Wirkmechanismus	Wirkung in der Zelle	Refe- renz
Adeno- CA der Lunge	CASC9.5+ DNMT1 +E-Cad- herin → EMT	DNA-Methylierung	Zhou et al.[48]
Blasen- CA	CASC9↑/miR34a↓/HNF4G↑	Migration, Invasion, Prolif- eration	Barron et al. [49]
Cervix-Ca	TGFβ→CASC9↑/ miR215↓/ TWIST2 ↑	Metastasierung und Tumor- wachstum	Zhang et al.[50]
ESCC	CASC9↑→CBP↑+H3K27↑→ LAMC2↑ Integrin α6β4 + Laminin 332 → Phosphorylierung von FAK → PI3K/AKT ↓	Klin. Parameter, Metastasierung	Liang et al. [51]
Gliom	CASC9↑/ miR-519d↓/ STAT3↑	Invasion und Metastasi- erung	Zhang et al. [50]
Häman- giom	1.CASC9 ↑→ CyclinD1↑, N- cadherin↑,Twist↑,MMP2 ↑ 2.CASC9 ↑/ miR 125a-3p↓/ Nrg1↑	Proliferation, Migration, In- vasion	Li et al. [52]
HCC	CASC9↑:HNRNPL↑→PI3K/ AKT CASC9↑ → N-Cadherin↑ (EMT Marker)	Klin. Parameter	Klingen- berg et al. [53], Graman- tieri et al. [54]
Kolon-Ca	CASC9↑+ CPSF3↑ bindet TGFβ	fehlende Apoptose	Luo et al. [55]

	CPSF3↑ → miR- 17-92↑ → Angiogenese durch TSP1↓ und CTGF↓ CASC9↑+CPSF3↑→TGFβ2↑ + TERT↑ → SMAD3		
LUSCC	CASC9↑→ FOSL2↑ CASC9↑→ EBF1↓	Zell-Zell-Organisation, Desmosomorganisation und Epidermisentwicklung	Gao et al. [23]
Magen-Ca	CASC9↑→MDR1↑	Klin. Parameter, Therapie-resistenz	Shang et al. [56]
Mamma-Ca	CASC9↑/ miR 195-497↓/ CHK1↑	Tumorgenese und Progres-sion	Shao et al. [57]
OSCC	CASC9↑→ AKT/mTOR ↓ BCL2 ↑ BAX↓, LC3BII/LC3B1↓	verminderte Apoptose und Autophagie	Yang et al. [58]
Ovar-Ca	CASC9↑/miR755-3p↓/ LIN7A↑	Proliferation, Migration, In-vasion	Hu et al. [59]

CASC9 wurde erstmals im Plattenepithel des Ösophagus beschrieben. Dort ist die erhöhte CASC9 Expression in mehreren voneinander unabhängigen Studien bestätigt worden. Im Ösophaguskarzinom steht eine erhöhte CASC9 Expression in Zusammenhang mit Tumorstadium, -größe, und kurzer Überlebenszeit der Patienten und ist dort somit als Biomarker für Diagnose und Prognose zu betrachten [23-25].

Ebenso ist mittlerweile ein Mechanismus für die Wirkung von CASC9 im Ösophaguskarzinom vorgeschlagen worden. Demnach führt eine CASC9 Erhöhung über *CBP* und *H3K27* zu einer gesteigerten *LAMC2* Expression. Dadurch erfolgt die Phosphorylierung von *FAK* über Integrin $\alpha6\beta4$ und Laminin 332 mit einer erhöhten Aktivität des *PI3K/AKT* Signalweges.

Die Zusammenstellung in Tabelle 26 zeigt aber deutlich, dass man über die Wirkungsweise von CASC9 in Plattenepithelkarzinomen und anderen Tumorarten derzeit keine generellen Aussagen treffen kann.

Speziell für das *HNSCC* wäre es sicherlich sinnvoll, Knockdown- und Überexpressionsexperimente in einer größeren Anzahl von Zelllinien durchzuführen. Daraus ließe sich ableiten, ob *CASC9* allgemein im *HNSCC* keine entscheidenden Funktionen besitzt. Falls andere Zelllinien tatsächlich auf Knockdown oder Überexpression reagieren, könnte untersucht werden, welche Faktoren für die unterschiedliche Reaktion auf *CASC9* verantwortlich sind.

Zu bedenken ist darüber hinaus, dass lncRNAs sehr häufig stark kontextabhängig wirken [35]. Unterschiede zwischen verschiedenen Tumorarten wären von daher zu erwarten. Möglicherweise fehlt in *HNSCC* Zelllinien ein Kofaktor, der für die Wirkung von *CASC9* notwendig ist. Im Leberkarzinom wirkt *CASC9* beispielsweise über das RNA-bindende Protein *HNRPL*; wieweit diese Interaktion auch in anderen Tumorarten existiert und bedeutsam ist, ist unbekannt. Im Gegenteil sind in verschiedenen Publikationen zu verschiedenen Tumorentitäten ganz unterschiedliche Interaktionspartner und Wirkungsmechanismen für *CASC9* benannt worden (s. Tab. 26).

So wird zum Beispiel im Ösophaguskarzinom berichtet, dass *CASC9* einen Zellzyklusarrest über die Regulation von *PDCD4* auslöst. *PDCD4*, ein pro-apoptotisches Protein, wird demnach über das Zusammenspiel aus *CASC9* und der Histonmethyltransferase *EZH2* herabreguliert [25]. Im *HNSCC* korreliert die Expression von *PDCD4* jedoch nur schwach mit der von *CASC9* und wird durch die Modulation von *CASC9* in den Zelllinien nicht signifikant beeinflusst. Demnach lässt sich sagen, dass *PDCD4* keinen generellen Kofaktor für *CASC9* darstellt, sondern es tumorspezifische Unterschiede zu geben scheint. Ein weiteres Beispiel stellt die *CASC9* Regulation im Blasenkarzinom dar. In dieser Tumorentität führt eine erhöhte *CASC9* Expression zu einer verminderten Expression von *miR34a*. Die verminderte Expression dieser miRNA führt wiederum zu einer Erhöhung von *HNF4G*, was die Migration, Invasion und Proliferation der Tumorzellen beeinflusst [49]. Da *HNF4G* ein direktes Nachbargen von *CASC9* ist, liegt eine Coexpression der beiden Gene nahe.

Die Untersuchungen zur Funktion von *CASC9* in Tumoren sind wichtig, da man die direkten Auswirkungen von *CASC9* auf Gewebe abschätzen kann. Bei solchen Tumoren, in denen *CASC9* wichtige neoplastische Eigenschaften fördert, könnte die lncRNA nicht nur als Biomarker, sondern auch als Ansatzpunkt für Therapien dienen.

4.8 Überexpression von CASC9 in verschiedenen Tumorentitäten

Anhand der oben diskutierten Ergebnisse lässt sich festhalten, dass eine CASC9 Expression im Tumor mit vielen Auswirkungen auf die Zellen verbunden sein kann. Diese Auswirkungen sind allerdings nur in wenigen Tumorentitäten bereits tiefgehend erforscht (s. Tab. 26). Die vorgeschlagenen Wirkmechanismen sind oftmals unterschiedlich und müssten noch genauer verfolgt werden.

Nun bleibt noch eine entscheidende Frage ungeklärt: Woher rührt die Überexpression von CASC9 in Tumoren und welche Faktoren sind an ihr beteiligt? Diese Frage kann aktuell noch nicht abschließend geklärt werden. Untersuchungen aus dem Cervix-CA schlagen hierfür den TGF β -Signalweg vor, der für eine erhöhte CASC9 Expression sorgen soll; CASC9 wiederum aktiviert dann eine Signalkaskade über miR215 und *TWIST2*, was letztlich das Tumorwachstum sowie die Metastasierung des Tumors begünstigt [50]. Inwiefern sich dieser Regulationsmechanismus auf andere Tumore übertragen lässt, ist aktuell nicht geklärt und bedarf somit ebenfalls weiterer Untersuchungen.

4.9 Schlussfolgerung

Die wichtigste Fragestellung dieser Arbeit bestand darin, lncRNAs mit veränderter Expression im HNSCC zu finden, die sich als Biomarker eignen. Es gelang tatsächlich mit CASC9 eine sehr vielversprechende lncRNA zu identifizieren. Weiterhin wurde versucht, deren Wirkungen und Regulationsmechanismus in der Tumorgenese näher zu beleuchten. Allerdings waren die zellulären Effekte einer verstärkten CASC9 Expression im Zellkulturmodell begrenzt. In dieser Hinsicht bleiben einige Fragen offen. Es lässt sich bisher vermuten, dass CASC9 in Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals regelmäßig induziert wird, aber in diesen nicht als Treiber der Tumorentwicklung fungiert.

Dennoch eignet sich CASC9 als Biomarker. Im *HNSCC* ist CASC9 überexprimiert. Eine verstärkte CASC9 Expression in Tumoren von Kopf und Hals konnte in zwei unterschiedlichen Kohorten festgestellt werden.

Darüber hinaus ist CASC9 in diversen anderen Tumorarten überexprimiert. Wahrscheinlich eignet sich CASC9 insbesondere für die Detektion von Plattenepithelkarzinomen, unabhängig vom Ausgangsorgan.

Eine wichtige Frage für die Forschung in der Zukunft ist somit die Identifizierung möglicher Kofaktoren und ihr Zusammenspiel mit CASC9 in der Pathogenese des Plattenepithelkarzinoms von Kopf und Hals und anderen Plattenepithelkarzinomen. Offensichtlich sind weitere funktionelle Untersuchungen zu CASC9 notwendig, um den Mechanismus seiner Wirkung auf Zellen endgültig zu verstehen. Mit weiteren Untersuchungen, unterstützt vom Verständnis ihrer Regulation im Tumor, könnte sich die lncRNA CASC9 als Biomarker in der Früherkennung, Therapieplanung und evtl. Therapieindividualisierung von Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals etablieren.

5 *Literaturverzeichnis*

1. Rudert, H., Maligne Tumoren der Lippen, der Mundhöhle und des Oropharynx. Band 2, 1992, Otorhinolaryngologie in Klinik und Praxis, Thieme.
2. Stransky, N., et al., The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*, 2011. 333(6046): p. 1157-60.
3. Argiris, A., et al., Head and neck cancer. *The Lancet*, 2008. 371(9625): p. 1695-1709.
4. Pavon, M.A., et al., Gene expression signatures and molecular markers associated with clinical outcome in locally advanced head and neck carcinoma. *J.Carcinog*, 2012. 33(9): p. 1707-16.
5. Hoffmann, T.K., et al., Alterations in the p53 pathway and their association with radio- and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 2008. 44(12): p. 1100-9.
6. Cancer Genome Atlas Network, Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 2015. 517(7536): p. 576-82.
7. Leemans, C. R., et al., The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Rev. Canc.*, 2011. 11: p. 9-22.
8. Fang, Y. et al., Roles, functions, and mechanisms of long non-coding RNAs in cancer. *GPB*, 2016. 14(1): p. 42-54.
9. Fabbri, M., et al., Decrypting noncoding RNA interactions, structures, and functional networks. *Genome Res*, 2019.
10. Li, L.J., et al., Translation of noncoding RNAs: Focus on lncRNAs, pri-miRNAs, and circRNAs. *Exp Cell Res*, 2017. 361(1): p. 1-8.
11. Esteller, M., Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, 2011. 12(12): p. 861-74.
12. Sannigrahi, M.K., et al., Role of non-coding RNAs in head and neck squamous cell carcinoma: A narrative review. *Oral Dis*, 2018. 24(8): p. 1417-1427.
13. Kolenda, T., et al., Biological role of long non-coding RNA in head and neck cancers. *Rep Pract Oncol Radiother*, 2017. 22(5): p. 378-388.

14. Szell, M., et al., PRINS, a primate-specific long non-coding RNA, plays a role in the keratinocyte stress response and psoriasis pathogenesis. *Pflugers Arch*, 2016. 468(6): p. 935-43.
15. Iacoangeli, A., et al., Regulatory BC200 RNA in peripheral blood of patients with invasive breast cancer. *J Investig Med*, 2018. 66(7): p. 1055-1063.
16. Ren, D., et al., Novel insight into MALAT-1 in cancer: Therapeutic targets and clinical applications. *Oncol Lett*, 2016. 11(3): p. 1621-1630.
17. Kretschmer, A., et al., Molecular biomarkers and prognostic factors for prostate cancer. *Urologe A*, 2017. 56(7): p. 933-944.
18. Kretz, M., et al., Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature*, 2013. 493(7431): p. 231-5.
19. Ren, K., et al., Long noncoding RNA HOTAIR controls cell cycle by functioning as a competing endogenous RNA in esophageal squamous cell carcinoma. *Transl Oncol*, 2016. 9(6): p. 489-497.
20. Wang, P., et al., Long noncoding RNA NEAT1 promotes laryngeal squamous cell cancer through regulating miR-107/CDK6 pathway. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016. 35: p. 22.
21. Schroeder, A., et al., The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 2006. 7: p. 3.
22. Zou, A.E., et al., Transcriptome sequencing uncovers novel long noncoding and small nucleolar RNAs dysregulated in head and neck squamous cell carcinoma. *RNA*, 2015. 21(6): p. 1122-34.
23. Gao, G.D., et al., LncRNA CASC9 promotes tumorigenesis by affecting EMT and predicts poor prognosis in esophageal squamous cell cancer. *Eur. Rev. Med. and Pharmacol. Sci.*, 2018. 22: p. 422-42.
24. Pan, Z., et al., The long noncoding RNA CASC9 regulates migration and invasion in esophageal cancer. *Cancer Med*, 2016. 5(9): p. 2442-7.
25. Wu, Y., et al., Up-regulation of lncRNA CASC9 promotes esophageal squamous cell carcinoma growth by negatively regulating PDCD4 expression through EZH2. *Mol Cancer*, 2017. 16(1): p. 150.
26. Leemans, C.R., et al., The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, 2018. 18(5): p. 269-282.

27. Braakhuis, B.J., et al., Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst*, 2004. 96(13): p. 998-1006.
28. Olshan, A.F., et al., Alterations of the p16 gene in head and neck cancer: frequency and association with p53, PRAD-1 and HPV. *Oncotarget*, 1997. 14: p. 811-818.
29. Chau, N.G., et al., Incorporation of next-generation sequencing into routine clinical care to direct treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2016. 22(12): p. 2939-49.
30. Sun, W., et al., Activation of the NOTCH pathway in head and neck cancer. *Cancer Res*, 2014. 74(4): p. 1091-104.
31. Nyman, P.E., et al., Loss of function of canonical Notch signaling drives head and neck carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.*, 2018. 24(24): p. 6308-6318.
32. Qi, P., et al., Circulating long non-coding RNAs in cancer: current status and future perspectives. *Mol Cancer*, 2016. 15(1): p. 39.
33. Sahu, A., et al., Long noncoding RNAs in cancer: from function to translation. *Trends Cancer*, 2015. 1(2): p. 93-109.
34. Deveson, I.W., et al., The dimensions, dynamics, and relevance of the mammalian noncoding transcriptome. *Trends Genet*, 2017. 33(7): p. 464-478.
35. Yan, X., et al., Comprehensive genomic characterization of long non-coding RNAs across human cancers. *Cancer Cell*, 2015. 28(4): p. 529-540.
36. Schmitz, S.U., et al., Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell Mol Life Sci*, 2016. 73(13): p. 2491-509.
37. Schalken, J., et al., Potential utility of cancer-specific biomarkers for assessing response to hormonal treatments in metastatic prostate cancer. *Ther Adv Urol*, 2014. 6(6): p. 245-52.
38. Ohana, P., Use of H19 regulatory sequences for targeted gene therapy in cancer. *Int. J. Cancer*, 2002.
39. Ulitsky, I., et al., lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell*, 2013. 154(1): p. 26-46.
40. Gibb, E.A., et al., Long non-coding RNAs are expressed in oral mucosa and altered in oral premalignant lesions. *Oral Oncol*, 2011. 47(11): p. 1055-61.

41. Chen, M., et al., Identification of oncogenic long noncoding RNAs CASC9 and LINC00152 in oral carcinoma through genome-wide comprehensive analysis. *Anticancer Drugs*, 2019. 30(4): p. 356-362.
42. Zou, A.E., et al., The non-coding landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 2016. 7.
43. Wu, Y., et al., Long non-coding RNA HOTAIR promotes tumor cell invasion and metastasis by recruiting EZH2 and repressing E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 2015. 46(6): p. 2586-94.
44. Schipper, J.H., et al., E-Cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res.*, 1991. 51: p. 6328-6337.
45. Quinn, J.J. et al., Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet*, 2016. 17(1): p. 47-62.
46. Walter, V., et al., Molecular subtypes in head and neck cancer exhibit distinct patterns of chromosomal gain and loss of canonical cancer genes. *PLoS One*, 2013. 8(2): p. e56823.
47. Jing, L., et al., HOTAIR enhanced aggressive biological behaviors and induced radio-resistance via inhibiting p21 in cervical cancer. *Tumour Biol*, 2015. 36(5): p. 3611-9.
48. Zhou, J., et al., Long noncoding RNA CASC9.5 promotes the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma. *Sci Rep*, 2018. 8(1): p. 37.
49. Reyes Barron, C., et al., Novel 1.3 Mb germline duplication in chromosome 8q21.11 by microarray comparative genomic hybridization plus single nucleotide polymorphism analysis in an adult patient with pancytopenia and urinary bladder complications. *Clin Case Rep*, 2018. 6(10): p. 1947-1952.
50. Zhang, J., et al., Long non-coding RNA CASC9 enhances breast cancer progression by promoting metastasis through the mediation of miR-215/TWIST2 signaling associated with TGF-beta expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019. 515(4): p. 644-650.
51. Liang, Y., et al., LncRNA CASC9 promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis through upregulating LAMC2 expression by interacting with the CREB-binding protein. *Cell Death Differ*, 2018. 25(11): p. 1980-1995.

52. Li, X., et al., lncRNA CASC9 regulates cell migration and invasion in hemangioma endothelial cells by targeting miR-125a-3p/Nrg1. *Onco Targets Ther*, 2019. 12: p. 423-432.
53. Klingenberg, M., et al., The long noncoding RNA Cancer Susceptibility 9 and RNA binding protein heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L form a complex and coregulate genes linked to AKT signaling. *Hepatology*, 2018. 68(5): p. 1817-1832.
54. Gramantieri, L., et al., LncRNAs as novel players in hepatocellular carcinoma recurrence. *Oncotarget*, 2018.
55. Luo, K., et al., LncRNA CASC9 interacts with CPSF3 to regulate TGF-beta signaling in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019. 38(1): p. 249.
56. Shang, C., et al., Silence of cancer susceptibility candidate 9 inhibits gastric cancer and reverses chemoresistance. *Oncotarget*, 2017. 8: p. 15393-15398.
57. Shao, G., et al., lncRNA CASC9 positively regulates CHK1 to promote breast cancer cell proliferation and survival through sponging the miR195/497 cluster. *Int J Oncol*, 2019. 54(5): p. 1665-1675.
58. Yang, Y., et al., Increased expression of lncRNA CASC9 promotes tumor progression by suppressing autophagy-mediated cell apoptosis via the AKT/mTOR pathway in oral squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis*, 2019. 10(2): p. 41.
59. Hu, X., et al., Long noncoding RNA CASC9 promotes LIN7A expression via miR-758-3p to facilitate the malignancy of ovarian cancer. *J Cell Physiol*, 2019. 234(7): p. 10800-10808.
60. Ma, P., et al., Transcriptome analysis of EGFR tyrosine kinase inhibitors resistance associated long noncoding RNA in non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother*, 2017. 87: p. 20-26.
61. Yu, X., et al., Analysis of distinct long noncoding RNA transcriptional fingerprints in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Med*, 2017. 6(3): p. 673-680.

6 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei **Prof. Dr. Wolfgang Schulz** bedanken. Ich danke dir von Herzen für die Möglichkeit, in die Wissenschaft hereinzuschnuppern. Ich weiß, dass ich vielleicht nicht immer die einfachste Doktorandin war, aber du standest mir jederzeit bei offenen Fragen mit Rat und Tat zur Seite und hast die Arbeit stets mit deinen Ideen und Vorschlägen vorangetrieben.

Danke auch für deine strenge Hand, mit der du mich quasi gezwungen hast, direkt am Anfang mit der Verschriftlichung der Arbeit zu beginnen.

Dann bei der lieben **Frau Dr. Michèle Hoffmann** für ihre wahnsinnige Unterstützung von Beginn an. Ich bin als absolut unwissend ins Labor gekommen und du hast mich stets geleitet und immer unterstützt. Zusammen haben wir versucht die auftretenden Probleme zu lösen. Ohne dich wäre das alles ganz anders gelaufen.

Danke an **Frau Dr. Kathrin Scheckenbach** für die Unterstützung der Arbeit sowie für die Bereitstellung der Gewebeproben.

Danke an **Dr. Dimo Dietrich**- stellvertretend für die Hals-Nasen-Ohrenklinik des Universitätsklinikums Bonn- für die Gewebeproben aus Kopf-Halstumoren.

Danke an **Fr. Dr. Bianca Behrens**- stellvertretend für die chirurgische Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf- für die Gewebeproben.

Ein großes Dankeschön geht an das komplette Laborteam. Ich bin unendlich dankbar meine Doktorarbeit umgeben von so vielen tollen Menschen gemacht zu haben. Danke an **Wolfgang, Michèle, Johanna, Maggie, Marija, Maria, Alex, Alex, Alessandro, Anand, Makoto, Chanchai** und **Amp**. Besonders möchte ich **Christiane** danken, die mich nach meinem Freisemester noch unendlich unterstützt hat und ohne die ich wahrscheinlich bis heute noch nicht fertig wäre. Ich werde immer gerne an meine Doktorarbeitszeit zurückdenken.

Im gleichen Atemzug möchte ich **Johanna** hervorheben und danken. Ich weiß, dein erster Eindruck von mir war aufgrund meiner Glitzerschuhe etwas verfälscht, auch wenn ich mich gerade am Anfang ziemlich blöd angestellt habe.. Aber zusammen haben wir viel geschafft und du hast mir beigebracht, wie ich alles zu machen habe. Ohne dich könnte ich wahrscheinlich immer noch keine PCRs, geschweige denn Klonierungen! Wir hatten vor allem im Büro immer viel Spass, auch wenn ich des Öfteren am PC verzweifelt bin.

Im gleichen Büro saß auch die liebe **Maggie**. Auch dich habe ich mit meiner absoluten Unwissenheit bezüglich Internet und Computern stets belustigt. Du hast mir so manches Mal dahingehend aus der Patsche geholfen und ich habe zum Glück das Internet nicht gelöscht. Ich erinnere mich an viele lustige Situationen mit euch, vor allem in der Umbauzeit des Labors mit gewissen Handwerkern und schönen Geschenken ;).

Zudem bedanke ich mich beim Team des Forschungslabores der Hals-Nasen-Ohrenklinik der HHU. Danke an **Dr. Katrin Scheckenbach, Dr. Constanze Wiek** und **Prof. Dr. Helmut Hanenberg**.

Ich möchte mich herzlichst bei der **Düsseldorf School of Oncology** (DSO), vor allem bei **Prof. Dr. Wesselborg** und **Dr. Cornelia Höner**, für die finanzielle Unterstützung herzlichst bedanken.

All meinen Freunden und Wegbegleitern gilt ein großes Dankeschön. Ich war oft sehr frustriert, weil vieles nicht so lief wie geplant.. Aber ich konnte mich bei jedem Einzelnen immer ausweinen und habe stets die ein oder andere Schulter zum Anlehnen gehabt. Hervorheben möchte ich vor allem **Paulin, Julia** und **Christine**.

Paulin, die mich vom ersten Tag meines Studiums immer begleitet hat. Zusammen haben wir alle Hürden gemeistert und oft zusammen gelacht und auch geweint. Du warst mein Halt hier in Düsseldorf!

Dann meine liebe **Julia**. Wir haben zusammen die Oberstufe durchgestanden und durch dich ist diese Zeit eine Zeit, an die ich gerne zurück denke! Deine Unterstützung vor allem im Englisch-LK mit den Otten hat mir wahnsinnig geholfen, mich durch den großen Wald der englischen Literatur zu kämpfen.

Und natürlich **Christine**. Die wunderbarste Ärztin, die es nur geben kann. Du hast mir gezeigt, wofür es sich zu lernen lohnt. Durch dich weiß ich, dass Medizin nicht immer nur stupide und langweilig ist. Du hast mir gezeigt, dass man auch mit etwas fortgeschrittenem Alter auch super cool sein kann! Du bist mein Vorbild in so vielerlei Hinsichten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen **Eltern** und allen weiteren Familienmitgliedern, die mich so oft emotional und auch finanziell unterstützt haben. Ich danke euch für alles! Ihr habt für eure Kinder so sehr zurückgesteckt und seid so oft selbst auf der Strecke geblieben. Ich danke euch, dass ich studieren durfte und ihr mich die letzten fast 26 Jahre finanziell und emotional unterstützt habt. Ohne euch hätte ich das Studium wahrscheinlich nicht so schnell beenden können.

Vor allem danke ich meiner **Mama**. Du warst immer für mich da und hast mir versucht in jeder Lebenslage zu helfen. Ohne dich wäre ich nicht da wo ich jetzt bin. Du bist mein größtes Vorbild.

Und meiner geliebten Schwester **Louisa**. Zur Liebe unter Schwestern kann man nicht viel sagen. Du bist meine zweite Hälfte. Ich liebe dich unendlich.

Zuletzt möchte ich meinem geliebten **Ehemann Constantin** danken. Danke für die letzten Jahre und deine Unterstützung in jeder Lebenslage. Du hast mir immer beigestanden und mich vor allem aufgefangen, wenn es mal nicht so lief. Zusammen haben wir in den letzten Jahren viele gute, aber auch viele schlechte Zeiten mit Verlusten und Trauer durchlebt. Wir haben als Team alles gemeistert. Ich danke dir für deine Geduld und deine unendliche Liebe.

In der Hoffnung niemanden vergessen zu haben möchte ich zum Schluss allen anderen danken, die mich in den letzten Jahren unterstützt, und meine Dissertation vorangebracht haben.

Nun blicke ich nach über 3 $\frac{1}{2}$ Jahren voller Stolz auf diese Arbeit. An allen Höhen und Tiefen in dieser Zeit bin ich gewachsen und gereift. Habe gelernt nicht aufzugeben und trotz teils widriger Umstände positiv gestimmt zu sein, weil ich von allen Seiten unendliche Unterstützung erfahren habe.