

Molekularbiologische Charakterisierung und funktionelle Analyse des in Kopf-Hals- Tumoren überexprimierten Proteins OSF-2

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Andrea Schweitzer

Mainz, 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungen	X
1 Einleitung	1
1.1 Krebs	1
1.2 Tumor-Stroma-Interaktionen	2
1.3 Kopf- und Hals-Tumore	3
1.3.1 Epidemiologie	3
1.3.2 Risikofaktoren	4
1.3.3 Molekulare Heterogenität	6
1.3.4 Therapie	6
1.4 Osteoblast specific factor-2 (OSF-2)	7
1.4.1 OSF-2 - Struktur	7
1.4.2 OSF-2 - Expression in Normalgewebe	8
1.4.3 OSF-2 - Expression in Tumorgewebe	9
1.4.4 OSF-2 - Lokalisation in Tumorgewebe	9
1.4.5 OSF-2 - Protein-Interaktionen	11
1.4.6 Funktionelle Bedeutung von OSF-2	12
1.4.7 OSF-2 als Biomarker?	20
1.5 Zielsetzung der Arbeit	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Laborausstattung	23
2.1.1 Materialien	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3 Chemikalien	26
2.1.4 Enzyme	28
2.1.5 Größenmarker für die Elektrophorese	29
2.1.6 Vektoren	29
2.1.7 Bakterienstämme	29
2.1.8 Nukleinsäuren	29
2.1.9 Oligonukleotide	30
2.1.10 Antikörper	31
2.2 Lösungen, Medien und Puffer	32
2.2.1 Stammlösungen	32
2.2.2 Kulturmedien	32
2.2.3 Lösungen und Puffer	33
2.3 Verwendete Kits	35
2.4 Software/computergestützte Analysen	35

2.5	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.5.1	Herstellung kompetenter Zellen	36
2.5.2	Transformation von <i>E. coli</i>	36
2.5.3	Übernachtskulturen	37
2.5.4	<i>E. coli</i> Glycerin-Dauerkulturen.....	37
2.5.5	Isolation von Plasmid-DNA.....	37
2.5.6	Restriktionsverdau von DNA	37
2.5.7	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	37
2.5.8	DNA-Isolation aus Agarosegelen	38
2.5.9	Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen und von PCR-Produkten	38
2.5.10	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	38
2.5.11	Ligation von DNA.....	38
2.5.12	Dephosphorylierung von DNA am 5'-Ende	38
2.5.13	DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion	39
2.5.14	PCR-Screening nach positiven Klonen	39
2.5.15	Sequenzanalyse	40
2.5.16	Oligo-Annealing	40
2.5.17	Isolation von RNA aus Zellen und Geweben.....	40
2.5.18	Bestimmung der RNA-Konzentration und -Qualität.....	41
2.5.19	cDNA-Synthese	41
2.5.20	Sequenzierung von OSF-2-Isoformen (C-Terminus)	41
2.5.21	Real Time-PCR.....	41
2.5.22	Isolation genomischer DNA.....	42
2.5.23	HPV-Screen.....	42
2.6	Biochemische Methoden.....	42
2.6.1	Herstellung von Proteinlysat aus Zellkulturen	42
2.6.2	Isolation von Proteinen aus Tumor/Normalgewebe	43
2.6.3	Subzelluläre Fraktionierung.....	43
2.6.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	43
2.6.5	Ko-Immunpräzipitation.....	44
2.6.6	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE	44
2.6.7	Proteinnachweis mittels Coomassie-Färbung	45
2.6.8	Western-Blot (Immunoblot).....	45
2.6.9	Ponceau S-Färbung geblotteter Proteine.....	46
2.6.10	Entfernen von an Membranen gebundenen Antikörpern	46
2.7	Fluoreszenzmikroskopie.....	46
2.7.1	Immunfluoreszenzfärbung	47
2.7.2	Kernfärbung mit Hoechst 33342.....	47
2.7.3	Membranfärbung mit Rhodamin-WGA	47
2.8	Immunhistochemie	47
2.9	Zellkultur.....	48

2.9.1	Kultivierung von Säugerzellen.....	48
2.9.2	Behandlung eukaryotischer Zellen	48
2.9.3	Transfektion eukaryotischer Zellen	48
2.9.4	Herstellung konditionierten Mediums	49
2.9.5	Isolation primärer Zellen aus humanem oder murinem Tumorgewebe	49
2.9.6	Separation primärer Tumorzellen und Tumor-assoziiertes Fibroblasten.....	49
2.9.7	Isolation muriner Fibroblasten	49
2.10	Funktionelle Assays	49
2.10.1	Viabilitäts-Assay	49
2.10.2	Wundheilungs-Assay ("Scratch"-Assay).....	50
2.10.3	PI3-Kinase-Inhibitor-Assay	50
2.10.4	Zellüberleben bei Serumentzug.....	50
2.10.5	Tumorsphären-Formations-Assay	50
2.10.6	Inverser Adhäsionsassay.....	51
2.11	Xenograft-Versuche	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Untersuchungen zur Expression von OSF-2.....	52
3.1.1	OSF-2-Expression in Tumor- versus Normalgewebe	52
3.1.2	Immunhistochemie PEK OSF-2	53
3.1.3	OSF-2-Expression in Zelllinien	54
3.1.4	Validierung der Real Time-Ergebnisse.....	55
3.1.5	OSF-2-Expression in Osteblastenscaffolds.....	56
3.1.6	OSF-2-Expression in der embryonalen Wachstumsfuge	57
3.2	Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von OSF-2.....	59
3.2.1	OSF-2-GFP-Lokalisation in Zelllinien	59
3.2.2	Identifizierung eines N-terminalen Sekretionssignals und Klonierung einer Sekretionsmutante	61
3.2.3	Klonierung und Lokalisation von Deletionskonstrukten.....	64
3.2.4	Subzelluläre Lokalisation von OSF-2-GFP und OSF-2- Δ Sek-GFP	65
3.3	Untersuchungen zur OSF-2-Multimerisierung und der Isoformen von OSF-2.....	65
3.3.1	Multimerisierung: Ko-Immunpräzipitation	65
3.3.2	Untersuchung der OSF-2-Isoform-Expression	66
3.4	Funktionelle Charakterisierung von OSF-2	68
3.4.1	Proliferationsassay	68
3.4.2	Wundheilungs-Assay ("Scratch"-Assay).....	69
3.4.3	Zellüberlebens-Assay	70
3.4.4	Inverser Adhäsionsassay	71
3.4.5	PI3-Kinase-Inhibitor-Assay	72
3.5	Beteiligung von OSF-2 an intrazellulären Signalwegen	73
3.6	Rolle von OSF-2 in der EMT	76
3.7	Untersuchung der Auswirkung einer OSF-2-Expression auf das Tumorstadium <i>in vivo</i> ...	77

3.8	OSF-2-Expression in primären Tumorzellen und TAFs	78
3.8.1	Isolation und Charakterisierung primärer Tumorzellen und TAF	78
3.8.2	Separation primärer Tumorzellen und TAFs	79
3.8.3	Immunfluoreszenzanalyse primärer Tumorzellen und TAFs.....	80
3.8.4	Transfektion von EpCAM-GFP in primäre Tumorzellen.....	81
3.8.5	Wundheilungs-Assay ("Scratch"-Assay).....	82
3.8.6	Tumorsphären-Formations-Assay	83
3.8.7	Zellüberleben bei Serumentzug	84
3.8.8	FISH (Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung)	85
3.8.9	RNA- und microRNA-Isolation und Microarray.....	87
3.8.10	Analyse der mRNA-Expression in Tumorzellen und TAFs.....	88
3.8.11	OSF-2-Expression in primären Tumorzellen	89
3.8.12	Untersuchung der Tumorigenität der isolierten Tumorzellen am subkutanen Xenograft-Mausmodell.....	90
3.8.13	Tumorinitiation und –wachstum <i>in vivo</i>	90
3.8.14	Isolation muriner Tumorzellen, Fibroblasten und TAF	91
3.8.15	RNA- und microRNA-Isolation muriner Fibroblasten, Tumorzellen und Tumor-assoziiierter Fibroblasten	92
3.8.16	Vergleich der OSF-2-Isoform-Expression primärer Tumorzellen und TAFs	93
3.8.17	<i>In vivo</i> -Untersuchung der Tumorinitiation und des Tumorwachstums CD133 ⁺ -angereicherter Zellen.....	94
3.8.18	OSF-2 RT PCR CD133-positiver Tumor and TAFs.....	97
3.8.19	Virus-Screen	97
3.9	Ausblick: Vermittlung der Zelladhäsion durch Implantat-Beschichtung mit rOSF-2	98
4	Diskussion	100
4.1	OSF-2 - Expression.....	100
4.2	OSF-2 - Lokalisation.....	103
4.3	OSF-2 - Multimerisierung	104
4.4	OSF-2 - Isoformen.....	105
4.5	Funktionelle Charakterisierung.....	106
4.6	Die Rolle von OSF-2 in der Signaltransduktion.....	110
4.7	OSF-2-Expression in Tumorzellen und TAFs	112
4.8	Charakterisierung einer humanen Tumorzelllinie.....	113
4.9	Xenograft-Versuche der humanen Tumorzelllinie.....	115
4.10	Vermittlung der Zelladhäsion durch Implantat-Beschichtung mit rOSF-2.....	117
5	Zusammenfassung	118
6	Literaturverzeichnis	120
7	Anhang	131
7.1	Sequenzen	131
7.1.1	OSF-2-fl-Sequenz.....	131
7.1.2	Als OSF-2-wt publizierte Sequenz Q15063-1 (UniProtKB/Swiss-Prot).....	132

7.1.3	OSF-2-Sekretionssignal	133
7.2	Originaldaten zur endogenen OSF-2-Expression in Zelllinien und Primärzellen mittels Real Time-PCR	133
7.3	Originaldaten zur Auswirkung der OSF-2-Expression auf das Tumorzellen <i>in vivo</i>	134
7.4	Vektoren	134
7.4.1	pGEM T easy	134
7.4.2	pcDNA3 (+)	135
7.4.3	pF143-mCherry	135
	Eidesstattliche Erklärung	136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Erweiterung des 2000 von Hanahan & Weinberg postulierten Modells zur Charakterisierung von Tumorzellen.....	2
Abbildung 1.2: Lebenszyklus humaner Papillomaviren.....	5
Abbildung 1.3: Mechanismus der kotranslationalen Proteintranslokation.....	10
Abbildung 1.4: Modell der PI3K-Akt-Signaltransduktion nach Vivanco.....	13
Abbildung 1.5: Aufbau eines fokalen Adhäsionskontaktes nach Mitra.	19
Abbildung 3.1: OSF-2-Expression in Tumor- und Normalgewebe des jeweils selben Patienten	52
Abbildung 3.2: OSF-2-Expression und -Lokalisation in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Schnitten..	53
Abbildung 3.3: Endogene OSF-2-Expression in verschiedenen Zelllinien.....	55
Abbildung 3.4: Expression und Lokalisation von OSF-2 in glatten Gefäßmuskelzellen	56
Abbildung 3.5: Endogene OSF-2-Expression in Osteoblasten	56
Abbildung 3.6: OSF-2-Expression und -Lokalisation in Osteoblastenscaffolds.	57
Abbildung 3.7: Aufbau einer embryonalen Wachstumsfuge.	58
Abbildung 3.8: OSF-2-Expression und -Lokalisation innerhalb der humanen embryonalen Wachstumsfuge	59
Abbildung 3.9: OSF-2-GFP-Lokalisation in verschiedenen Zelllinien.	60
Abbildung 3.10: Nachweis der spezifischen Detektion von OSF-2 in Immunfluoreszenzfärbungen mittels eines gegen OSF-2 gerichteten Antikörpers	60
Abbildung 3.11: Nachweis der spezifischen Detektion von OSF-2 in Immunfluoreszenzfärbungen mittels eines gegen OSF-2 gerichteten Antikörpers.	61
Abbildung 3.12: Bioinformatische Vorhersage eines N-terminalen OSF-2-Sekretionssignals.	61
Abbildung 3.13: Schematische Darstellung von OSF-2-wt, der OSF-2-Sekretionsmutante, sowie des klonierten Sekretionssignals.	62
Abbildung 3.14: Untersuchungen zur Lokalisation der OSF-2-Sekretionsmutante sowie des Sekretionssignals Sek-GFP	62
Abbildung 3.15: Untersuchung zur Sekretion von OSF-2-wt-GFP und OSF-2 Δ Sek-GFP.....	63
Abbildung 3.16: Proteinbiochemischer Nachweis der OSF-2-Sekretion.....	63
Abbildung 3.17: Schematische Darstellung der klonierten und transfizierten OSF-2-Deletionskonstrukte.....	64
Abbildung 3.18: Untersuchungen zur Lokalisation von OSF-2-Deletionskonstrukten in Hela-Zellen ...	64
Abbildung 3.19: Subzelluläre OSF-2-Lokalisation OSF-2-GFP und OSF-2- Δ Sek-GFP-exprimierender Zellen.	65
Abbildung 3.20: Immunpräzipitation von OSF-2-Stop- und OSF-2-GFP-transfizierten 293T-Lysaten. 66	
Abbildung 3.21: Schematische Darstellung des C-terminalen OSF-2-Bereiches (aa 569-789), der zur Bestimmung der jeweiligen Isoformen amplifiziert und sequenziert wurde.....	67
Abbildung 3.22: Vergleichende Untersuchung der OSF-2-Isoform-Expression in (A) humanem Tumor-, Metastasen- und Normalgewebe des gleichen Patienten sowie (B) unterschiedlichen Zelllinien. 67	

Abbildung 3.23: Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit von Fadu-Zellen in An- und Abwesenheit rekombinanten OSF-2-Proteins	69
Abbildung 3.24: Untersuchung des Migrationsverhaltens von Fadu-Zellen in rOSF-2-haltigem Medium	70
Abbildung 3.25: Untersuchung des Einflusses von rOSF-2 (100 ng/ml) auf das Überleben von Fadu-Zellen	71
Abbildung 3.26: Untersuchung des Einflusses von OSF-2 bzw. OSF-2 Δ Sek auf die Ablösungsgeschwindigkeit von Zellen vom Substrat.....	72
Abbildung 3.27: Untersuchung zur Inhibition der PI3-Kinase. Erläuterungen s. Text.....	73
Abbildung 3.28: Immunfluoreszenzfärbung von Hela-Zellen	74
Abbildung 3.29: Graphische Darstellung der Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung nach Inkubation von Hela-Zellen mit Insulin (100 nM), rOSF-2 (100 ng/ml), konditioniertem Medium oder einem PI3K-Inhibitor (10 nM).....	74
Abbildung 3.30: Proteinbiochemischer Nachweis der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden in Kopf-Hals-Tumorzellen (HNCCUM-01T)	75
Abbildung 3.31: Untersuchung des Einflusses von OSF-2 auf die EMT.....	76
Abbildung 3.32: Untersuchung des Einflusses von OSF-2 auf die EMT.....	77
Abbildung 3.33: Einfluß der OSF-2-Expression auf das Tumorstadium <i>in vivo</i>	78
Abbildung 3.34: Isolation und Separation primärer Tumorzellen und TAFs	79
Abbildung 3.35: Untersuchung der primären Tumorkultur auf mögliche Verunreinigungen durch Fibroblasten	80
Abbildung 3.36: Untersuchung der primären Tumorkultur auf mögliche Fibroblasten-Verunreinigungen und Nachweis epithelialer Marker.....	81
Abbildung 3.37: Vergleich der Lokalisation endogenen EpCAMs mit der Lokalisation von EpCAM-GFP nach transienter Transfektion in primäre Tumorzellen	82
Abbildung 3.38: Untersuchung der Migrationsgeschwindigkeit von StauMa-Zellen	83
Abbildung 3.39: Untersuchung der Fähigkeit zur Sphäroidbildung.	84
Abbildung 3.40: Untersuchung des Zellüberlebens bei Serumentzug	85
Abbildung 3.41: Nachweis chromosomaler Aberrationen in StauMa-Zellen.....	86
Abbildung 3.42: Analyse der isolierten RNA und microRNA.....	87
Abbildung 3.43: Graphische Übersichtsdarstellung der Microarray-Ergebnisse.....	88
Abbildung 3.44: Validierung der Microarray-Ergebnisse hinsichtlich der OSF-2-Expression primärer Tumorzellen und Tumor-assoziiertes Fibroblasten.	88
Abbildung 3.45: Nachweis der OSF-2-Expression in primären Tumorzellen	89
Abbildung 3.46: Nachweis der OSF-2-Expression in primären Tumorzellen.....	90
Abbildung 3.47: Untersuchung der Tumorigenität der isolierten Tumorzellen in Thymus-negativen Nacktmäusen	91
Abbildung 3.48: Lichtmikroskopaufnahmen isolierter Fibroblasten, Tumorzellen und Tumor-assoziiertes Fibroblasten nach Isolation aus Mausgewebe.....	92
Abbildung 3.49: Untersuchung der Reinheit der isolierten murinen Tumorzellpopulation.	92
Abbildung 3.50: Analyse der isolierten murinen RNA und microRNA.....	93

Abbildung 3.51: Untersuchung der OSF-2-Isoform-Expression primärer Tumorzellen und TAF.	94
Abbildung 3.52: Untersuchung der Tumorigenität der CD133 ⁺ - und CD133 ⁻ -StauMa-Zellen in Thymus-negativen Nacktmäusen	95
Abbildung 3.53: Nachweis der CD133-Expression in Xenografttumoren.	96
Abbildung 3.54: Immunfluoreszenzanalyse muriner Tumorzellen nach Isolation aus CD133-positivem Tumorgewebe	97
Abbildung 3.55. Analyse zum spezifischen Nachweis von Papillomaviren in humanen Tumorzellen..	97
Abbildung 3.56: Verbesserung der Zelladhäsion durch Beschichtung von Metallplättchen mit rOSF-2.	98
Abbildung 4.1: Überblick über die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden durch Integrine und/oder Wachstumsfaktorrezeptoren nach Guo	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Risikofaktoren für Kopf-Hals-Tumore	5
Tabelle 2.1: Oligonukleotide für die Sequenzierung	30
Tabelle 2.2: Oligonukleotide für die Klonierung.....	30
Tabelle 2.3: Oligonukleotide für RT-PCR und Real Time-PCR.....	30
Tabelle 2.4: Oligonukleotide für das Oligoannealing.....	31
Tabelle 2.5: Oligonukleotide für den Virus-Screen.....	31
Tabelle 2.6: Primärantikörper	31
Tabelle 2.7: Sekundärantikörper	32
Tabelle 2.2.8: Verwendete Stammlösungen	32
Tabelle 2.2.9: Verwendete Software	35
Tabelle 3.1: Verwendete humane Zelllinien zur Untersuchung der endogenen OSF-2-Expression	54
Tabelle 7.1: Real Time-Daten zur endogenen OSF-2-Expression.....	133
Tabelle 7.2: Auswirkung der OSF-2-Expression auf das Tumolvolumen <i>in vivo</i>	134

Abkürzungen

5-FU	5-Fluorouracil
α	Anti, Alpha
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BAD	“Bcl-2-antagonist of cell death”
BiP	“binding protein”
BMP	“bone morphogenic protein”
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Zirca
CDK	“cyclin-dependent kinase”
cDNA	Komplementäre DNA
CGH	“comparative genomic hybridization”
CIP	“calf intestinal phosphatase”
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cy3	Carbocyanin 3
Δ	Delta
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	“epidermal growth factor receptor”
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
EpCAM	“epithelial cell adhesion molecule”
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	“extracellular signal-related kinase”
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FAS1	Fascilin1
FGF	“fibroblast growth factor”
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl	“full-length”
Flk	“fetal liver kinase”
FOXO	“forkhead box O3”
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
fwd.	“forward”
<i>g</i>	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HNSCC	“head and neck squamous cell carcinoma”
HPV	Humane Papillomaviren
HRP	“horseradish peroxidase”
IP	Immunpräzipitation
λ	Lambda, Wellenlänge
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KDR	“kinase insert domain receptor”
KO	“knock out”
l	Liter
LB	Luria-Broth
MACS	“magnetic cell sorting”
MDM2	“murine double minute oncogene”
MEK	“mitogen-activated protein kinase kinase”
MLCK	“myosin light chain kinase”
MMP	Matrix-Metalloproteinase
N	Normalgewebe
n	Nano-, 10^{-9}
NEB	New England Biolabs
nm	Nanometer (m^{-9})
NSCLC	“non small cell lung carcinoma”
OD	Optische Dichte
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei $\lambda=600$ nm
OSF-2	“osteoblast specific factor-2”
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	“phosphate buffered saline”
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	“pancreatic ductal adenocarcinoma”
PDK1	“phosphoinositide-dependent protein kinase 1”
PDK2	“phosphoinositide-dependent protein kinase 2”
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd

PHLPP	“PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase”
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-diphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PT	Primär-Tumor
PtdIns-3,4,5-P ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PTEN	“phosphatase and tensin homolog”
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAS	RAt Sarkoma
rev.	“reverse”
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROCK	“rho-associated serine/threonine kinase”
rpm	“rounds per minute”
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOB	“super optimal broth”
SPT	“second primary tumor”
SRP	“signal recognition particle”
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
TAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
TGF	“transforming growth factor”
TNM	“tumor-nodes-metastases”
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
μ	Mikro-, 10 ⁻⁶
U	Unit
u.a.	Unter anderem
ü. N.	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	“vascular endothelial growth factor”
VSMC	“vascular smooth muscle cells”
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
x	-Mal, -Fach

1 Einleitung

1.1 Krebs

Krebserkrankungen zählen nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zu den häufigsten Todesursachen. Allein im Jahr 2008 starben laut Statistischem Bundesamt in Deutschland 216.010 Menschen an einem Krebsleiden. Hierbei waren bei Männern vor allem Krebserkrankungen der Verdauungs (37.058 Sterbefälle)- und Atmungsorgane (31.094 Sterbefälle) von Bedeutung. Bei Frauen dominierten neben Tumoren der Verdauungsorgane (31.618 Sterbefälle) bösartige Neubildungen der Brustdrüse (17.209 Sterbefälle) (Statistisches Bundesamt 2011).

Als Krebs bezeichnet man eine Gruppe von mehr als 100 Krankheitsbildern, bei der die Regulation von Zellproliferation, -differenzierung und Zelltod gestört ist (Wyllie 1997; Hanahan & Weinberg 2000). Hauptursachen für diese Deregulation sind karzinogene Noxen, familiäre Dispositionen und Virusinfektionen, wobei das Erkrankungsrisiko mit dem Alter steigt (Renan 1993; Vogelstein & Kinzler 1993). Obwohl Krebs eine genetische Erkrankung darstellt, führt eine einzelne Mutation nicht zur Transformation einer normalen Zelle in eine Krebszelle. Vielmehr erlangen Tumorzellen ihre charakteristischen physiologischen Eigenschaften schrittweise durch genetische Veränderungen, wobei die genaue Anzahl der Ereignisse, die zur Bildung eines malignen Tumors erforderlich sind, nicht bekannt ist (Renan 1993).

Bei dem inzwischen anerkannten Mehrstufenmodell der Tumorgenese geht man davon aus, dass eine bestimmte genetische Veränderung der Zelle einen Wachstumsvorteil verschafft und darauf folgende weitere genetische Veränderungen die stufenweise Transformation einer normalen Zelle zu einer Tumorzelle vorantreiben (Vogelstein & Kinzler 1993). Diese Transformation kann im Laufe der Zeit geschehen oder durch äußere Einflüsse beschleunigt werden. Einige dieser genetischen Veränderungen können auch vererbt werden, so dass das Krebsrisiko in diesen Familien steigt. Zu den für Tumorzellen charakteristischen Eigenschaften gehören, einem von Hanahan & Weinberg postulierten Modell zufolge, ein unlimitiertes Replikationspotential, die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren, die Fähigkeit zur Invasierung, Metastasierung und dauerhaften Angiogenese, sowie die Fähigkeit zur Evasion der Apoptose (Hanahan & Weinberg 2000). Der Tumor benötigt für seine Entwicklung außerdem eine inflammatorische Mikroumgebung, die u.a. Proliferation, Angiogenese, Metastasierung und das Überleben der Krebszellen fördert (Mantovani 2009) (s. Abbildung 1.1).

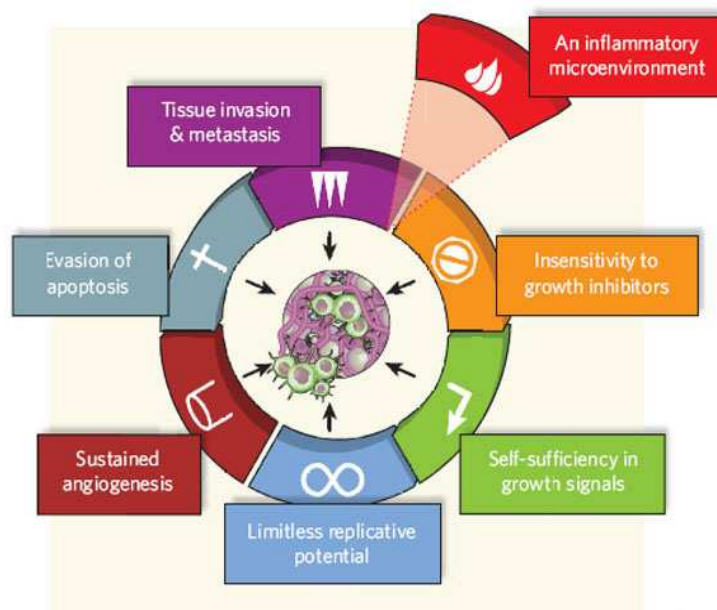


Abbildung 1.1: Erweiterung des 2000 von Hanahan & Weinberg postulierten Modells zur Charakterisierung von Tumorzellen (Hanahan & Weinberg 2000): Neben den von Hanahan & Weinberg postulierten charakteristischen Eigenschaften von Tumorzellen benötigt der Tumor für seine Entwicklung eine inflammatorische Mikroumgebung, die u.a. Proliferation, Angiogenese, Metastasierung und das Überleben der Krebszellen fördert (Mantovani 2009).

1.2 Tumor-Stroma-Interaktionen

Maligne Tumore stellen komplexe Gewebe dar, die nicht nur aus Tumorzellen, sondern aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen bestehen. Diese Zelltypen stehen sowohl untereinander als auch mit der Extrazellulärmatrix (ECM) und löslichen Komponenten in ihrer näheren Umgebung in Verbindung. Die Tumor-Mikroumgebung, das sogenannte Tumorstroma, kann maßgeblich an Tumoringenition, -progression und Metastasierung beteiligt sein (Liotta & Kohn 2001; Tlsty & Coussens 2006). Das Tumorstroma unterscheidet sich von der Mikroumgebung anderer Organe insofern, dass es in konstitutiv aktivem Zustand vorliegt, wobei die Krebszellen selbst das Stroma aktivieren und so eine Tumorprogression begünstigen können. Tumorzellen produzieren Wachstumsfaktoren und Proteasen, die Angiogenese (Bergers & Benjamin 2003) und Entzündungsreaktionen (Coussens & Werb 2002) induzieren und die Zellen des Tumorstromas zur Sekretion weiterer Wachstumsfaktoren und Proteasen anregen (Mueller & Fusenig 2004). Die aktivierte Tumor-Mikroumgebung stimuliert wiederum Tumorzellen zur Sekretion proteolytischer Enzyme (Stetler-Stevenson & Yu 2001; Mueller et al. 2003), die die Extrazellulärmatrix remodellieren, was zu migrations- und invasionsfördernden Wachstumsbedingungen führt. Zu den modifizierten Zellen des Tumorstromas, die Extrazellulärmatrix-Proteine und Wachstumsfaktoren sezernieren (Bhowmick & Moses 2005), zählen konstitutiv aktive

Fibroblasten, Blutgefäßzellen (Perizyten, endotheliale Zellen), sowie Immunzellen (Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen).

Fibroblasten stellen normalerweise den Hauptbestandteil des Bindegewebes dar und sind durch eine geringe Proliferationsrate und eine geringe metabolische Aktivität gekennzeichnet. Sie synthetisieren viele Bestandteile der Extrazellulärmatrix wie Kollagen, Laminin und Fibronectin (Rodemann & Muller 1991; Brown et al. 2006) und sind an der Regulation von Entzündungsreaktionen und Wundheilungsprozessen beteiligt (Tomasek et al. 2002; Parsonage et al. 2005). Wie anhand von Genexpressionsanalysen gezeigt werden konnte, ähneln Tumor-assoziierte Fibroblasten aktivierten Fibroblasten im „reaktiven Stroma“ der Wundheilung (Chang et al. 2004). Tumore wurden daher auch häufig als „Wunden, die nie heilen“ bezeichnet (Dvorak 1986). Bereits 1889 wurde von Stephen Paget postuliert, dass die Umgebung („soil“) das Metastasierungsverhalten epithelialer Tumorzellen beeinflusst („seed and soil“-Hypothese) (Paget 1989). Im Unterschied zum Tumorwachstum limitiert sich die Reparatur des Gewebes jedoch selbst. Aktivierte Fibroblasten sekretieren vermehrt Extrazellulärmatrixbestandteile sowie Wachstumsfaktoren, proangiogene Faktoren und Matrix-Metalloproteinasen, die sowohl die Wundheilung, als auch die Tumorprogression begünstigen (Xouri & Christian). Wie wichtig die Rolle der Tumor-assoziierten Fibroblasten für die Tumorprogression ist, konnte durch Korrelation des Genexpressionsprofils isolierter TAFs aus Mammakarzinomen mit dem Krankheitsverlauf gezeigt werden. Das Genexpressionsprofil des Gesamt-Tumorgewebes konnte diesen Zusammenhang hingegen nicht wiedergeben (Finak et al. 2008). Auch konnte mehrfach gezeigt werden, dass Tumor-assoziierte Fibroblasten zur Transformation und Immortalisierung von Epithelzellen beitragen (Olumi et al. 1999; Barcellos-Hoff & Ravani 2000; Hayward et al. 2001; Kuperwasser et al. 2004).

Immunzellen fördern u.a. durch Sekretion von Chemokinen, Zytokinen, Serin-, Cystein- und Metalloproteinasen eine Mikroumgebung, die die maligne Konversion und Tumorentstehung begünstigt (Coussens & Werb 2002; Tlsty & Coussens 2006).

Perizyten und endotheliale Zellen spielen hingegen eine wichtige Rolle in der Neovaskularisierung des Tumorgewebes und in der Resistenz gegen anti-angiogene Therapien (Morikawa et al. 2002; Li et al. 2007).

1.3 Kopf- und Hals-Tumore

1.3.1 Epidemiologie

Im Jahr 2004 lebten in Deutschland etwa 25.600 Männer und 9.900 Frauen mit einer maximal fünf Jahre zurückliegenden Diagnose einer Krebserkrankung von Mundhöhle und Rachen. Für 2010 wurde die 5-Jahres-Prävalenz ebenfalls auf 25.900 Männer und 10.400 Frauen geschätzt (Robert-Koch-Institut 2010). Krebserkrankungen im Kopf-Hals-Bereich gehören zu den sechsthäufigsten Malignomerkkrankungen weltweit (Kamangar et al. 2006). Jährlich werden weltweit etwa 600.000 Neuerkrankungen diagnostiziert, wobei das 5-Jahres-Überleben bei

50-60% liegt (Leemans et al.). Je nach Ursprungsgewebe unterscheidet man hier Karzinome, die sich von Schleimhäuten entwickeln, Lymphome, die im lymphatischen Gewebe entstehen, und Sarkome, die sich vom Binde- und Stützgewebe ableiten. Zu den Kopf-Hals-Tumoren zählen u.a. Tumore des Rachens (lat.: Pharynx), des Kehlkopfes (lat.: Larynx), der Lippe und der Mundhöhle, wobei es sich überwiegend um Plattenepithelkarzinome handelt, die aus der sich dort befindenden Schleimhaut hervorgehen (Pai & Westra 2009). Innerhalb der Gruppe der Kopf-Hals-Tumore werden die in Europa eher seltenen Tumore der Speicheldrüsen und der Nasen- und Kieferhöhlen aufgrund ihrer unterschiedlichen Ätiologie, Histologie und Therapie gesondert behandelt (Speight & Barrett 2002). Auch Tumore der Schilddrüse nehmen, obwohl sie anatomisch zum Hals gehören, eine Sonderstellung ein (Enewold et al. 2009; Takes et al. 2010; Nikiforov 2011).

1.3.2 Risikofaktoren

Zu den Hauptrisikofaktoren für Tumore im Kopf-Hals-Bereich zählen exogene Noxen wie der Konsum von Tabak, vor allem in Kombination mit hochprozentigem Alkohol, der hierbei wahrscheinlich als Lösungsmittel für die im Zigarettenrauch befindlichen Kanzerogene dient (Pai & Westra 2009). In Tabakrauch sind mehr als 60 karzinogene Stoffe enthalten, darunter tabak-spezifische Nitrosamine, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und aromatische Amine (Hecht 2003). Das Risiko einer Krebserkrankung ist bei starkem Tabakkonsum in Verbindung mit Alkohol sogar höher, als die Summe der Einzelrisiken vermuten ließe („Additiver Effekt“) (Pai & Westra 2009). Bereits der orale Genuss von Tabak (Kautabak) stellt ein Krebsrisiko dar (Proia et al. 2006). Auch der (berufliche) Umgang mit Schadstoffen (Asbest, chrom- und nickelhaltige Farben und Lacke, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) begünstigt die Entstehung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich (Hernberg & Kurppa 1983); (Hayes et al. 1986); (Pai & Westra 2009). Weitere Risikofaktoren sind schlechte Mundhygiene sowie eine unausgewogene Ernährung (Pai & Westra 2009; Meurman 2010).

Auch verschiedene Virusinfektionen werden inzwischen mit Kopf-Hals-Tumoren in Verbindung gebracht, so beispielsweise der Epstein-Barr-Virus sowie der humane Papillomavirus (Marur & Forastiere 2008).

Humane Papillomaviren bilden eine Gruppe von mehr als 100 Typen epitheliotropher, doppelsträngiger DNA-Viren, die Hauptauslöser von Gebärmutterhalskrebs sind (Walboomers et al. 1999; zur Hausen 2002) und häufig mit Tumoren im Nasen- und Rachenbereich assoziiert werden (Gillison & Shah 2001; Syrjanen 2005; Pai & Westra 2009). Man unterscheidet HPV-positive von HPV-negativen Kopf-Hals-Tumoren (Schlecht et al. 2007), wobei HPV-positive Tumore einen besseren klinischen Verlauf zeigen (Gillison et al. 2000; Leemans et al.). Die HPV-Infektion zählt inzwischen zu einem wichtigen Risikofaktor für Tumore im Kopf-Hals-Bereich (zur Hausen 2002)(s. Abbildung 1.2).

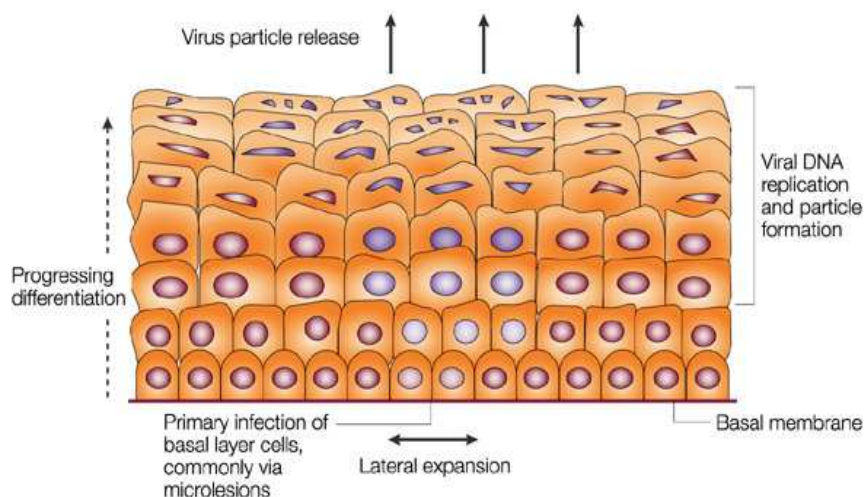


Abbildung 1.2: Lebenszyklus humaner Papillomaviren (zur Hausen 2002). Humane Papillomaviren infizieren epitheliale Zellen, wobei sich die infizierten Bereiche durch Proliferation der Epithelzellen lateral ausbreiten. In diesen Zellen wird die virale Genexpression weitestgehend unterdrückt. Die Expression einiger früher, viraler Gene führt jedoch zu einer Deregulation des Zellzyklus sowie einer verstärkten Proliferation der infizierten Zellen, was als Beginn der HPV-vermittelten Karzinogenese betrachtet wird. Im Zuge der Differenzierung dieser Zellen wird der Virus aktiviert, virale DNA repliziert und Capsidproteine gebildet. Es folgt die Bildung von Viruspartikeln, die freigesetzt werden und wiederum Zellen infizieren können.

Tabelle 1.1: Risikofaktoren für Kopf-Hals-Tumore, verändert nach (Marur & Forastiere 2008)

Risikofaktoren für Kopf-Hals-Tumore

Substanzkonsum

- Tabak
- Alkohol
- Tabak und Alkohol („Additiver Effekt“)

Ernährung

- Vitamin A-Mangel
- Eisenmangel (in Verbindung mit dem Plummer-Vinson-Syndrom)

Viren

- Humaner Papillomavirus (Typ 16/18/31)
- Epstein-Barr-Virus

Gelegentliche Exposition

- Asbest
- Nickel
- Chrom
- Radium
- Nebenprodukte von Holzarbeiten und Gerbungen

1.3.3 Molekulare Heterogenität

Obwohl 95% der Kopf-Hals-Tumore zu den Plattenepithelkarzinomen zählen, handelt es sich hierbei um eine äußerst heterogene Tumorentität. Dies erschwert die Prognose, Behandlung und Identifikation der molekularen Grundlagen der Krebsentstehung. Kopf-Hals-Tumore können nicht nur auf histologischer (Woolgar & Triantafyllou 2009), sondern auch auf molekularer Ebene in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Anhand von Expressionsanalysen konnten bereits vier Gruppen ermittelt werden (Chung et al. 2004). Weitere genetische Analysen und Rezidiv-abhängige Expressionsprofile führten zu spezifischeren Klassifizierungen (Chung et al. 2006) und zur Ermittlung weiterer Gruppen. Zu den wichtigsten Einteilungen zählt hier die Unterscheidung HPV-positiver und HPV-negativer Tumore. Auch konnte mittels Karyotyping und Ploidy-Analyse nachgewiesen werden, dass ein Großteil der Tumore aneuploid ist (Hermsen et al. 2001; Jin et al. 2006). Bei einer Tumor-Klassifizierung nach Chromosomenanomalien ergaben CGH ("Comparative Genomic Hybridization")-Analysen, dass etwa 20% der HNSCC-Tumore nur wenig Chromosomenaberrationen aufweisen. Hier liegt die beste Prognose bei genetisch wenig veränderten Tumoren, die schlechteste Prognose in der Gruppe der Tumore mit einer hohen Anzahl an Chromosomenaberrationen (Smeets et al. 2009). Da bislang aber nur wenige genetische Analysen durchgeführt wurden, bleibt eine endgültige Klassifizierung der Tumore noch abzuwarten.

1.3.4 Therapie

Für die therapeutische Behandlung ist ein korrektes "Staging" des Tumors von großer Bedeutung (Marur & Forastiere 2008). Zu den prognostischen Hauptfaktoren gehören Lage und Größe des Tumors (T), das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) und das Vorhandensein von Metastasen in den zervikalen Lymphknoten (N) („TNM-Klassifikation“) (Andersen et al. 1994; Sessions et al. 2002). Da es für Kopf-Hals-Tumore noch keine zuverlässigen Biomarker wie z.B. Her2/neu für Brustkrebs gibt, beruht die Entscheidung über die Behandlung meist auf der TNM-Klassifizierung (Chung et al. 2004). Je nach Tumorart und –stadium wird eine operative Entfernung des Tumors mit Chemo-/Radiotherapie und zielgerichteter Therapie kombiniert. Wird der Tumor in einem frühen Stadium erkannt, so wird er meist operativ entfernt oder bestrahlt (Al-Sarraf 2002; Haddad & Shin 2008). Bei fortgeschrittenen Tumoren findet dagegen zusätzlich eine komplexe Behandlung aus Chemo-/Radiotherapie und zielgerichteter Therapie statt. Als Chemotherapeutika werden hauptsächlich Cisplatin/Carboplatin und 5-FU (5-Fluorouracil) eingesetzt. Seltener finden Taxane Verwendung (Al-Sarraf 2002). Bei inoperablen Tumoren wird die Chemotherapie häufig mit einer Strahlentherapie kombiniert (Radiochemotherapie) (Marur & Forastiere 2008), wobei Chemotherapie und Bestrahlung gleichzeitig oder nacheinander erfolgen können (Haddad & Shin 2008). Der alleinige Einsatz von Chemotherapeutika findet hauptsächlich bei Fernmetastasen oder erneut auftretenden Kopf-Hals-Tumoren statt (Al-Sarraf 2002) und ist u.a. abhängig vom Alter und der körperlichen Verfassung des Patienten.

Zielgerichtete Therapeutika wie Cetuximab greifen gezielt in Signalvorgänge der Zellen ein und werden in Ergänzung zu Strahlen- oder Chemotherapie eingesetzt. Cetuximab inhibiert den EGFR-Signaltransduktionsweg und verlängert in Kombination mit Bestrahlung oder Chemotherapie die Überlebenszeit der Patienten im Vergleich zur alleinigen Strahlen- oder Chemotherapie erheblich (Haddad & Shin 2008; Marur & Forastiere 2008). Weitere zielgerichtete Therapeutika sind derzeit in klinischer Prüfung. Normalerweise wird bei etwa 30% der Patienten der Tumor in einem frühen Stadium (I oder II) erkannt, wobei ein Großteil der Patienten geheilt werden kann. Wird der Tumor erst im fortgeschrittenen Stadium (III oder IV) erkannt, so ist die Prognose deutlich schlechter (Braakhuis et al. 2005). Trotz signifikanter Verbesserungen der lokalen Tumorkontrolle hat sich die Überlebenszeit der Patienten in den letzten beiden Jahrzehnten nur wenig verändert (Forastiere et al. 2001). Ein Grund hierfür ist die hohe Zahl der Rezidive. 10 - 30% der Patienten mit fortgeschrittenem Kopf-Hals-Tumor entwickeln lokale Rezidive, während bei 10% regionale Rezidive und bei 15 - 25% Fernmetastasen auftreten (Leemans et al. 1993; Braakhuis et al. 2005). Außerdem können im gleichen oder benachbarten Gewebe weitere Primärtumore, sogenannte "second primary tumors" (SPT) auftreten (Sturgis & Miller 1995), was mit einer Häufigkeit von 2 - 3% pro Jahr (Snow et al. 1987) geschieht. „Zweitumore“ entwickeln sich aus den gleichen präneoplastischen Zellen, aus denen auch der Ursprungstumor hervorgegangen ist. Dies geschieht dann, wenn bei der operativen Entfernung des Ursprungstumors nicht alle präneoplastischen Zellen entfernt werden und sich ein weiterer Subklon (unabhängig vom Ursprungstumor) zu einem Zweitumor entwickelt. Der Zweitumor bildet sich also nicht aufgrund unvollständiger Entfernung des Ursprungstumors, sondern aufgrund der unvollständigen Entfernung präneoplastisch veränderter Zellen. Beide Tumore sind somit klonal verwandt (Braakhuis et al. 2005).

1.4 Osteoblast specific factor-2 (OSF-2)

1.4.1 OSF-2 - Struktur

OSF-2 ist ein 93 kDa-Glykoprotein, das ursprünglich als homophiles Adhäsionsmolekül bei der Knochenbildung beschrieben wurde (Takeshita et al. 1993). Hier soll es die Adhäsion und Differenzierung von Osteoblasten regulieren (Horiuchi et al. 1999; Litvin et al. 2004). Es besitzt Struktur- und Sequenzhomologie zu dem TGF- β induzierbaren Protein β ig-h3 (Skonier et al. 1992) und zu Fascilin I (Takeshita et al. 1993), einem Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, welches im zentralen Nervensystem von Insekten exprimiert wird (Zinn et al. 1988). Zur Familie der FAS1-ähnlichen Proteine gehören neben OSF-2 u.a. β ig-h3 (Mensch, Maus) (Kim et al. 2000), Stabilin I und II (Mensch) (Kzhyshkowska et al. 2004), Periostin-like-factor (PLF) (Mensch, Maus) (Ruan et al. 2009), MBP-70 (Mycobakterien) (Matsumoto et al. 1995), Algal-CAM (Grünalgen) (Huber & Sumper 1994) und Fascilin I (Insekten) (Hu et al. 1998). FAS1-ähnliche Proteine existieren somit in sehr unterschiedlichen Spezies, was auf eine evolutionär betrachtet alte Domäne hindeutet (Ruan et al. 2009). Obwohl die Mitglieder der Familie der FAS1-ähnlichen

Proteine außerhalb ihrer FAS1-Domänen eine eher geringe Sequenzhomologie aufweisen und ihre Funktion noch wenig charakterisiert ist, werden sie häufig mit Adhäsionsmolekülen in Verbindung gebracht (Horiuchi et al. 1999). Während β ig-h3 die Adhäsion und Ausbreitung von Chondrozyten und Fibroblasten fördern soll (Skonier et al. 1992; Gillan et al. 2002), gilt OSF-2 als Adhäsionsmolekül, welches die Adhäsion und Ausbreitung von Osteoblasten induziert (Horiuchi et al. 1999).

OSF-2 besitzt eine typische N-terminale Signalsequenz, gefolgt von einer Cystein-reichen Domäne, vier internen Repeat-Domänen und einer C-terminalen Domäne (Takeshita et al. 1993). Isoformen des OSF-2-Proteins unterscheiden sich in der Länge ihrer C-terminalen Domäne sowie ihrem gewebespezifischen Expressionsmuster (Horiuchi et al. 1999). Die vier internen Repeat-Domänen enthalten Sequenzen, die die Bindung an Integrine und Glykosaminoglykane *in vivo* ermöglichen (Elkins et al. 1990). Für β ig-h3 konnte bereits gezeigt werden, dass die Fascilin-Domänen 2 und 4 mit $\alpha_3\beta_1$ -Integrinen, und alle vier Fascilin-Domänen mit $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen interagieren, wodurch die Zelladhäsion vermittelt wird (Kim et al. 2000). Eine 75 Aminosäure lange Cystein-reiche EMI-Domäne im N-Terminus findet sich auch in Proteinen der Emilin-Familie und wird mit Domänen wie C1q, FN3, WAP, ZP oder FAS1 (Doliana et al. 2000; Callebaut et al. 2003) in Verbindung gebracht. Murines (Chromosom 3) und humanes OSF-2 (Chromosom 13q) sind stark konserviert (90,1% Aminosäureidentität), unterscheiden sich aber in ihrer Signalsequenz und ihrem C-Terminus (Takeshita et al. 1993; Kudo et al. 2007).

1.4.2 OSF-2 - Expression in Normalgewebe

OSF-2 wurde auf RNA-Ebene in verschiedenen human-adulten Geweben, wie Brust, Aorta, Magen, unterer Magen-Darm-Trakt, Plazenta und Uterus nachgewiesen (Gillan et al. 2002; Kudo et al. 2007). Auf Proteinebene wurde es in Lunge, Magen, Darm, Nebenniere, Ovar, Vagina, Hoden und Prostata gezeigt (Tai et al. 2005; Kudo et al. 2007). Neben der Expression in verschiedenen adulten Organen ist eine Tendenz zu erhöhter Expression in fötalem Gewebe erkennbar (Gillan et al. 2002). In adulten Mäusen wurde OSF-2 im Periosteum und in der Zahnwurzelhaut nachgewiesen (Horiuchi et al. 1999), wobei die Expression in der Zahnwurzelhaut durch mechanische Belastung verstärkt wurde (Oshima et al. 2002; Wilde et al. 2003). Desweiteren konnte OSF-2 im Endokardkissen, d.h. im Herzen embryonaler und fötaler Mäuse nachgewiesen werden (Oshima et al. 2002). In murinen Embryonen wird OSF-2 ab Tag 10 exprimiert und erreicht sein Plateau an Tag 14 (Kruzynska-Frejtag et al. 2001). Da OSF-2-Knockout (KO)-Mäuse jedoch lebensfähig sind und bei ihrer Geburt eine normale Größe erreichen, kann man davon ausgehen, dass OSF-2 während der frühen Mausentwicklung nicht essentiell ist (Rios et al. 2005). Verschiedene Defekte in Knochenhaut (Periosteum), Zahnwurzelhaut, Knorpel und Herzklappen weisen aber darauf hin, dass OSF-2 postnatal für eine normale Entwicklung dieser murinen Gewebe benötigt wird (Rios et al. 2005).

Eine Hochregulation von OSF-2 findet nicht nur nach mechanischer Belastung in der Zahnwurzelhaut adulter Mäuse statt, auch in isolierten pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen und im Lungengewebe von Ratten wird OSF-2 unter hypoxischen Bedingungen verstärkt exprimiert (Li et al. 2004). In murinem Myokardgewebe findet nach Druckbelastung ebenfalls eine OSF-2-Hochregulation statt (Wang et al. 2003). In adultem Gewebe scheint OSF-2 somit unter ungünstigen Bedingungen wie Hypoxie, Druckbelastungen oder sonstigen Schädigungen verstärkt exprimiert zu werden, wobei seine Funktion hierbei noch weitestgehend unbekannt ist (Litvin et al. 2005).

1.4.3 OSF-2 - Expression in Tumorgewebe

OSF-2 wird in verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert, darunter Brustkrebs (Shao et al. 2004; Grigoriadis et al. 2006), Darmkrebs (Bao et al. 2004; Tai et al. 2005), Bauchspeicheldrüsenkrebs (Baril et al. 2007), Neuroblastoma (Sasaki et al. 2002), Kopf-Hals-Tumore (Kudo et al. 2006; Siriwardena et al. 2006), Schilddrüsenkarzinom (Fluge et al. 2006), nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (Sasaki et al. 2001) und Ovarialkarzinom (Gillan et al. 2002). OSF-2 wurde außerdem mit Invasierung, Metastasierung und/oder schlechter Überlebensprognose bei Neuroblastoma (Sasaki et al. 2002), Kopf-Hals-Tumoren (Kudo et al. 2006; Siriwardena et al. 2006), Brustkrebs (Grigoriadis et al. 2006), Darmkrebs (Bao et al. 2004) und nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (Sasaki et al. 2001) assoziiert. Hierbei wurde dessen funktionelle Bedeutung jedoch nur wenig beschrieben. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass OSF-2 als Tumorsuppressor bei Blasenkarzinomen und Osteosarkom-Zelllinien wirkt (Yoshioka et al. 2002) und eine Überexpression von OSF-2 bei Blasenkarzinomen die Invasierung und Metastasierung von Tumorzellen unterdrückt (Kim et al. 2005).

1.4.4 OSF-2 - Lokalisation in Tumorgewebe

Auf zellulärer Ebene konnte OSF-2 sowohl in Tumorzellen, als auch in Stromazellen verschiedener Tumorentitäten nachgewiesen werden. Der OSF-2-exprimierende Zelltyp wird demzufolge noch kontrovers diskutiert. Eine OSF-2-Expression in Tumorzellen konnte für das Ovarialkarzinom (Gillan et al. 2002), Darmkrebs (Bao et al. 2004), Prostatakrebs (Tischler et al. 2010) und Brustkrebs (Shao et al. 2004) gezeigt werden. Im Gegensatz hierzu wurde jedoch auch postuliert, dass OSF-2 in Darmkrebs (Kikuchi et al. 2008), Brustkrebs (Puglisi et al. 2008) und anderen Tumorentitäten (Fukushima et al. 2008; Utispan et al.; Choi et al. 2011) von Zellen im Tumorstroma exprimiert wird. Auch eine gleichzeitige OSF-2 Expression von Tumorstroma und Tumorzellen konnte bereits am metastatischen Melanom gezeigt werden (Tilman et al. 2007).

Die zelluläre OSF-2- Lokalisation wird hauptsächlich als zytoplasmatisch beschrieben (Erkan et al. 2007; Puppini et al. 2008; Tischler et al.), einzelne Gruppen postulieren jedoch auch eine

nukleäre Lokalisation (Puglisi et al. 2008; Jackson-Boeters et al. 2009) oder eine zytoplasmatisch-nukleäre Lokalisation (Yoshioka et al. 2002).

1.4.4.1 Proteintransport und Translation von Sekretionsproteinen

Proteintransportprozesse sind stark abhängig von Signalsequenzen. N-terminale Eintritts- und Zielsteuerungssequenzen ermöglichen den Proteintransport in Mitochondrien, C-terminale KDEL-Sequenzen ermöglichen das Zurückhalten residenter Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER) bzw. den Rücktransport dieser Proteine aus dem cis-Golgi-Apparat. Ein Großteil der kernkodierten Proteine wird an zytoplasmischen Ribosomen translatiert und anschließend über verschiedene Sortierungsschritte zu seinem Bestimmungsort transportiert. Tragen Proteine (meist N-terminale, hydrophobe) Zielsteuerungssequenzen, so interagieren die Ribosomen und die Signalsequenz des zu translatierenden Proteins mit dem SRP ("signal recognition particle") und werden an den SRP-Rezeptor des ER gebunden. Anschließend dissoziiert SRP und das Ribosom bindet an den Proteintranslokationskanal, der durch den Sec61-Komplex gebildet wird. Die Polypeptidkette gelangt kotranslational unter GTP-Hydrolyse ins ER-Lumen und wird nach der Proteinfaltung in Transportvesikel verpackt, die mit dem cis-Golgi-Apparat fusionieren. Von dort wird das Protein über mittlere und trans-Golgi-Kompartimente zur Plasmamembran transportiert (kotranslationale Translokation).

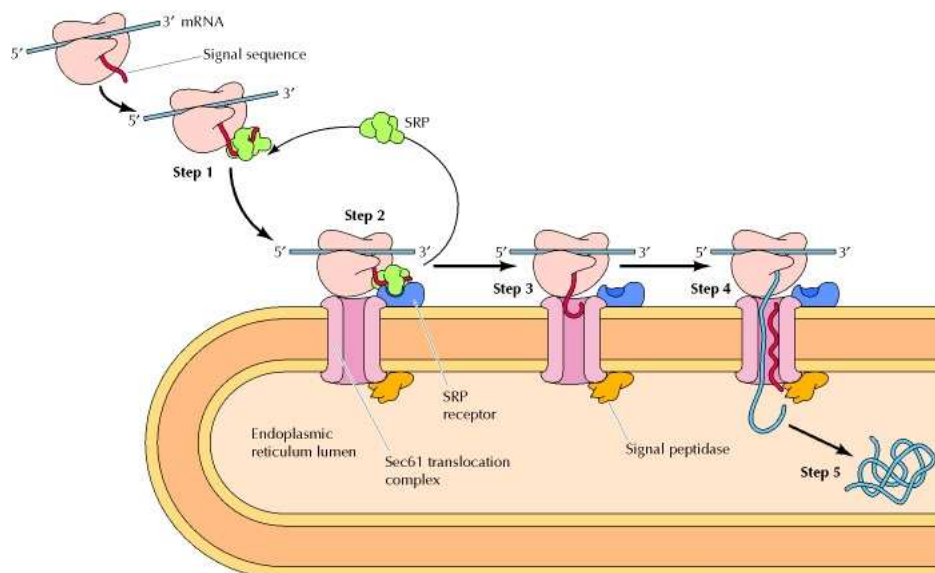


Abbildung 1.3: Mechanismus der kotranslationalen Proteintranslokation (Cooper 2000) (1) Die Signalsequenz der wachsenden Polypeptidkette wird vom SRP erkannt und gebunden wodurch es zu einem Elongationsarrest kommt. (2) SRP interagiert mit dem Ribosom und der Komplex aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette und SRP bindet an die ER-Membran. Hierbei interagiert SRP mit seinem membranständigen Rezeptor und das Ribosom mit dem Sec61-Komplex. (3) Während SRP freigesetzt wird, bindet das Ribosom an den Sec61-Translokationskomplex und die Signalsequenz wird in den Membrankanal inseriert. (4) Die Translation wird fortgesetzt und die wachsende

Polypeptidkette durch den von Ribosom und Sec61-Komplex gebildeten Kanal ins Lumen des ER transportiert (5) Die Signalsequenz wird durch den Signalpeptidase-Komplex (SP-Komplex) abgespalten und das Polypeptid in das ER-Lumen entlassen.

Eine weitere Möglichkeit ist die posttranslationale Translokation, bei der ungefaltete Proteine nach ihrer Translation im Zytoplasma von Chaperonen in Lösung gehalten und zu einem Translokationskanal transportiert werden, der aus einem Sec61 und einem Sec62/63-Komplex besteht. Die Existenz eines, dem SRP vergleichbaren Zielmoleküls, welches die Signalsequenz erkennt und das Polypeptid zum Translokationskanal transportiert, ist hierbei noch unbekannt. Sobald das Protein über seine Signalsequenz an den Sec-Komplex bindet, lösen sich die Chaperone und das Protein interagiert mit BiP, einer ATPase im Lumen des ER. Die Bindung an BiP verhindert einen Rücktransport des Proteins ins Zytoplasma und ermöglicht die Proteintranslokation in das ER-Lumen, welche unter ATP-Hydrolyse stattfindet. Dieser Mechanismus kann von Proteinen genutzt werden, die eine weniger hydrophobe Signalsequenz besitzen und während ihrer Synthese somit nicht zwangsläufig mit SRP interagieren (s. Abbildung 1.3).

Konstitutiv sekretierte Proteine ohne besondere Signale verbleiben in Vesikeln, die kontinuierlich mit der Plasmamembran verschmelzen und das Protein sezernieren. Dies trifft auf die meisten Sekret- und Membranproteine zu. Andere Vesikel fusionieren erst nach hormonellen oder nervösen Reizen mit der Plasmamembran, was zu einer regulierten Sekretion führt (Lodish 2001; Osborne et al. 2005)

1.4.5 OSF-2 - Protein-Interaktionen

OSF-2 ist dazu in der Lage, neben Integrinen (Orecchia et al. 2011), verschiedene Extrazellulärmatrix-Proteine zu binden. So konnte eine Interaktion mit Heparin (Sugiura et al. 1995), Fibronektin (Takayama et al. 2006) und Kollagen I (Kudo et al. 2004; Norris et al. 2007) nachgewiesen werden. Weiterhin interagiert OSF-2 mit BMP-1 (bone morphogenetic protein-1), wodurch die BMP-1-vermittelte Aktivierung der Lysyloxidase in der Extrazellulärmatrix verstärkt wird. Liegt Lysyloxidase in aktiver Form vor, so beeinflusst sie durch intra- und intermolekulare kovalente Quervernetzung von Kollagenfibrillen die mechanischen Eigenschaften des Bindegewebes (Maruhashi et al. 2010). Wie Orecchia und Kollegen zeigen konnten, interagiert OSF-2 zudem über das YH-Motiv in der OSF-2-Fas1-Domäne 2 mit $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen (Orecchia et al. 2011). Der Mechanismus der Proteininteraktion mit anderen Integrinen bzw. mit Proteinen der Extrazellulärmatrix ist allerdings noch unklar (Hoersch & Andrade-Navarro 2010). Auch eine Interaktion mit Sclerostin, einem Inhibitor des Knochenwachstums konnte gezeigt werden. OSF-2 soll hier die durch Sclerostin vermittelte Inhibition des Wnt-Signalweges aufheben. Der genaue Mechanismus und die Funktion der Proteininteraktion ist derzeit noch unklar (Bonnet et al. 2009).

1.4.6 Funktionelle Bedeutung von OSF-2

1.4.6.1 Signaltransduktion und Zellüberleben

Einer der wichtigsten Signaltransduktionswege in der Regulation zellulären Überlebens ist der Akt/PKB-Signaltransduktionsweg (s. Abbildung 1.4). Akt/PKB ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die nicht nur für das zelluläre Überleben eine wichtige Rolle spielt, sondern auch an der Regulation von Zellproliferation, Proteinsynthese, Glukose-Metabolismus, Zellinvasivität, Genomstabilität und Angiogenese beteiligt ist (Bellacosa et al. 2005). Die drei Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 werden ubiquitär in allen Zelltypen und Gewebearten exprimiert (Toker & Yoeli-Lerner 2006) und ihre Deregulation gilt als eines der Merkmale von Krebserkrankungen (Hanahan & Weinberg 2000). In Tumoren sind Proteine, die die Akt-Aktivität regulieren, z.B. PTEN (Li et al. 1997) oder PHLPP (Gao et al. 2005), häufig mutiert, aber auch Mutationen in der PI3-Kinase konnten beobachtet werden (Samuels et al. 2005).

Die Lipidkinase PI3K ist ein Heterodimer, das aus einer katalytischen (p110) und einer regulativen Untereinheit (p85) besteht. Die regulative Untereinheit p85 ist mit Tyrosinkinase direkt oder indirekt assoziiert. Wird PI3K von externen Stimuli aktiviert, so wird u.a. Phosphatidylinositol (4,5)-diphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP₃) phosphoryliert und Akt/PKB durch Interaktion von PIP₃ mit der Akt-Pleckstrin-Homologie-Domäne zur Plasmamembran rekrutiert (Vivanco & Sawyers 2002). Nach Phosphorylierung von Thr³⁰⁸ durch die Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (PDK1) und Ser⁴⁷³ durch PDK2 liegt Akt/PKB vollständig aktiv vor, relokalisiert in verschiedene Zellbereiche und phosphoryliert dort Proteine, die u.a. an Apoptoseprozessen beteiligt sind (s. Abbildung 1.4). Hierzu gehören Forkhead-Transkriptionsfaktoren (FOXO), welche die Transkription von proapoptotischen Genen verhindern (Burgering & Medema 2003), BAD, ein Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie, dessen proapoptotische Aktivität durch Akt inhibiert wird, und MDM2, dessen Phosphorylierung letztendlich zu einer verstärkten p53-Degradation führt (Woodgett 2005; Toker & Yoeli-Lerner 2006).

Die Aktivierung des Akt/PKB-Signaltransduktionswegs kann über Liganden-vermittelte Aktivierung von Rezeptortyrosinkinase (Vivanco & Sawyers 2002) und/oder Integrine erfolgen (Legate et al. 2009). Integrine sind bidirektionale Transmembranrezeptoren, deren Aktivierung zur intrazellulären Phosphorylierung verschiedener Proteinkinasen, darunter FAK, führt. Die Aktivierung von FAK führt u.a. zur Rekrutierung der PI3-Kinase mit nachfolgender Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt (Legate et al. 2009). Neben der Induktion verschiedener Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierungen, wird durch Aktivierung von Integrinen der Inositollipid-Metabolismus beeinflusst, sowie die Aktivität der Familie der Rho-GTPasen moduliert (Giancotti & Ruoslahti 1999; Schwartz 2001; Arthur et al. 2002).

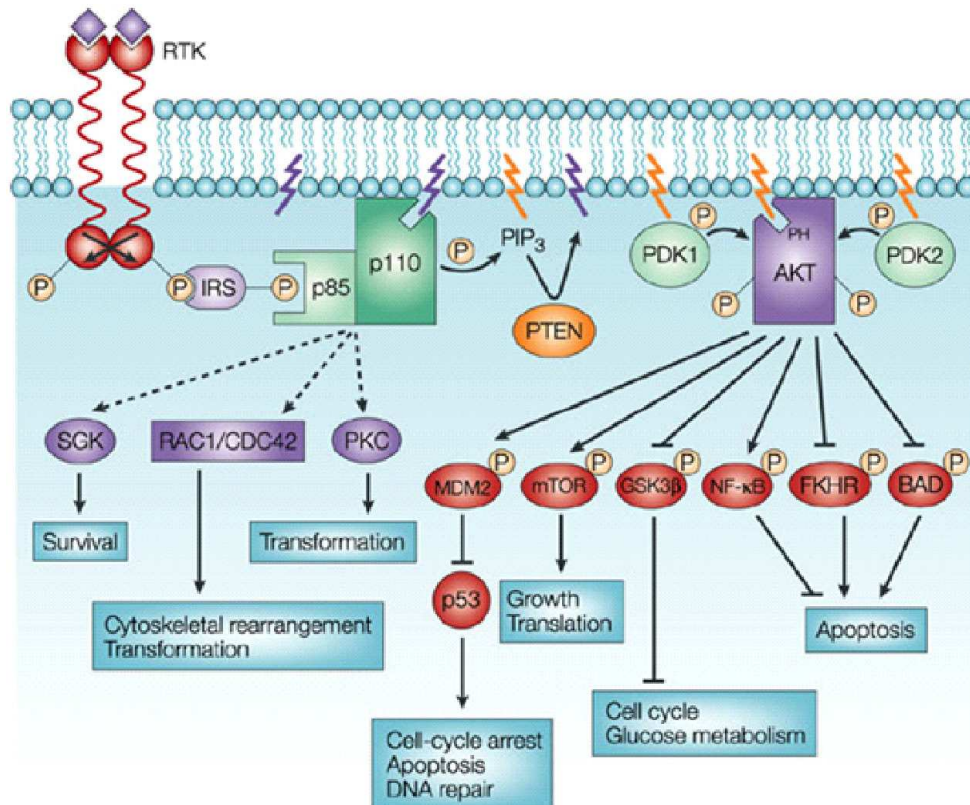


Abbildung 1.4: Modell der PI3K-Akt-Signaltransduktion nach Vivanco: Die Stimulation einer Rezeptortyrosinkinase und nachfolgende Assemblierung des Rezeptor-PI3-Komplexes führen zur Aktivierung der PI3-Kinase an der Plasmamembran. Deren p110 Untereinheit phosphoryliert PIP₂ zu PIP₃, welches AKT zur Plasmamembran rekrutiert. Nach Phosphorylierung und Aktivierung von AKT werden verschiedene Targets aktiviert oder inhibiert, was u.a. Überleben, Proliferation, Zellwachstum und Angiogenese beeinflusst (Vivanco & Sawyers 2002).

Die Interaktion von OSF-2 mit verschiedenen Integrinen konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden. Rekombinantes OSF-2 soll als Ligand von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen die $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ -Integrin-abhängige Adhäsion von epithelialen Ovarialzellen begünstigen (Gillan et al. 2002). Ähnliches konnte für Mund-, Brust- und Darmkrebszellen gezeigt werden (Bao et al. 2004; Shao et al. 2004; Kudo et al. 2006). Die Aktivierung des Akt/PKB-Signalweges über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine erhöhte zudem in humanen Tumorzellen sowie in mikrovaskulären Endothelzellen des Kolonkarzinoms das Überleben unter Stressbedingungen (Bao et al. 2004). Für Bauchspeicheldrüsenkrebs wurde hingegen eine migrationsfördernde OSF-2- $\alpha_6\beta_4$ -Integrin-Interaktion nachgewiesen (Baril et al. 2007). Hier konnte auch die nachfolgende Phosphorylierung von FAK und AKT gezeigt werden (Baril et al. 2007). Li und Kollegen konnten die Aktivierung des FAK-Signaltransduktionsweges durch OSF-2-Überexpression und OSF-2-Integrin-Interaktion (hauptsächlich $\alpha_v\beta_3$) auch in vaskulären glatten Muskelzellen nachweisen (Li et al. 2009). In mesenchymalen Zellen aktiviert OSF-2 über $\alpha_v\beta_3$ - und β_1 -Integrine den Rho/PI3K-Signaltransduktionsweg (Butcher et al. 2007).

Durch Entwicklung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers konnten Orecchia und Kollegen das YH-Motiv in der OSF-2-Fas1-Domäne 2 als Bindungsstelle von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen in Melanom- und Neuroblastomzelllinien identifizieren (Orecchia et al. 2011). Für $\alpha_6\beta_4$ -Integrine ist die OSF-2-Bindungsstelle allerdings noch unklar.

1.4.6.2 Epithel-Mesenchymale Transition (EMT)

Als Epithel-Mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet man den Übergang von Zellen mit epithelialen Eigenschaften in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften. Es können verschiedene EMT-Subtypen unterschieden werden. EMT in neoplastischen Zellen, EMT in Wundheilungsprozessen sowie EMT in der Embryonalentwicklung (Kalluri & Weinberg 2009). Meist wird die Epithelial-Mesenchymale-Transition mit dem Erwerb metastatischen Potentials gleichgesetzt (Yan & Shao 2006). Erreicht ein Tumor das invasive Stadium, so verlieren die Epithelzellen ihre Polarität und lösen ihre Zell-Zell-Kontakte, so dass sie die Basalmembran passieren können. Sind sie in ihrer Zielregion angekommen, können die Zellen adhären und wieder zu Epithelzellen differenzieren. Die Zellen besitzen somit kurzzeitig mesenchymale Eigenschaften charakterisiert durch eine spindelförmige Morphologie und eine erhöhte Motilität (Cui et al. 1996; Putz et al. 1999; Janda et al. 2002). Auf molekularer Ebene kommt es zu Veränderungen der Expression, Verteilung und/oder Funktion von Proteinen wie Vimentin (Kierner et al. 2001; Savagner 2001), Integrinen (Maschler et al. 2005), Matrixmetalloproteinasen (Kupferman et al. 2000; Lakka et al. 2004) und Cadherinen (Hazan et al. 2000).

Yan und Kollegen konnten zeigen, dass OSF-2 zur EMT und damit zum Metastasierungspotential tumorigener, nicht-metastasierender 293T Zellen beiträgt (Yan & Shao 2006). OSF-2 überexprimierende 293T-Zellen zeigten u.a. eine veränderte Morphologie, eine verstärkte MMP-9-Aktivität und exprimierten EMT-relevante Gene wie Vimentin und Fibronectin (Yan & Shao 2006). Auch wurde in Tumorzellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms eine hohe OSF-2-Expression während der EMT nachgewiesen (Soltermann et al. 2008). An Tumorzellen der Bauchspeicheldrüse wurde hingegen gezeigt, dass die OSF-2-Expression eine epithelial-mesenchymale Transition umkehren kann, wobei eine epitheliale Morphologie induziert und epitheliale Marker hoch- bzw. mesenchymale Marker herabreguliert werden (Kanno et al. 2008).

1.4.6.3 Adhäsion

Zelladhäsionsmoleküle sind Rezeptoren in der Plasmamembran, die über ihre extrazelluläre Domäne Liganden binden und die Zelle damit an andere Zellen oder die Extrazellulärmatrix adhären. Sie regulieren wichtige zelluläre Prozesse wie Apoptose, Transkription und Differenzierung (Juliano & Haskill 1993; Gumbiner 1996). Zu den Zelladhäsionsmolekülen gehören Cadherine, Immunglobuline, Selektine und Integrine (Takeshita et al. 1993). Auch für die Knochenentwicklung spielen Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. Aufgrund der ähnlichen

Struktur und Sequenzähnlichkeiten innerhalb der Repeat-Domänen von OSF-2 und Fascilin I, einem Protein, welches in der neuronalen Zell-Zell-Adhäsion in Insekten eine wichtige Rolle spielt, wurde spekuliert, dass es sich bei OSF-2 ebenfalls um ein Adhäsionsmolekül in der Knochenbildung handelt (Takeshita et al. 1993). Eine der wichtigsten Gruppen der Zelladhäsionsmoleküle sind Integrine. Bei Integrinen handelt es sich um heterodimere Transmembranrezeptoren, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen und die Extrazellulärmatrix mit dem Zytoskelett vernetzen. Hierbei bilden sie häufig sehr stabile Cluster mit einer starken Bindung der Zelle an das Substrat (Buckley et al. 1998). Während die α -Untereinheit vermutlich die Bindung des Liganden bestimmt, besitzt die β -Untereinheit regulatorische Funktion (Humphries & Newham 1998). Integrine binden mit ihrer extrazellulären Domäne spezifisch RGD (Arg-Lys-Arg)- oder GER (Gly-Glu-Arg)-Erkennungssequenzen, die häufig in Komponenten der Extrazellulärmatrix z.B. in Fibronektin (RGD) oder Kollagen (GER) vorhanden sind. Die Bindung an diese Sequenzen führt zur Aktivierung der Integrine und zur Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden innerhalb der Zelle. Es gibt jedoch auch nicht-RGD-abhängige Mechanismen der Ligandenbindung (Eto et al. 2000; Maeshima et al. 2000; Sechler et al. 2000; Wang et al. 2010). Obwohl OSF-2 keine RGD- oder GER-Domäne besitzt, konnte hier beispielsweise gezeigt werden, dass eine Interaktion mit $\alpha_v\beta_3$ -I und $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen über das YH-Motiv in der OSF-2-Fas1-Domäne 2 möglich ist (Orecchia et al. 2011).

Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass Zellen verstärkt auf mit rOSF-2-beschichteten Kulturschalen adhären. So fördert OSF-2 beispielsweise die Adhäsion von Osteoblasten in vergleichbarer Weise wie Fibronektin, wobei die Adhäsion auf rOSF-2-beschichteten Kulturschalen durch Inkubation der Zellen mit einem OSF-2-spezifischen Antikörper inhibiert werden konnte (Horiuchi et al. 1999).

Gillan und Kollegen konnten nachweisen, dass OSF-2 die Adhäsion und Ausbreitung epithelialer Ovarialzellen, sowie epithelialer ovarialer Tumorzellen fördert, und diese Adhäsion $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -abhängig ist. Hier konnte gezeigt werden, dass $\alpha_v\beta_3$ -Integrine bei Adhäsion auf rOSF-2-beschichteten Kulturschalen an fokalen Adhäsionsstellen lokalisieren, während sie bei Zellen auf Fibronektin-beschichteten Schalen diffus über die Zellmembran verteilt sind. Umgekehrt zeigten β_1 -Integrine nur dann eine Lokalisation an fokalen Adhäsionsstellen, wenn die Zellen auf Fibronektin-beschichteten Schalen adhären. Die Zelladhäsion konnte außerdem durch $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Antikörper komplett verhindert werden (Gillan et al. 2002). Shao und Kollegen konnten zeigen, dass humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVEC) auf rOSF-2-beschichteten Schalen besser adhären als auf unbeschichteten Schalen und dass die Inkubation mit einem $\alpha_v\beta_3$ -spezifischen Antikörper die Adhäsion dieser Zellen auf mit rOSF-2 beschichteten Kulturschalen verhindert. Auch konnte die durch OSF-2 induzierte FAK-Phosphorylierung durch Inkubation mit einem $\alpha_v\beta_3$ -, nicht aber mit einem $\alpha_v\beta_5$ -spezifischen Antikörper inhibiert werden (Shao et al. 2004). Die Adhäsion von humanen Pankreaskarzinom

(PDAC)-Zellen auf rOSF-2-beschichteten Kulturschalen war vergleichbar mit der Adhäsion auf Fibronectin-beschichteten Schalen und konnte durch einen anti-OSF-2-Antikörper inhibiert werden. Die Adhäsion wurde hierbei allerdings über OSF-2- $\alpha_6\beta_4$ -Integrin-Interaktionen vermittelt. Auch die nachfolgende Phosphorylierung von FAK und AKT konnte gezeigt werden (Baril et al. 2007).

EpCAM ("Epithelial cell adhesion molecule") ist ein Transmembranglykoprotein, welches eine wichtige Rolle in der Adhäsion epithelialer Zellen spielt (Patriarca et al. 2011). Es wurde ursprünglich als vorherrschendes Oberflächenantigen bei Darmkarzinomen beschrieben (Herlyn et al. 1979) und spielt nicht nur eine Rolle in der Zelladhäsion, sondern auch in der Zellmigration, -proliferation und -differenzierung (Trzpis et al. 2007; Maetzel et al. 2009). EpCAM wird ausschließlich von epithelialen Zellen exprimiert, in vielen Adenokarzinomen und Metastasen hochreguliert (Went et al. 2004; Patriarca et al. 2011) und seine Überexpression wird mit schlechterem Überleben oder fortgeschrittenem Krankheitsstadium assoziiert (Gastl et al. 2000; Spizzo et al. 2004). Daher kann es sowohl als diagnostischer als auch als prognostischer Marker verwendet werden. Seine Überexpression in Tumorstammzellen macht EpCAM u.a. zu einem idealen Target, um zirkulierende oder metastasierende Tumorstammzellen per Mikrochiptechnologie zu detektieren (Nagrath et al. 2007; Munz et al. 2009; Sieuwerts et al. 2009).

1.4.6.4 Angiogenese

Als Angiogenese bezeichnet man die Bildung neuer Blutgefäße. Die Angiogenese ist nicht nur bei Wundheilungsprozessen von großer Bedeutung, sie spielt auch für das Tumorwachstum eine wichtige Rolle (Folkman et al. 1971; Gimbrone et al. 1972). Sobald der Tumor eine kritische Größe von $\sim 1 \text{ mm}^3$ überschreitet, muss das Gefäßsystem erweitert werden, um eine ausreichende Versorgung des Tumors zu gewährleisten (Bouck et al. 1996; Hanahan & Folkman 2000; Hanahan & Weinberg 2000). Bei der Angiogenese handelt es sich um einen komplexen Prozess, bei dem die zur Bildung der Gefäßwände notwendigen Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen (Carmeliet & Jain 2000; Carmeliet 2005) durch verschiedene Wachstumsfaktoren, etwa "Fibroblast Growth Factor" (FGF) und "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF), aktiviert werden (Hanahan & Folkman 2000; Hanahan & Weinberg 2000). Da sowohl pro- als auch anti-angiogenetische Faktoren von Tumorzellen, Endothelzellen, Stromazellen und der extrazellulären Matrix produziert werden können (Fukumura et al. 1998), ist für die Tumoriangiogenese das Verhältnis zwischen pro- und anti-angiogenetischen Faktoren entscheidend.

Neue Kapillaren entstehen durch Proliferation und Migration von bereits bestehenden Endothelzellen (Scatena & Giachelli 2002), wobei das die Kapillare umgebende Bindegewebe lokal abgebaut wird (Hanahan & Folkman 2000) und eine Migration endothelialer Zellen in das

Gewebe erfolgt (Nishida et al. 2006). Die endothelialen Zellen beginnen sich zu teilen und bilden Hohlkörper, welche sich sukzessive zu einem Netzwerk von Blutgefäßen entwickeln (Nishida et al. 2006). Blutgefäße innerhalb des Tumors unterscheiden sich von Blutgefäßen in Normalgewebe, indem sie häufig keine homogene Schicht endothelialer Zellen, sondern eine Mischung aus Tumorzellen und endothelialen Zellen aufweisen (Jain 1988). Da die Blutgefäße eine diskontinuierliche oder gar keine Basalmembran besitzen und die endothelialen Zellen aufeinander wachsen und teilweise in das Lumen hineinragen, sind die Blutgefäße häufig „undicht“ (Dvorak et al. 1995; Hobbs et al. 1998; Hashizume et al. 2000). Das Gefäßsystem innerhalb des Tumors ist außerdem in hohem Maß desorganisiert, was zu einer sehr unterschiedlichen Blutversorgung (Baish & Jain 2000) mit teilweise hypoxischen Regionen führen kann (Helmlinger et al. 1997). Hier findet eine Selektion nach Tumorzellen mit einer Hypoxie-Resistenz (Giaccia 1996) statt, wobei diese Bereiche über das Blutsystem auch nicht medikamentös behandelt werden können.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bisher bei Brust- und Darmkrebs zeigen, dass OSF-2 die Angiogenese induziert (Bao et al., 2004; (Shao et al. 2004). Auch konnte nachgewiesen werden, dass OSF-2 über einen Integrin- $\alpha_v\beta_3$ -FAK-vermittelten Signaltransduktionsweg die Expression des VEGF-Rezeptors Flk-1/KDR in endothelialen Zellen verstärkt (Shao et al., 2004) und das Überleben von endothelialen Zellen erhöht (Bao et al. 2004). Siriwardena und Kollegen konnten zeigen, dass OSF-2 die Kapillarbildung *in vitro* verstärkt und dass die Überexpression von OSF-2 in humanen oralen Tumoren mit einer erhöhten Anzahl bzw. einer größeren Dichte an Blutgefäßen in Verbindung gebracht werden kann (Siriwardena et al. 2006). Die derzeitige Hypothese dieser Arbeitsgruppe bezüglich der Rolle von OSF-2 in oralen Plattenepithelkarzinomen besagt, dass OSF-2 von Tumorzellen sekretiert wird, über Integrine an endotheliale Zellen sowie Tumorzellen bindet und durch diese Bindung Tumorzell-ECM-Interaktionen inhibiert werden. Dadurch wird den Tumorzellen die Invasion und damit die Metastasierung erleichtert. Die Bindung an Integrine in endothelialen Zellen soll außerdem zu einer verbesserten Überlebensfähigkeit der endothelialen Zellen und damit zu einer verstärkten Invasion und Angiogenese, führen (Senger et al., 1996; Soldi et al., 1999), was wiederum die Metastasierung begünstigt. Der Zusammenhang zwischen verbessertem Überleben endothelialer Zellen und erfolgreicher Tumorangiogenese konnte bereits von anderen Gruppen gezeigt werden (Brooks et al. 1994; Scatena & Giachelli 2002; Stupack & Cheresch 2002).

1.4.6.5 Migration und Invasion

Die Fähigkeit zur Migration und Invasion ermöglicht es Tumorzellen, ihre Position innerhalb des Gewebes zu ändern und ist eine Voraussetzung für die Metastasierung.

Der Mechanismus der Tumorzellmigration ähnelt dem Mechanismus der physiologischen Migration in Wundheilungsprozessen oder der Embryonalmorphogenese (Bozzuto et al. 2010). Nach der Ausstülpung der Zellvorderkante, der sogenannten Pseudopodienbildung, und der Bildung fokaler Adhäsionskontakte (s. Abbildung 1.5), bei der Integrine an Komponenten der extrazellulären Matrix binden, findet eine aktomyosin-abhängige Zellkontraktion und eine Ablösung der Zellhinterkante statt, wodurch sich die Zelle vorwärts bewegt. Gleichzeitig erfolgt die Proteolyse und Umgestaltung der umgebenden Extrazellulärmatrix, welche durch verschiedene Proteasen katalysiert wird. Das Plasminogen-Aktivator-System und Matrixmetalloproteinasen spielen hierbei eine wichtige Rolle (Stetler-Stevenson et al. 1993). Durch Proteolyse der Extrazellulärmatrix wird der Zelle nicht nur physisch die Migration erleichtert, es werden auch weitere Integrinbindestellen innerhalb der Extrazellulärmatrix freigelegt. Des Weiteren können durch Proteolyse der ECM promigratorische Wachstumsfaktoren und chemotaktische Verbindungen aktiviert werden (Geho et al. 2005). Nach der Bindung der Extrazellulärmatrix durch Integrine erfolgt ein Integrin-Clustering in der Zellmembran, wobei durch "outside-in"-Signalgebung Adapter- und Signalproteine rekrutiert werden (Miyamoto et al. 1995; Zamir & Geiger 2001). Hierbei werden über ein komplexes Netzwerk verschiedener Adapter- und Signalproteine Aktinbindeproteine (u.a. Vinculin und Paxillin) und regulatorische Proteine (z.B. PI3K und Rho-GTPasen) zu den fokalen Kontakten rekrutiert (Miyamoto et al. 1995; Calderwood et al. 2000; Zamir & Geiger 2001; Degani et al. 2002). Die Assemblierung der fokalen Adhäsionskontakte wird durch verschiedene Signaltransduktionswege induziert, woran PI3K, Proteinkinase C und Rho-GTPasen beteiligt sind (Schwartz & Shattil 2000; Degani et al. 2002; Hynes 2002). Auch verschiedene Chemokine und Wachstumsfaktoren können das Migrations- und Invasionsverhalten von Zellen beeinflussen, indem sie über PI3K, RAC oder RHO Signaltransduktionskaskaden aktivieren (Friedl & Wolf 2003).

Die Hochregulation ECM-degradierender Enzyme in vielen Tumoren (Rosenthal et al. 1999; Hofmann et al. 2000; Koblinski et al. 2000; Sameni et al. 2000) und die häufige Überexpression von RHO, RAC, ROCK oder MLCK-Signaltransduktionswegen erleichtern die Migration, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen (Deryugina et al. 1998; Rudolph-Owen et al. 1998; Rosenthal et al. 1999; Sameni et al. 2000; Maekawa et al. 2002). Integrine, MMPs und ROCK stellen deshalb interessante Targets für die Entwicklung pharmakologischer Inhibitoren für die Krebstherapie dar (Friedl & Wolf 2003).

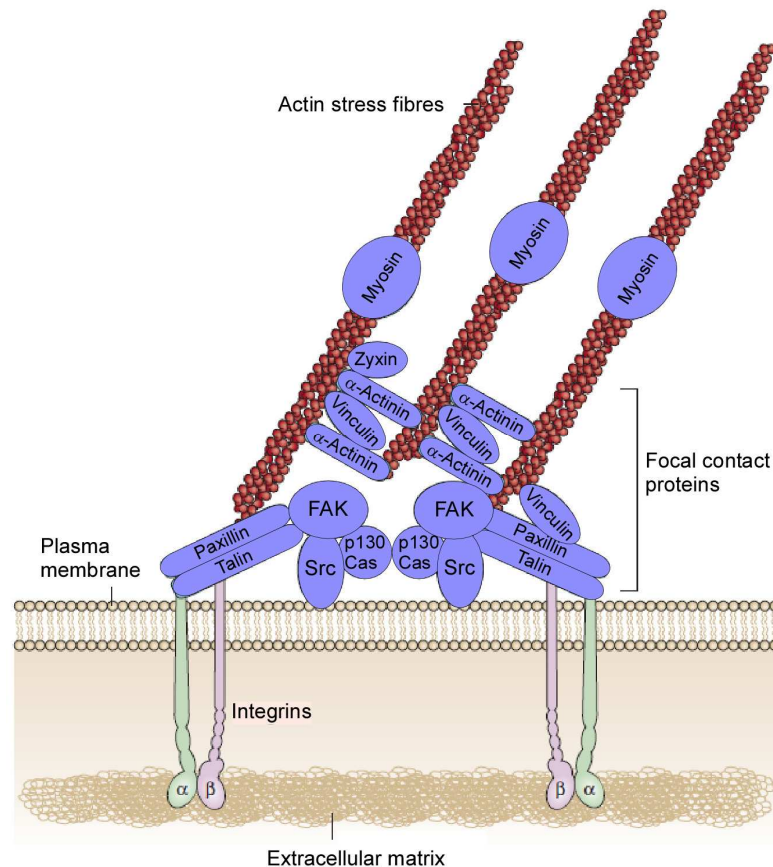


Abbildung 1.5: Aufbau eines fokalen Adhäsionskontaktes nach Mitra (Mitra et al. 2005): Über fokale Kontakte werden externe Signale ins Zellinnere transportiert (“outside-in“-Signalgebung) und Signale aus dem Zellinnern u.a. durch Regulation der Integrinsynthese und –aktivität nach außen transportiert (“inside-out“-Signalgebung)(Bennett et al. 2001; Calderwood & Ginsberg 2003). Die Integrinbindeproteine Paxillin und Talin rekrutieren FAK und Vinculin zu den fokalen Kontaktstellen. α -Actinin wird durch FAK phosphoryliert und bindet an Vinculin und vernetzt die Aktomyosin-Stressfasern. Die Tyrosinkinase Src und das Adapterprotein p130Cas assoziieren an fokalen Kontakten im Anschluss an das Integrin-Clustering (Mitra et al. 2005).

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass OSF-2 die Migrationsfähigkeit von Zellen beeinflusst. Eine OSF-2-Überexpression erhöht beispielsweise durch Interaktion mit α_v -Integrinen (hauptsächlich $\alpha_v\beta_3$) und nachfolgender Aktivierung des FAK-Signaltransduktionsweges die Migration glatter vaskulärer Muskelzellen *in vitro* (Li et al. 2009). Die fokale Adhäsionskinase FAK ist eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die über ihren N-terminalen Bereich an Integrine bindet, eine zentrale katalytische Domäne besitzt und C-terminal mit verschiedenen Proteinen interagiert. FAK wird von den Integrinbindeproteinen Paxillin und Talin zu fokalen Adhäsionskontakten rekrutiert und die Integrin-vermittelte FAK-Aktivierung wird u.a. durch Bindung von Integrinen an die Extrazellulärmatrix induziert. Die phosphorylierte und damit aktivierte FAK kann dann andere regulatorische Proteine zu fokalen Adhäsionskontakten rekrutieren und direkt oder indirekt die Aktivität von Rho-GTPasen, welche die Bildung von

Stressfasern, Lamellipodia und Filopodia regulieren, beeinflussen. Hierdurch werden Änderungen der Aktin- und Mikrotubulstruktur induziert (Mitra et al. 2005).

Lindner und Kollegen konnten zeigen, dass eine Überexpression von OSF-2 die Migrationsfähigkeit einer murinen Fibroblastenzelllinie (C3H10T1/2 Zellen) erhöht (Lindner et al. 2005). Für Bauchspeicheldrüsenkrebs wurde eine migrations- und invasionsfördernde OSF-2- $\alpha_6\beta_4$ -Integrin-Interaktion in Tumorzellen nachgewiesen, wobei hier ebenfalls die Aktivierung des PI3-Kinase-Signaltransduktionswegs, sowie die nachfolgende Phosphorylierung von FAK und AKT gezeigt wurde (Baril et al. 2007). Gillan und Kollegen konnten nachweisen, dass ovariale Epithelzellen in Ovarialkarzinomen auf OSF-2-beschichteten Zellkulturschalen eine erhöhte Migrationsfähigkeit besitzen (Gillan et al. 2002). Auch die Inkubation mit rOSF-2 verstärkte die Zellmigration und -invasion von HUVEC und ovariären Tumorzellen (Zhu et al. 2010; Choi et al. 2011).

Die Migration und Invasion mesenchymaler Zellen wird ebenfalls durch eine Überexpression von OSF-2 erhöht, wobei hier über $\alpha_v\beta_3$ - und β_1 -Integrine der Rho/PI3K-Signaltransduktionsweg aktiviert wird (Butcher et al. 2007). Des Weiteren konnten Yan und Shao unter Verwendung tumorigener, nicht-metastatischer 293T-Zellen nachweisen, dass die ektopische Expression von OSF-2 die Migration und Invasion der Zellen *in vitro* deutlich verstärkt (Yan & Shao 2006). Im Gegensatz hierzu wurde an Tumorzellen der Bauchspeicheldrüse gezeigt, dass ektopes OSF-2 die Migrationsfähigkeit der Zellen reduziert (Kanno et al. 2008).

1.4.7 OSF-2 als Biomarker?

Aufgrund der Heterogenität der Tumorentität gibt es z.Zt. für Kopf-Hals-Tumoren noch keine zuverlässigen Biomarker wie HER2 in Brustkrebs oder c-KIT in gastrointestinalen Stromatumoren. Meist gründet die gewählte Therapie ausschließlich auf der TNM-Klassifizierung (Chung et al. 2004), weshalb die Identifizierung von prognostischen/diagnostischen Biomarkern von großer Wichtigkeit ist. Für verschiedene Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass anhand von Genexpressionsmustern gebildeten, homogenen Subklassen klinische Ergebnisse vorhergesagt werden können (Alizadeh et al. 2000; Bhattacharjee et al. 2001; Dhanasekaran et al. 2001; Garber et al. 2001). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass es möglich ist, anhand des Genexpressionsmusters des Primärtumors auf Lymphknotenmetastasen zu schließen (MacDonald et al. 2001; Huang et al. 2003). Genexpressionsanalysen stellen somit wichtige Hilfsmittel für die Identifizierung neuer Biomarker dar (Chung et al. 2004).

Kopf-Hals-Tumore wurden bisher anhand verschiedener Expressions-, Ploidy- und CGH-Analysen in verschiedene Subklassen unterteilt (Hermsen et al. 2001; Chung et al. 2004; Chung et al. 2006; Jin et al. 2006; Smeets et al. 2009). Zumeist wurden hierbei allerdings nur Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe untersucht (Leethanakul et al. 2000; El-Naggar et al. 2002; Hwang et al. 2003). Obwohl bereits Subtypen für Kopf-Hals-Tumore identifiziert wurden (Belbin et al. 2002; Chung et al. 2004), gibt es noch keine Belege für

statistisch signifikante Unterschiede dieser Subtypen im klinischen Verlauf. Eine Bestätigung bisheriger Analysen durch weitere genetische Studien, gefolgt von funktionellen Assays bleibt somit abzuwarten.

OSF-2 wurde bereits in verschiedenen Tumorentitäten als potentieller Biomarker vorgeschlagen. Bei einer speziellen Form von erblichem Brustkrebs konnte gezeigt werden, dass OSF-2 überexprimiert wird und als Marker für die Krebsfrüherkennung Verwendung finden könnte (Quaresima et al. 2008). Des Weiteren wurden erhöhte OSF-2-Serumlevel bei Brustkrebspatienten mit einer verstärkten Knochen-Metastasierung assoziiert (Sasaki et al. 2003) und scheinen auch bei Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) von prognostischer Relevanz (Sasaki et al. 2001).

Auch eine Korrelation der OSF-2-Expression mit dem Krankheitsstadium konnte in verschiedenen Tumorentitäten gezeigt werden (Kudo et al. 2007; Ruan et al. 2009; Choi et al. 2011). Für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom wurde beispielsweise nachgewiesen, dass die OSF-2-Expression mit dem TNM-Staging korreliert (Takanami et al. 2008) und dass eine OSF-2-Expression im Tumorstroma mit der Entwicklung eines Tumorrezidivs assoziiert werden kann (Soltermann et al. 2008). Außerdem wurde eine hohe OSF-2-Expression in Brustkrebs, Ovarialkarzinom, Bauchspeicheldrüsenkrebs und nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom mit einem signifikant schlechterem Überleben der Patienten in Verbindung gebracht (Sasaki et al. 2001; Erkan et al. 2007; Soltermann et al. 2008; Choi et al. 2011).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Kopf-Hals-Tumore gehören, mit jährlich 600.000 Neuerkrankungen (Leemans et al.), zu den sechsthäufigsten Malignomerkrankungen weltweit (Kamangar et al. 2006). Durch Verbesserungen moderner Operationstechniken (Smith et al. 2007), radioonkologischer Therapien (Vergeer et al. 2009) und verstärkter Bemühungen um Organerhaltung (Boscolo-Rizzo et al. 2008) ist davon auszugehen, dass sich die Lebensqualität der Patienten in den letzten 20 Jahren deutlich erhöht hat (Leemans et al. 2011). Trotz neuer Therapiemöglichkeiten wie dem Einsatz des EGFR-spezifischen Antikörpers Cetuximab in Kombination mit Bestrahlung hat sich die Überlebensrate der Patienten jedoch kaum verbessert. Nicht nur die biologische und genetische Heterogenität der Krankheit, auch fehlende Informationen über die Funktion der in den einzelnen Tumorentitäten hochregulierten Proteine behindert die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten oder verbesserter Behandlungsmethoden einzelner Patienten (Leemans et al. 2011).

OSF-2 wird in vielen Tumorentitäten, sowohl im Primärtumor als auch in Metastasen, überexprimiert, was u.a. auch für Kopf-Hals-Tumore gezeigt werden konnte. Die funktionelle Bedeutung von OSF-2 innerhalb der einzelnen Tumorentitäten wird derzeit aber noch äußerst kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit sollte OSF-2 in Kopf-Hals-Tumoren

molekularbiologisch, biochemisch und funktionell charakterisiert werden, um möglicherweise neue, bzw. alternative Therapiestrategien in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren zu entwickeln. Um die Rolle von OSF-2 im Tumor und umgebendem Gewebe näher charakterisieren zu können, sollten funktionelle Assays unter Verwendung verschiedener Kopf-Hals-Tumorzelllinien durchgeführt werden. Tumorzelllinien stellen zwar artifizielle Systeme dar, sind jedoch, da sie unbegrenzt teilungsfähig sind und somit zeitlich ausgedehnte Studien sowie experimentelle Serien ermöglichen, ein wichtiges Hilfsmittel, um zelluläre Prozesse auf molekularer Ebene aufklären zu können. Da es sich bei OSF-2 um ein putatives Sekretionsprotein handelt, waren hier sowohl die intrinsische als auch die extrinsische Wirkung durch Transfektion von Zellen bzw. Inkubation mit rekombinantem Protein von Interesse.

Nachdem die funktionelle Bedeutung von OSF-2 ermittelt wurde, sollten dann mit Hilfe von Deletionsmutanten die durch OSF-2-vermittelten zellulären Eigenschaften einzelnen Domänen des Proteins zugeordnet werden.

Tumorzellen stehen in engem Kontakt mit Tumor-assoziierten Fibroblasten. Es ist indes noch unklar, ob das Sekretionsprotein OSF-2 innerhalb des Tumors von Tumorzellen selbst oder von Tumor-assoziierten Fibroblasten gebildet wird. In der vorliegenden Arbeit sollte daher mittels Arbeiten an humanem Tumorgewebe der OSF-2-exprimierende Zelltyp ermittelt werden. Arbeiten mit Primärzellen sind in der Tumorbilogie von enormer Bedeutung, da sie die komplexen Bedingungen innerhalb eines Tumors besser wiedergeben als Zelllinien und somit eine Brücke zwischen der artifiziellen *in vitro*-Situation und *in vivo*-Tierversuchen bilden. Die in dieser Arbeit verwendeten primären Zellen sollten daher möglichst umfassend untersucht und charakterisiert werden.

Die für OSF-2 postulierten adhäsiven Eigenschaften legen dessen Verwendung in der regenerativen Medizin nahe. Durch Beschichtung mit rekombinanten Proteinen, die die Adhäsion körpereigener Zellen erhöhen, kann die Integration von Implantaten in die jeweilige Zielregion verbessert werden. So wird derzeit beispielsweise durch Beschichtung von Metallimplantaten mit Calciumphosphaten oder osteogenen Wachstumsfaktoren (z.B. Bone Morphogenic Proteins, BMPs) eine Funktionalisierung des Implantats erreicht, die zu einem verbesserten Einwachsverhalten in das umgebende Gewebe führt. Besonders im Hinblick auf diese potentielle Verwendungsmöglichkeit müssen die durch OSF-2-vermittelten Funktionen genauestens analysiert werden, um tumorigene Eigenschaften des Proteins ausschließen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Laborausstattung

2.1.1 Materialien

Agarosegelsystem: Perfect Blue	Peqlab, Erlangen
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen
Analysewaage ABT 120-5DM	Kern und Sohn, Balingen-Frommern
Autoklav 5050 ELV	Tuttbauer, Breda, Niederlande
Bestrahlungsgeräte	
- Typ CDCK 4905 (Iso-Klassifizierung 5546)	GE Healthcare, München
- gammaCell 2000	Mølsgaard Medical, Kopenhagen, Dänemark
Brutschränke	
- Bakterienbrutschrank INE500	Memmert, Schwabach
- Zellkulturbrutschrank Heraeus Hera Cell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Zellkulturbrutschrank Heraeus T 10 A	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Trockenschrank Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Drehrad Stuart SB2	Keison, Chelmsford, UK
Einfrierhilfe Nalgene Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eismaschine AF 100	Scotsman, Mailand, Italien
Elektrophoreseapparaturen Mini Protean II	BioRad, München
Entwicklermaschine Cawomat2000 IR	Cawo Photochemisches Werk, Schrobenhausen
Expositionskassette	Cawo Photochemisches Werk, Schrobenhausen
Flaschenaufsatzdispenser Ceramus classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Fluoreszenzmikroskope	
- Nikon Eclipse TE2000-U	Nikon, Düsseldorf
- AxioVert 200M mit Colibri-System,	Carl Zeiss, Jena
Halogenlampe HXP 120, Axiocam MRm,	
- elektronische Steuerung Objektisch: SM-5	
- Druckluftregler für Mikroinjektion FemtoJet I	
- Inkubationskammer	
- Canon Powershot A640	Canon, Neu-Isenburg
Gefrierschrank -80°C, Hera freeze	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen
	Bosch, Stuttgart
	Siemens, München

Geldokumentation Syngene Multigenius	Syngene, Cambridge, UK
Bioimaging	
Gelgießschiene PerfectBlue Mini S	peqLab , Erlangen
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorff, Hamburg
Heizplatte VWR600 hotplate	VWR, Darmstadt
Koloniezählgerät Colony Counter	Oxford Optronix, Oxford, UK
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Lichtmikroskop Nikon TMS	Nikon, Düsseldorf
Luminometer Luminoskan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer Ikamag RCT	Ika, Staufen
Magnetrührer Speedsafe HI 180 C-2	Hanna instruments, Kehl am Rhein
Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrowellenherd M730	Philips, Hamburg
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop	peqLab, Erlangen
Netzgeräte	
- PowerPac 200	BioRad, München
- PowerPac Universal	BioRad, München
- EV231	peqLab, Erlangen
- EV222	peqLab, Erlangen
PCR-Thermocycler	
- Tpersonal	Biometra, Göttingen
- ThermalUno	VWR, Darmstadt
pH-MeterMP200	Mettler-Toledo, Giessen
Photometer	
- BioPhotometer	Eppendorff, Hamburg
Pipetten	
- Gilson Pipetman	Gilson, Middleton, USA
- Micronic Ergo Comfort Pipettes	Micronic, Lelystad, Niederlande
- Transferpette-8	BrandTech, Essex, USA
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Präzisionswaage PCB	Kern und Sohn, Balingen-Frommern
Rollmixer RollerMixer SRT6	Keison, Chelmsford, UK
Rotationsschüttler Rocky 3D	Labortechnik Fröbel, Lindau
RT-PCR-Cycler LightCycler® 1.5	Roche, Mannheim
Schüttelinkubator Certomat H	Sartorius Göttingen
Sterilbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Stickstofftank Arpege 170	German-Cryo, Jüchen
Tank-Blotter PerfectBlue Web S	peqLab, Erlangen

Ultra-Turrax T25	Ika Werke, Staufen
Ultraschallhomogenisator	
- Sonopuls HD2070	Bandelin electronic, Berlin
- Sonopuls Mini20	Bandelin electronic, Berlin
UVC-Strahler Spot 30 Zubehör Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
UV-Tisch TFX-35I	Biometra, Göttingen
Vakuum-Apperatur Plasmid Präparation	Qiagen, Hilden
Vortexer	
- VV3	VWR, Darm
- Vortex-Genie 2	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserbad	
- Polystat CC3	Huber Kältemaschinenbau, Offenburg
- 2019 Multiheat	Thermostatic Circulator, Bromma
Zellzählgerät Casy I - Modell TT	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifugen	
- Avanti J-30-I	Beckman Coulter, Krefeld
- Rotilabo Minizentrifuge Modell: 100VAC	Carl Roth, Karlsruhe
- Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Mikro 120	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
- Combi-Spin FVL-2400	Biosan, Riga, Lettland
Falkonzentrifugen	
- Universal 16R	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
- Multifuge 1LR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlzentrifugen	
- Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

µMACS Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Agarplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
AGFA G153 Entwickler	Agfa Graphics Germany, Düsseldorf
AGFA G354 Fixierer	Agfa Graphics Germany, Düsseldorf
Aluminiumfolie	Alujet-Universal, Düsseldorf
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Einmalspritzen	Codan Medical, Rodby, Dänemark
Einmalwägeschalen	Neolab, Heidelberg
FACS Filter	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien

Filterspitzen	Ratiolab, Dreieich
Gewebekulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebekulturschalen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Handschuhe	
MaiMed Sensitiv	Maimed, Neuenkirchen
Safeskin Nitrile	Kimberly Clark, Koblenz-Rheinhafen
ibiTreat high Culture Insert	Ibidi, München
Immersionsöl	Carl Zeiss, Jena
Kova Objektträger 10 mit Raster	Hycor Biomedical, Edinburgh, UK
Kryoröhrchen Nalgene	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Parafilm M	VWR, Darmstadt
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Greiner bio-one, Frickenhausen
PP-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen Ratiolab, Dreieich
Röntgenfilme Film Fuji Super RX	Fujifilm Europe, Düsseldorf
Roti-PVDF	Carl Roth, Karlsruhe
Skalpell Feather Einmal-Skalpellklinge	FEATHER Safety Razor Co., Osaka, Japan
Sterilfilter Millex	Millipore, Billerica, USA
UV Küvette mikro	Brand, Wertheim
Wägespatel	VWR, Darmstadt
Rotilabo Blottingpapier	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellschaber	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien

2.1.3 Chemikalien

Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose – low melt	Sigma Aldrich, München
AlamarBlue Cell Viability Reagent	Invitrogen, Darmstadt
Albumin Fraktion V pH 7,0	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt

Ammoniumsulfat	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Chloramphenicol	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Citronensäure Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Complete, EDTA-free, protease inhibitor cocktail tablets	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, München
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Doxizylin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DRAQ5	Axxora Deutschland GmbH, Lörrach
EDTA 0,02% Solution	Sigma Aldrich, München
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 99%	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 99% vergällt mit 1% MEK	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Forene	Abbott, Wiesbaden
Formalin Lösung 4%(w/v)	JT Baker, Deventer, Niederlande
G418	Biochrom, Berlin
Gentamycin	Sigma Aldrich, München
Giemsa	Merck, Darmstadt
Glutathion Sepharose 4B Beads	GE Healthcare, München
Glycerin p.a., 87%	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Hepes	AppliChem, Darmstadt
Hoechst (Bisbenzimid)H33342	Sigma Aldrich, München
H33266	Honeywell Specialty Chemicals, Seelze
Isopropanol p.a., 99,98%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma Aldrich, München
Kristallviolett	Sigma Aldrich, München
LB Agar	Carl Roth, Karlsruhe

LB Medium	Carl Roth, Karlsruhe
Lipofectamine TM 2000	Invitrogen, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfat	AppliChem, Darmstadt
Methanol 99,9%	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
NP40	Sigma Aldrich, München
PFA 4% in PBS	USB, Cleveland, USA
Polyethylenimin (PEI)	Sigma Aldrich, München
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt
Roti Block	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphoreses NF-Acrylamid/Bis – Lösung 40%	Carl Roth, Karlsruhe
Sodiumbicarbonat	PAA Laboratories, Pasching Österreich
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Serva, Heidelberg
Tris-base	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma Aldrich, München
TRizol Reagent	Invitrogen, Darmstadt
Trypanblau	Sigma Aldrich, München
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
X-gal	AppliChem, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	BioRad, München
Citronensäure	Carl Roth, Karlsruhe
PI3-Kinase Inhibitor LY 294002	Cell Signaling technology, Danvers, USA

2.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England BioLabs, Ipswich, USA
DNAse I	Qiagen, Hilden
Klenow DNA Polymerase I	New England BioLabs, Ipswich, USA
Polynukleotidkinase (PNK)	New England BioLabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Ipswich, USA
RNase A	Qiagen, Hilden

T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Biotherm <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Ares Bioscience, Köln

2.1.5 Größenmarker für die Elektrophorese

Protein Marker PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Roth
1 kb DNA-Ladder	New England BioLabs, Ipswich, USA
100 bp DNA-Ladder	New England BioLabs, Ipswich, USA
2-log DNA-Ladder	New England BioLabs, Ipswich, USA

2.1.6 Vektoren

Klonierung:

pGEM T easy	Promega, Mannheim
pCDNA3 (+)	Invitrogen, Karlsruhe
pC3_GFP	ehemaliges Labor Prof. Stauber (Rosorius et al. 1999)
pC3_mCherry	diese Arbeit
pF143_GFP	ehemaliges Labor Prof. Stauber (Rosorius et al. 1999)

2.1.7 Bakterienstämme

XL2 blue ultrakompetente Zellen	Stratagene, USA
---------------------------------	-----------------

Genotyp:

endA1 *gyrA96*(nal^R) *thi-1* *recA1* *relA1* *lac* *glnV44* F'[::Tn10 *proAB*⁺ *lacI*^q Δ(*lacZ*)M15 *Amy Cm*^R] *hsdR17*(r_K⁻ m_K⁺)

One Shot TOP 10 kompetente Zellen	Invitrogen, Darmstadt
-----------------------------------	-----------------------

Genotyp:

F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *nupG* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galE15* *galK16* *rpsL*(Str^R) *endA1* λ⁻

2.1.8 Nukleinsäuren

Oligonukleotide (Primer)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
DNA-Sequenzierungen	Genterprise, Mainz

Bei den Sequenzierungen wurden sowohl Standardprimer, als auch selbst konstruierte Oligonukleotide verwendet.

2.1.9 Oligonukleotide

Tabelle 2.1: Oligonukleotide für die Sequenzierung

Primername	Sequenz
1658	5`-GATATCCGTAGAGGTTTGGAG-3`
1655	5`-ACTTCCACGAGGTGTCCTAG-3`
1656	5`-TTGTTTCGTGGTAGCACCTTC-3`
1657	5`-CTCTCCATGGATCACTTCAG-3`
630	5`-ATTAGGCTTGGCATCTGCTC-3`
631	5`-CTCGCGGAATATGTGAATCG-3`
1669	5`-ATTAGGCTTGGCATCTGCTC-3`
1648	5`-CACCTGACACCAGGAGTTTTTC-3`
1647	5`-CACTAGGATTTCTACTGGAGGTG-3`
1646	5`-CATGTGACTATGTAAAGCATTTCAG-3`

Tabelle 2.2: Oligonukleotide für die Klonierung

Primername	Sequenz
OSF_2 for	5`-AAACCGCGGATGATTCCCTTTTTACCCATGTT-3`
OSF_2 rev	5`-AAAGCTAGCCTGAGAACGACCTTCCCTTAATC-3`
Primer für OSF-2ΔSek.	5`-AAACCGCGGATGAACAATCATTATGACAAGATCTTG-3`
OSF_EMI	5`-AAAGCTAGCTGCTGGGCAGCCTTTCATTC-3`
OSF_FAS1	5`-AAAGCTAGCAAGCACACGGTCAATGAC-3`
OSF_FAS2	5`-AAAGCTAGCTAGGACCTGATCAATCAAATGG-3`
OSF_FAS3	5`-AAAGCTAGCGATGATCTCGCGGAATATGTG-3`
OSF_FAS4	5`-AAAGCTAGCGAGGAGTTTATCTACAACATG-3`

Tabelle 2.3: Oligonukleotide für RT-PCR und Real Time-PCR

Primername	Sequenz
OSF-2 RT-PCR for	5`-ATTAGGCTTGGCATCTGCTC-3`
OSF-2 RT-PCR rev	5`-CTCGCGGAATATGTGAATCG-3`
GAP-DH RT-PCR for	5`-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3`
GAP-DH RT-PCR rev	5`-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3`
OSF-2 Real Time for	5`-GTCTTTGAGACGCTGGAAGG-3`
OSF-2 Real Time rev	5`-AGATCCGTGAAGGTGGTTTG-3`
RNA-POLII for	5`-GCACCACGTCCAATGACAT-3`
RNA-POLII rev	5`-GTGCGGCTGCTTCCATAA-3`

Tabelle 2.4: Oligonukleotide für das Oligoannealing

Primername	Sequenz
Sekretionssignal for	5'-CTAGCGGCGTTTATAGGGTTAACAATAAGCAGCAATAGTAG-3'
Sekretionssignal rev	5'-GGATGATTCCTTTTTACCCATGTTTTCTCTACTATTGCTG-3'

Tabelle 2.5: Oligonukleotide für den Virus-Screen

Primername	Sequenz
MY09	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'
MYII	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'

2.1.10 Antikörper

Tabelle 2.6: Primärantikörper

Antigen	Art	Quelle	Bezugsquelle
Akt (pan) #4691	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling technology, Danvers, USA
OSF-2	polyklonal	Kaninchen	BioVendor, Heidelberg
P38 MAP kinase #9212	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling technology, Danvers, USA
Phospho-Akt #3787 (IHC-spezifisch)	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling technology, Danvers, USA
Phospho-Akt #9271	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling technology, Danvers, USA
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) #9211	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling technology, Danvers, USA
Phospho-p44/42 MAPK Thr202/Thr204) #4370	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling technology, Danvers, USA
E-Cadherin	monoklonal	Maus	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
N-Cadherin	monoklonal	Maus	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Vimentin	monoklonal	Maus	NeoMarkers, California, USA
Aktin	polyklonal	Kaninchen	Sigma Aldrich, München
β -Tubulin	polyklonal	Ziege	Abcam, Cambridge, UK
EpCAM	monoklonal	Maus	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Tabelle 2.7: Sekundärantikörper

Antigen	Quelle	Verdünnung	Bezugsquelle
Maus (HRP)	Ziege	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, California, USA
Maus (Cy3)	Ziege	1:500	Dianova GmbH, Hamburg
Kaninchen (HRP)	Ziege	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, California, USA
Kaninchen (Cy3)	Ziege	1:500	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege (HRP)	Esel	1:10000	Santa Cruz Biotechnology, California, USA
Ziege (MFP555)	Esel	1:200	MoBiTec, Göttingen

2.2 Lösungen, Medien und Puffer

2.2.1 Stammlösungen

Alle hier genannten Stocklösungen waren 1000x konzentriert und wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.2.8: Verwendete Stammlösungen

Stocklösung	Konzentration	Endkonzentration	Lagerung
Ampicillin	50 mg/ml	50 µg/ml	-20°C
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml	-20°C
Valproic acid	1,5 M	1,5 mM	-20°C
Hydroxyurea	1,5 M	1,5 mM	-20°C
Heparin	10 mg/ml	100 µg/ml	4°C
ECGS	50 mg/ml	50 µg/ml	-20°C
Ethidiumbromid	2 mg/ml Stock	0,5 µg/ml	4°C

2.2.2 Kulturmedien

2.2.2.1 Zellkulturmedien und -zusätze

DMEM	Invitrogen, Darmstadt
DMEM/F12	Invitrogen, Darmstadt
Dulbecco`s PBS	Invitrogen, Darmstadt
ECGS (endothelial cell growth factor)	c.c.pro, Oberdorla
Fetal bovine serum	Sigma-Aldrich, München
Fetal bovine serum	Invitrogen, Darmstadt
Glutamin	Invitrogen, Darmstadt
Heparin sodium salt	Sigma Aldrich, München
HEPES	Invitrogen, Darmstadt
Hydrocortison	Sigma Aldrich, München
Hydroxyurea (HU)	Sigma Aldrich, München

Insulin	Sigma Aldrich, München
Medium 199	Invitrogen, Darmstadt
MEM	Invitrogen, Darmstadt
MEM non essential amino acids	Invitrogen, Darmstadt
Optimem, serumreduziertes Medium	Invitrogen, Darmstadt
Pen Strep (Penicillin/Streptomycin)	Invitrogen, Darmstadt
Puromycin Dihydrochlorid	AppliChem, Darmstadt
RPMI 1640	Invitrogen, Darmstadt
Sodiumbicarbonat 7,5%	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Darmstadt
Valproic acid (VPA)	Sigma Aldrich, München

2.2.3 Lösungen und Puffer

Alle nicht hier aufgeführten Lösungen und Puffer werden direkt bei der Methode aufgeführt, in der sie eingesetzt wurden.

Citratpuffer (IHC)	9 ml 0,1 M Citronensäure 41 ml 0,1 M Natriumcitrat 450 ml Aqua dest. pH 6
DNA-Probenpuffer (6x)	100 mM EDTA 20% Glycerin (v/v) 0,25% Bromphenolblau (w/v)
IP-Lysepuffer	50 mM Tris, pH8 150 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5% NP40 1 mM DTT 1 mM PMSF 1 Tablette/10ml Complete Protease Inhibitor
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4

RIPA modifiziert	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% Natriumdesoxycholat 0,5 mM PMSF 1% NP40 0,1% SDS 1x Complete Protease Inhibitor
SDS-Laufpuffer	250 M Tris 1,92 M Glycin 1% SDS
SDS-Probenpuffer (Phospho-Lysate)	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% SDS 10% Glycerin 50 mM DTT 0,01% Bromphenolblau
SDS-Probenpuffer (6x)	62,5 mM Tris HCl, pH 6,8 5% β -Mercaptoethanol 3% SDS 10% Glycerin 0,01% Bromphenolblau
TAE (50x)	2 M Tris 1 M Natriumacetat 50 mM EDTA pH 7,4
TBS (10x)	500 mM Tris-HCl, pH 7,4 1500 mM NaCl
Wet Blot Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol

2.3 Verwendete Kits

µMACS Epitope Tag Protein Isolation Kits	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CellTiter-Glo	Promega, Mannheim
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
ECL plus Western-Blotting Detection Kit	GE Healthcare, München
ECL Western-Blotting Detection Kit	GE Healthcare, München
Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
LightCycler FastStart DNA Master ^{plus} SYBR GreenI	Roche, Mannheim
pGEM T easy Vector systems	Promega, Mannheim
Qiaquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
Qproteome Cell Compartment Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen MinElute Cleanup Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep 8 miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution	Millipore, New Hampshire, USA
Takara DNA Ligation Kit	Lonza, Basel, Schweiz
Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit	Roche, Mannheim
VenorGem Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin

2.4 Software/computergestützte Analysen

Tabelle 2.2.9: Verwendete Software

Programm	Referenz/Internetseite
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
ExpASy Server	http://expasy.org/
Gene Cards	http://www.genecards.org/
ScanProsite	http://prosite.expasy.org/scanprosite/
SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/

DNA-Sequenzen wurden mit den Programmen BioEdit und Gene Construction Kit analysiert. Homologierecherchen mit DNA- und Proteinsequenzen sowie Vergleiche mit genomischer DNA erfolgten unter Verwendung der Ensembl-Datenbank und dem BLAST-Programm. Für die Analyse der Proteinsequenz wurden die in Tabelle 2.9 aufgeführten Algorithmen verwendet. Neben den Standard-Office-Programmen wurden zur Datenauswertung und Bildbearbeitung Gene Spring GX, AxioVision 3.0, Leica Confocal Software, PhotoShop 5 und Canvas 9 genutzt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden *E.coli* XL2blue, *E.coli* TOP10 oder *E.coli* BL21 auf Mg²⁺-haltigen LB-Platten ausgestrichen. Nach 8 h wurden 10 ml SOB-Medium mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 5 ml dieser Impfkultur wurden am nächsten Tag in 200 ml SOB-Medium überführt und bei Raumtemperatur geschüttelt. Sobald eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war, wurde die Kultur 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4°C und 400 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 80 ml 2% DMSO-enthaltendem TBjap-Puffer resuspendiert und weitere 10 min in Eiswasser inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde nochmals 10 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 19 ml 2% DMSO-enthaltendem TBjap-Puffer resuspendiert und 1 ml DMSO hinzugefügt. Die Suspension wurde dann 10 min auf Eis inkubiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TBjap (Transformation buffer Japanese)	10 mM Pipes 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl mit KOH auf pH 6,7
SOB-Medium	2% Peptone 0,5% Bacto Yeast Extract 0,1 M NaCl 0,01 M MgCl ₂ oder MgSO ₄

2.5.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von kompetenten *E.coli* wurden 30 µl Bakterien auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz oder Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C im Wasserbad. Nach 1-minütiger Inkubation auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zum Transformationsansatz hinzugefügt und für 1 h bei 37°C und 140 rpm geschüttelt. Die Bakterien wurden 3 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, in LB-Medium resuspendiert und auf Agarplatten mit der jeweiligen Antibiotikaresistenz ausplattiert. Für unproblematische Transformationen wurden die Bakterien nach dem Hitzeschock kurz auf Eis inkubiert und anschließend direkt ausplattiert. Die Bakterienplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5.3 Übernachtkulturen

Zum Animpfen von Übernachtkulturen wurden Glycerin-Dauerkulturen oder Klone von LB-Agarplatten verwendet. Die Bakterien wurden bei 170 rpm und 37°C über Nacht unter aeroben Bedingungen in LB Medium angezogen und anschließend direkt zur Isolation von Plasmid-DNA verwendet.

2.5.4 *E. coli* Glycerin-Dauerkulturen

10 ml einer Übernachtkultur wurden 5 min bei 4600 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Bakterienpellet in 500 – 1000 µl 40%igem Glycerin resuspendiert. Die Glycerinkultur wurde in Cryo-Tubes überführt und sofort bei -80°C gelagert.

2.5.5 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Übernachtkulturen erfolgte, je nach benötigter Plasmid-DNA-Menge, mit Hilfe von Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Bei der DNA-Isolation mit dem QIAprep 8 Miniprep Kit erfolgte die Elution mit 150 µl Elutionspuffer, bei Verwendung des QIAprep Spin Maxiprep Kits erfolgte die Elution mit 200 µl Elutionspuffer.

2.5.6 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind DNA-spaltende Enzyme bakteriellen Ursprungs die zur Linearisierung zirkulärer DNA-Moleküle oder zum Ausschneiden spezifischer Bereiche eines DNA-Moleküls eingesetzt werden. Hierbei können, in Abhängigkeit des verwendeten Enzyms, 5'- bzw. 3'-Überhänge ("sticky ends") oder doppelsträngige DNA-Enden ("blunt ends") entstehen. Es wurden Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs mit den vom Hersteller angegebenen Puffern verwendet. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurde 1 µg DNA eingesetzt, ein präparativer Verdau erfolgte mit 5 µg DNA. Der Verdau erfolgte 45 bzw. 90 min bei 37°C.

2.5.7 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt und können durch UV-Licht (265 nm) visualisiert werden. Es wurden standardmäßig 1-2%ige Agarosegele verwendet. Agarose wurde mit 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle zum Sieden gebracht, Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugegeben und in eine entsprechende Gelgießschiene gegossen, wobei ein Kamm Taschen für das Probevolumen freihielt. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt, das Gel in einer Laufkammer mit 1x TAE-Puffer überschichtet, und die mit

5x Probenpuffer versetzten DNA-Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Die Laufkammer wurde mit einer konstanten Spannung von 80 V betrieben. Die Größe der einzelnen DNA-Fragmente wurde anhand eines ebenfalls aufgetrennten Größenstandards bestimmt.

2.5.8 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Die DNA-Isolation aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die Elution der aufgereinigten DNA erfolgte angepasst an die ausgeschnittene Menge DNA mit 30 bis 50 µl Elutionspuffer.

2.5.9 Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen und von PCR-Produkten

Zur Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen und zur Reinigung von PCR-Produkten wurde das QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution der gereinigten DNA erfolgte mit 30 µl Elutionspuffer.

2.5.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA beruht auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm, wobei $OD_{260} = 1 \text{ } 50 \text{ } \mu\text{g}$ doppelsträngiger DNA/ml entspricht. Der Quotient von OD_{260}/OD_{280} erlaubt eine Aussage bezüglich der Reinheit der Probe. Bei reiner DNA liegt der Quotient bei 1,8. Niedrigere Werte deuten auf Proteinverunreinigungen hin, da aromatische Aminosäuren bei 280 und Peptidbindungen bei 230 nm absorbieren. Werte, die 1,8 überschreiten, können auf RNA-Kontaminationen hindeuten. Reine RNA-Lösungen haben einen OD_{260}/OD_{280} -Wert von $> 2,0$.

2.5.11 Ligation von DNA

Die Ligationsreaktion wurde mit dem Takara DNA Ligation Kit der Firma Lonza nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bindung von Phosphodiesterbrücken zwischen 5'- und 3'-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle, wobei Mg^{2+} und ATP als Kofaktoren benötigt werden. Vektor und Insert wurden in einem stöcheometrischen Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Anschließend wurden kompetente *E. coli* Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert (s. Kapitel 2.5.2).

2.5.12 Dephosphorylierung von DNA am 5'-Ende

Um eine intramolekulare Religation des linearisierten Vektors bei der Ligation zu verhindern, wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Vektor-DNA mittels alkalischer

Die Bakterienkolonien wurden mit sterilen Zahnstochern oder Pipettenspitzen von einer LB-Agar-Platte gepickt, der PCR-Ansatz damit angeimpft und anschließend auf einer weiteren LB-Agar-Platte in einem definierten Bereich ausgestrichen, um nach der PCR auf positive Klone zurückgreifen zu können. Das Reaktionsvolumen des Screening-Ansatzes betrug 25 µl.

Reaktionsbedingungen:

1. 94°C 5 min
2. (30 Zyklen)
94°C 1 min
65°C 1 min
72°C 1 min DNA-Synthesezeit: 1 min/kb
3. 72°C 7 min
4. 4°C ∞

2.5.15 Sequenzanalyse

Alle Plasmide wurden von der Firma Genterprise nach dem Prinzip des Kettenabbruchs von Sanger sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme BioEdit und BLAST überprüft.

2.5.16 Oligo-Annealing

Kurze DNA-Fragmente aus komplementären Oligonukleotiden können bei Klonierungen als Inserts verwendet werden. Hierzu wurden zunächst die 5'-Enden der synthetischen Oligonukleotide phosphoryliert, wobei 1 µg der in HPLC-H₂O gelösten Oligonukleotide mit 0,5 µl 10 mM dNTPs, 1 µl 10x PNK-Puffer und 0,5 µl Phosphonucleotidkinase (PNK) versetzt, und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt wurden. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die beiden komplementären, phosphorylierten Oligonukleotide vereinigt, mit 2 µl NEB Puffer 3 versetzt, in einem Wasserbad auf 100°C erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die hybridisierten Oligonukleotide konnten direkt zur Ligation verwendet werden.

2.5.17 Isolation von RNA aus Zellen und Geweben

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen oder Gewebe wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurden 2×10^7 Zellen mit PBS gewaschen und in 1 ml Trizol aufgenommen. Sollte RNA aus Gewebe isoliert werden, so wurde dieses zerkleinert, in Trizol aufgenommen und mit Hilfe des Ultra-Turrax homogenisiert. Dann wurden 200 µl Chloroform/ml Trizol zugegeben, 15 s kräftig per Hand geschüttelt und nach 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 15 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Die hierbei

entstehende transparente Phase wurde abgenommen und tropfenweise mit einem Volumen 70%igem Ethanol versetzt. Im Anschluss wurde das RNeasy Mini Kit verwendet.

2.5.18 Bestimmung der RNA-Konzentration und -Qualität

Die RNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop oder Spektrophotometer gemessen. Die RNA-Qualität wurde auf einem Agilent RNA 6000 Nano LabChip gemäß Herstellerangaben analysiert.

2.5.19 cDNA-Synthese

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase kann RNA in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Bei der RT-PCR erfolgt zunächst eine cDNA-Erststrangsynthese mit der Gesamt-RNA als Matrize. Darauf folgt eine PCR (2.4.13), in der die zuvor gebildete cDNA als Vorlage dient. Zur cDNA-Synthese wurde das Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit der Firma Roche mit 1 µg Gesamt-RNA/Ansatz, Oligo(dT)-Primern und hexameren Oligonukleotiden zufälliger Sequenz ("random") nach Herstellerangaben verwendet.

2.5.20 Sequenzierung von OSF-2-Isoformen (C-Terminus)

Zur Sequenzierung von unterschiedlichen OSF-2-Isoformen wurde nach der RNA-Isolation aus Zellen oder Gewebe (s. Kapitel 2.5.17) cDNA synthetisiert (s. Kapitel 2.5.19), der C-terminale OSF-2-Bereich amplifiziert, und das entstandene DNA-Fragment gemäß Herstellerangaben in das pGEM T easy Vector System der Firma Promega inseriert. Aus den entstandenen Klonen wurde DNA isoliert und der entsprechende Bereich bei der Firma Genterprise, Mainz sequenziert.

2.5.21 Real Time-PCR

Die Real Time-PCR ist eine Methode zur DNA-Quantifizierung. Durch Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes (z.B. SYBR Green I) in doppelsträngige DNA-Bereiche nimmt die Fluoreszenz während der PCR proportional zur Menge des sich bildenden PCR-Produktes zu, und ermöglicht so die Quantifizierung der Zielsequenz. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse kann im Anschluß an die PCR die Spezifität des PCR-Produktes überprüft werden. Hierbei wird das PCR-Produkt langsam denaturiert wobei der interkalierende Farbstoff freigesetzt wird und die Fluoreszenz abnimmt. Da die Schmelztemperatur spezifisch für das jeweilige PCR-Produkt ist, deuten zusätzliche Peaks in der Schmelzpunktanalyse auf weitere unspezifische PCR-Produkte hin. Zur Durchführung der Real Time-PCR wurde der LightCycler® 1.5 der Firma Roche verwendet. Das Standard-Real Time-PCR-Reaktionsvolumen betrug 20 µl.

Standard-Real Time-PCR-Ansatz:

- 2 µl cDNA
- 4 µl LC FastStart DNA Master^{plus} SYBR GreenI
- 50 ng Primer fwd.
- 50 ng Primer rev.
- H₂O_{dd} ad. 20 µl

Real Time PCR, Reaktionsbedingungen OSF-2:

1. 95°C 600 s Aufschmelzen der Template-DNA
2. 95°C 10 s
62°C 5 s Hybridisierung der Oligonukleotide
72°C 5 s DNA-Synthese
3. 72°C → 95°C Schmelzkurvenanalyse

Real Time PCR, Reaktionsbedingungen RNA-POLII:

1. 95°C 600 s Aufschmelzen der Template-DNA
2. 95°C 10 s
60°C 15 s Hybridisierung der Oligonukleotide
72°C 15 s DNA-Synthese
3. 72°C → 95°C Schmelzkurvenanalyse

2.5.22 Isolation genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue-Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben isoliert.

2.5.23 HPV-Screen

Der humane Papillomavirus wurde mittels PCR in genomischer DNA nachgewiesen. Hierzu wurden die in Kapitel 2.1.9 angegebenen Consensus-Primer verwendet.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Herstellung von Proteinlysat aus Zellkulturen

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das hierbei entstehende Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und nochmals 5 min bei 1500 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in RIPA-Puffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Sonifikation der Zellsuspension

wurde diese 20 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, das Lysat aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.6.2 Isolation von Proteinen aus Tumor/Normalgewebe

Zur Isolation von Proteinen aus Tumor/Normalgewebe wurden 50 mg Gewebe in 300 µl Lysepuffer homogenisiert, anschließend 30 min auf Eis inkubiert und 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines Bradford Assays (s. Kapitel 2.6.4) bestimmt und 5 µg Protein für die Western-Blot-Analyse verwendet.

Lysepuffer zur Proteinisolation aus Gewebe:

10 mM Tris-HCl, pH7,5

1 mM MgCl₂

1 mM EGTA

0,5% Chaps

10% Glycerol

5 mM Mercaptoethanol

0,1 mM PMSF (kurz vor Verwendung des Ultra-Turrax zugegeben)

Proteaseinhibitorcocktail (25x konz.) (kurz vor Verwendung des Ultra-Turrax zugegeben)

2.6.3 Subzelluläre Fraktionierung

Die subzelluläre Fraktionierung wurde unter Verwendung des Qproteome Cell Compartment Kit der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Ladekontrolle wurde mit α -GAP-DH (Zytosolische Fraktion), α -Lamin B1 (Nukleäre Fraktion) und α -Vimentin (Membran-, Zytoskelettfraktion)-Antikörpern durchgeführt.

2.6.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford beruht auf der unspezifischen Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 an basische Seitenketten von Aminosäuren. Da sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs hierbei von 462 nm auf 595 nm verschiebt, gilt die Zunahme der Absorption bei 595 nm als Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung (Bradford 1976). Die Nachweisgrenze liegt bei 0,05 bis 0,5 µg Protein pro ml. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde die Bradford-Stammlösung (BioRad Protein Assay) 1:5 mit Aqua dest. verdünnt, 2 µl der zu messenden Proteinlösung mit 1 ml des verdünnten Bradfordreagenz gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektrophotometer gemessen und mittels einer mit Rinderserumalbumin erstellten Eichgeraden quantifiziert.

2.6.5 Ko-Immünpräzipitation

Die Ko-Immünpräzipitation ist eine Technik zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Hierbei wird mittels eines spezifischen Antikörpers ein Antigen aus einer Lösung aufkonzentriert, wobei das Antigen noch zusätzlich Interaktionspartner bindet. Das präzipitierte Protein und seine Interaktionspartner können im Anschluss an die Ko-Immünpräzipitation mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Bei der Ko-Immünpräzipitation wurden 10^7 transient kotransfizierte Zellen in IP-Lysepuffer lysiert und unter Verwendung des μ MACS Epitope Tag Protein Isolation Kits gemäß Herstellerangaben präzipitiert.

2.6.6 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Laemmli 1970). Hierbei werden die Proteine im 4%igen Sammelgel zu einer scharfen Bande fokussiert und anschließend im 8 - 15%igen Trenngel nach ihrem relativen Molekulargewicht aufgetrennt.

Die Proteinlysate wurden unmittelbar vor dem Beladen des Gels mit 6fach konzentriertem Gelladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Da der Gelladepuffer denaturierende Agenzien und einen Überschuss SDS enthielt, wurden die Proteinlysate hierbei vollständig entfaltet und ihre Eigenladung maskiert. Der Gellauf wurde bei einer Spannung von 50 - 100V in einfachem SDS-Laufpuffermedium durchgeführt. Die Molekularmassenbestimmung erfolgte anhand eines ebenfalls aufgetragenen Proteinmarkers.

Trenngellösung	1,5 M Tris/HCl, pH 8,9
	0,1% SDS (w/v)
	8-15% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
	0,05% TEMED (v/v)
	0,1% APS (w/v)

Sammelgellösung	1,5 M Tris/HCl pH 6,8
	0,1% SDS (w/v)
	4% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
	0,05% TEMED (v/v)
	0,1% APS (w/v)

2.6.7 Proteinnachweis mittels Coomassie-Färbung

In einem Polyacrylamidgel aufgetrennte Proteine können durch den blauen Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue gefärbt werden, da dieser unspezifisch an anionische und aromatische Seitenketten von Proteinen bindet. Die Nachweisempfindlichkeit dieser Methode liegt bei 100 ng bis 1 µg Protein. Bei der Coomassie-Färbung wurden Polyacrylamidgelen für 30 min auf dem Rotationsschüttler in Coomassie Brilliant Blue-Lösung inkubiert. Zum Entfärben wurden die Gele mehrere Stunden in Entfärbelösung auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Die Entfärbelösung musste hierbei mehrmals gewechselt werden. Alternativ wurde das Gel zum Entfärben mehrmals in Aqua dest. in der Mikrowelle aufgeköcht.

Färbelösung	0,2% Coomassie Brilliant Blue G 250 (w/v) 40% Methanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v)
Entfärbelösung	40% Methanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v)

2.6.8 Western-Blot (Immunoblot)

Bei einem Western-Blot werden die während der SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen, wo sie mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden können. Die Proteinübertragung erfolgt elektrophoretisch, wobei die Proteine unspezifisch über hydrophobe Wechselwirkungen an der Trägermembran haften. In dieser Arbeit wurde das Tank-Blot-System verwendet, bei dem der Proteintransfer in einer Wet-Blot-Kammer durchgeführt wird. Vor dem Transfer wurde die zu verwendende PVDF-Membran 1 min in 100% Methanol aktiviert und anschließend in Wet-Blot-Puffer äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgte bei 100 V für 90-120 min. Anschließend wurde eine Ponceau S-Färbung der PVDF-Membran (s. Kapitel 2.6.9) und eine Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels zur Kontrolle des Proteintransfers durchgeführt. Um unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF Membran zu blockieren wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer auf dem Rotationsschüttler inkubiert, und anschließend 1 h bei Raumtemperatur oder ü.N. bei 4°C in Primärantikörperlösung geschüttelt. Es folgten drei 5-minütige Waschschrte mit PBS und eine einstündige Inkubation in Sekundärantikörperlösung auf dem Rotationsschüttler. Nachdem die Membran 3 mal 5 min mit PBS gewaschen wurde, wurde zur Detektion der HRP-Aktivität das ECL oder ECL plus Western-Blotting Detection Kit von GE Healthcare nach Herstellerangaben verwendet.

Wurden Antikörper verwendet die phosphorylierte Proteine detektieren sollten, so wurde in allen Puffern und Lösungen PBS durch TBS ersetzt und die unten aufgeführte Primärantikörperlösung verwendet.

Blockierungspuffer	5% Milchpulver in PBS
Primärantikörperlösung	5% Milchpulver in PBS
Sekundärantikörperlösung	5% Milchpulver in PBS
Blockierungspuffer phospho-Antikörper	5% Milchpulver in TBS
Primärantikörperlösung phospho-Antikörper	5% BSA in TBS
Sekundärantikörperlösung phospho-Antikörper	5% Milchpulver in TBS

2.6.9 Ponceau S-Färbung geblotteter Proteine

Zur Kontrolle des Proteintransfers können auf eine PVDF-Membran geblottete Proteine mit Ponceau S, einem roten Azofarbstoff, der reversibel an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen bindet, angefärbt werden. Die PVDF-Membran wurde hierzu kurz in PBS oder TBS gewaschen, 5 min in Ponceau S-Lösung inkubiert und durch Waschen mit Aqua dest. entfärbt, wobei Proteinbanden rot sichtbar wurden.

Färbelösung	0,5% Ponceau S (w/v)
	1% Trichloressigsäure (v/v)

2.6.10 Entfernen von an Membranen gebundenen Antikörpern

Um bereits an die Membran gebundene Antikörper zu entfernen wurde die Membran 15 min bei Raumtemperatur mit Reblot Plus Strong Solution der Firma Millipore inkubiert und anschließend 3 mal 15 min mit PBS oder TBS gewaschen. Die Membran musste jetzt erneut 1 h mit Blockierungspuffer inkubiert werden, bevor ein weiterer Primärantikörper verwendet werden konnte.

2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Fluorophore können mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden, und gelangen durch Emission langwelligeren Lichts wieder in den Grundzustand. Werden Fluorophore an Proteine fusioniert oder Proteine mit Fluorophor-konjugierten Antikörpern markiert, so kann deren Lokalisation in einer Zelle bestimmt werden. Zu den häufigsten an Antikörper konjugierte Fluorophore gehören Rhodamin, FITC und Cy3. Soll dagegen die zeitliche und räumliche Verteilung von Proteinen in lebenden Zellen analysiert werden, so werden Proteine häufig an das grün fluoreszierende Protein GFP fusioniert. GFP fluoresziert bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün, was sich auf das eigentliche, sich autokatalytisch aus der Tripeptidsequenz Ser₆₅–Tyr₆₆–Gly₆₇ bildende, Fluorophor zurückführen lässt. Zur Markierung von Proteinen können jedoch auch modifizierte GFP-Varianten verwendet werden, die andere Fluoreszenzspektren aufweisen. Alle Fluoreszenzanalysen in dieser Arbeit wurden an einem

inversen Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss durchgeführt und digital mit Hilfe der Programme Photoshop CS2 und AxioVison 4.7 analysiert.

2.7.1 Immunfluoreszenzfärbung

Mittels der indirekten Immunfluoreszenz können sowohl endogene als auch überexprimierte Proteine sichtbar gemacht werden. In MatTek-Schälchen ausgesäte (transfizierte) Zellen wurden mit PBS gewaschen und 20 min bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Anschließend wurden sie erneut mit PBS gewaschen und 5 min mit 0,1% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurden die permeabilisierten Zellen 1 h bei Raumtemperatur mit Primärantikörper in PBS inkubiert, mehrmals mit PBS gewaschen und eine weitere Stunde mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert. Mussten die Zellen über Nacht mit dem Erstantikörper inkubiert werden, so wurden die MatTek-Schälchen mit angefeuchteten Tüchern bedeckt und bei 4°C im Kühlraum gelagert.

2.7.2 Kernfärbung mit Hoechst 33342

Hoechst 33342 ist ein Farbstoff, der an die kleine Furche der DNA bindet. Dort fluoresziert er nach Anregung mit UV-Licht im Bereich des hellblauen Spektrums. Der Farbstoff bindet bevorzugt an AT-Regionen in Nukleinsäuren, was ihn für eine DNA-Färbung sehr spezifisch macht. Hoechstfarbstoffe sind wasserlöslich und zeichnen sich durch eine geringe Zytotoxizität aus. Fixierte, permeabilisierte Zellen wurden 5 – 10 min bei Raumtemperatur mit Hoechst 33342 (Endkonzentration von 5 µm) inkubiert und konnten anschließend direkt mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

2.7.3 Membranfärbung mit Rhodamin-WGA

Zur Färbung der Plasmamembran wurden fixierte Zellen 30 min mit Rhodamin-WGA (1:50, Molecular Probes) inkubiert und anschließend am Fluoreszenzmikroskop bzw. am konfokalen Mikroskop analysiert.

2.8 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie wird die Spezifität von Antikörpern genutzt, um bestimmte Antigene am histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Immunhistochemische Untersuchungen der OSF-2- Expression wurden an Schnitten formalinfixierter und in Formalin eingebetteter Gewebe oder Zellpellets durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert, 3 min in Aqua dest. und 5 min in Citratpuffer inkubiert und 40 min in Citratpuffer gekocht. Nach 15-minütiger Inkubation in frischem Citratpuffer wurde die endogene

Peroxidaseaktivität durch 20-minütige Inkubation in 0,025% H₂O₂ in Methanol blockiert. Nach einem 5-minütigen Waschschriff in Aqua dest. und TBST wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit Primärantikörper inkubiert. Anschließend folgten zwei 5-minütige Waschschriffe in 400 mM NaCl-haltigem TBST und eine 30-minütige Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper. Nach zwei weiteren 5-minütigen Waschschriffen mit TBST wurden die Schnitte 30 min mit HRP-gekoppeltem Streptavidin inkubiert und zwei mal 5 min mit TBST gewaschen. Zur Detektion der Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte 1 min mit 3,3-Diaminobenzidin (DAB) in 0,6% H₂O₂ inkubiert, mit Hämalaun in PBS gegengefärbt und 10 min mit Leitungswasser gewässert. Nach Dehydration in einer aufsteigenden Alkoholreihe und 10-minütiger Inkubation in Xylol konnten die Schnitte eingedeckelt werden. Immunhistochemische Färbungen anderer Proteine wurden gemäß Herstellerangaben der jeweiligen Antikörper durchgeführt.

2.9 Zellkultur

2.9.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung von Säugerzellen erfolgte gemäß den Angaben des Global Bioresource Center (ATCC). Die Zellen wurden in 10% DMSO-haltigem FCS eingefroren und bei -80°C oder im Stickstofftank gelagert. Das Auftauen erfolgte im Wasserbad bei 37°C, wobei die Zellen anschließend in Kulturmedium aufgenommen, 5 min bei 1500 rpm abzentrifugiert und erneut in Kulturmedium aufgenommen wurden.

2.9.2 Behandlung eukaryotischer Zellen

Mindestens 3 Stunden vor Behandlung mit Inhibitoren, stimulierenden Agenzien oder rekombinantem OSF-2 wurde den Zellen das Serum entzogen. Die Dauer der Behandlung lag je nach Versuch und verwendeten Agenzien zwischen 20 min und 9 Tagen.

2.9.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Hier unterscheidet man das vorübergehende, transiente Einbringen der DNA in Form eines Plasmids, von der stabilen Integration der Fremd-DNA in das Genom. In der vorliegenden Arbeit wurde das Transfektionsreagenz LipofectamineTM 2000 der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Die Transfektion wird hierbei durch kationische Lipide vermittelt. Desweiteren wurde das kationische Polymer Polyethylenimin (PEI) verwendet, welches mit Fremd-DNA polyplexe Micellen bindet, die von den Zellen aufgenommen werden können. Zur Transfektion im 96-well Format wurden 3 µl PEI in 15 µl PBS mit 1 µg DNA in 15 µl PBS gemischt und auf die zu transfizierenden Zellen gegeben.

2.9.4 Herstellung konditionierten Mediums

Zur Herstellung konditionierten Mediums wurde 12 h nach Transfektion von 293T-Zellen das Medium gegen 1% FCS-haltiges Medium ausgetauscht. Nachdem die Zellen 24 h in diesem Medium inkubiert wurden, wurde das Medium abgenommen und entweder direkt verwendet oder bei -80°C gelagert.

2.9.5 Isolation primärer Zellen aus humanem oder murinem Tumorgewebe

Zur Isolation primärer Zellen wurde Tumormaterial mehrmals mit PBS gewaschen und mit Hilfe eines Skalpells zerkleinert. Das Gewebe wurde mit 5 ml PBS, 150 U Collagenase I und 4,8 mg Dispasell in einem 50 ml Falcon 90 min bei 130 rpm und 37°C geschüttelt. Anschließend wurde 0,01 MU DNaseI zugegeben und die Zellsuspension mit einem Cell Strainer (70 µm) gefiltert, 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, und in 20% FCS-enthaltendem RPMI-Medium ausgesät.

2.9.6 Separation primärer Tumorzellen und Tumor-assoziiierter Fibroblasten

Die Separation primärer Tumorzellen und Tumor-assoziiierter Fibroblasten erfolgte mit Hilfe von MACS-Microbeads der Firma Miltenyi Biotec gemäß Herstellerangaben. Alternativ wurden primäre Tumorzellen und Tumor-assoziierte Fibroblasten mittels differentieller Trypsinierung separiert. Hierzu wurden die Primärzellen nach der Isolation als Mischkultur ausgesät und die Kokultur anschließend immer nur so lange trypsiniert, bis sich die Fibroblasten von der Kulturflasche lösten. Die zumeist stärker adhärierenden Tumorzellen verblieben somit in der Kulturflasche, während die Tumor-assoziierten Fibroblasten in eine separate Kulturflasche überführt werden konnten.

2.9.7 Isolation muriner Fibroblasten

Zur Isolation muriner Fibroblasten wurden frisch präparierte murine Ohren mit Hilfe eines Skalpells zerkleinert und mit 5 ml PBS, 150 U Collagenase I und 4,8 mg Dispasell in einem 50 ml Falcon 90 min bei 130 rpm und 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einem Cell Strainer (70 µm) gefiltert und in 20% FCS-enthaltendem RPMI-Medium ausgesät.

2.10 Funktionelle Assays

2.10.1 Viabilitäts-Assay

Der "CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability"-Assay wurde unter Verwendung des Reagenz CellTiter-Glo® der Firma Promega nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei werden Zellen unter Inhibition endogener ATPasen lysiert und der ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen anhand einer Luziferasereaktion im Luminometer bestimmt. Der ATP-Gehalt gilt dabei als Maß

für die Zahl lebender Zellen. Der "CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability"-Assay wurde als Proliferations-Assay und als Survival-Assay verwendet. Zur Durchführung des Assays wurden 10^3 Zellen/well in eine 96-well-Platte ausgesät und 4 Tage mit rOSF-2 in 1% FCS-haltigem Medium bzw. in 1% FCS-haltigem Medium ohne rOSF-2 inkubiert. Das Medium wurde alle 24 h gewechselt und die Zellzahl täglich bestimmt.

2.10.2 Wundheilungs-Assay ("Scratch"-Assay)

Der Wundheilungs-Assay dient zur Untersuchung des Migrations- bzw. Invasionsverhaltens von Zellen. Zur Durchführung des Wundheilungs-Assays wurden Einsätze der Firma Ibidi verwendet. Hierbei wurden 7×10^3 Zellen in zwei durch den Einsatz vorbestimmte Gebiete ausgesät, wobei eine definierte zellfreie Spalte erhalten blieb. Nach Adhäsion der Zellen wurde der Einsatz entfernt und die Migration der Zellen über 12 h alle 30 min dokumentiert. Die Auswertung fand mit Hilfe des Programmes TScratch statt.

2.10.3 PI3-Kinase-Inhibitor-Assay

Die PI3-Kinase aktiviert den PI3K/Akt-Signalweg durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen in der Zellmembran, welche als Andockstellen für weitere Proteine, u.a. für Akt dienen. Die Inhibition der PI3-Kinase führt somit zur Inhibition des Akt-Signalwegs und damit zur Inhibition von Migration und Proliferation. Zur Durchführung des Assays wurde eine definierte Zellzahl in eine 96-well-Platte ausgesät und 6 Tage mit rekombinantem OSF-2 (100 ng/ml) bzw. mit rekombinantem OSF-2 und PI3-Kinase-Inhibitor (10 nM) inkubiert. Die Zellzahl an Tag 1 und 6 wurde mit Hilfe des "CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability"-Assay ermittelt (s. Kapitel 2.10.1).

2.10.4 Zellüberleben bei Serumentzug

Um das Überleben der Zellen bei Serumentzug zu untersuchen, wurden 500 bzw. 1000 Zellen/96-well ausgesät und ü.N. inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit PBS gewaschen und fortan in serumfreiem Medium inkubiert. Kontrollzellen wurden weiterhin in 10% FCS-haltigem Medium inkubiert. Am 1., 3., 6. und 9. Tag wurde die Zellzahl unter Verwendung des "CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability"-Assays der Firma Promega gemäß Herstellerangaben bestimmt.

2.10.5 Tumorsphären-Formations-Assay

Zur Bildung von Tumorsphären, also frei in Zellkulturflüssigkeit schwimmenden, multizellulären, kugelförmigen Zellgebilden, in denen Tumorstammzellen experimentell angereichert werden

können, wurden 2×10^4 Zellen/ml Kulturmedium in unbehandelte Bakterienchalen gesät und 7-10 Tage kultiviert.

2.10.6 Inverser Adhäsionsassay

Trypsin ist eine Endoprotease, die zusammen mit dem Chelatbildner EDTA Zellen von ihrem Kultursubstrat ablöst. Zellen benötigen in Abhängigkeit von der Adhäsion an das Kultursubstrat unterschiedlich lange um sich von diesem zu lösen. Um diesen "detachment"-Prozess zu untersuchen, wurden stabil pF143-OSF-2-GFP, pF143-OSF-2- Δ Sek-GFP und pF143 exprimierende A431-Zellen trypsiniert und die Zellzahl nach 2, 4, 6 und 8 min bestimmt. Um die Zählung zu kontrollieren wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten nicht nur die Zellzahl im Überstand, sondern auch die Zahl der noch anhaftenden Zellen untersucht.

2.11 Xenograft-Versuche

Das Xenograft-Modell ist ein Maus-Transplantationsmodell welches häufig in der Onkologie Verwendung findet (Rygaard & Povlsen 1969). Hierbei werden immundefiziente Nacktmäuse verwendet, die normal entwickelte B-Lymphozyten besitzen, jedoch aufgrund des fehlenden Thymus nicht in der Lage sind funktionelle T-Lymphozyten auszubilden (Pantelouris & Hair 1970); (Rygaard & Povlsen 1969). Xenograft-Mäusen (NMRI-nu/nu) (Charles River, Sulzfeld) wurden subkutan unterschiedliche Mengen humaner Tumorzellen in 100 μ l PBS in die Flanken injiziert, so dass das Tumorstadium *in vivo* beobachtet werden konnte. Obwohl der Zellspender nicht artgleich ist, kommt es bei diesen Mäusen aufgrund des fehlenden Thymus zu keinerlei Abstoßungsreaktionen. Hatte der Tumor eine bestimmte Größe erreicht ($2-3 \text{ cm}^3$), so wurden die Mäuse mit Forene (Isofluran) betäubt, durch Genickbruch geopfert, der Tumor präpariert und sofort in flüssigen Stickstoff und/oder Formalin überführt. Wurde der Tumor nach der Präparation in PBS überführt, so konnten hieraus Primärzellen isoliert werden (s. Kapitel 2.9.5).

3 Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente dargestellt. Zu Beginn dieser Arbeit lag ein aus humanem Tumormaterial kloniertes Volllängeplasmid von OSF-2 sowie Microarray-Ergebnisse vor, die eine Überexpression von OSF-2 in humanem Tumor- und Metastasengewebe von Kopf-Hals-Tumoren zeigten. Bei OSF-2 handelt es sich um ein Protein, welches in vielen Krebsentitäten überexprimiert wird, bislang jedoch wenig charakterisiert bzw. hinsichtlich seiner Funktion kontrovers diskutiert wurde. Ziel dieser Arbeit war somit eine molekularbiologische und funktionelle Analyse der biologischen Rolle von OSF-2 in Kopf-Hals-Tumoren. Schwerpunkt der Arbeit waren zum Einen funktionelle Assays um die Auswirkungen der OSF-2-Expression in Kopf-Hals-Tumoren besser zu verstehen. Zum Anderen sollten primäre Tumorzellen und Tumor-assoziierte Fibroblasten aus humanen Kopf-Hals-Tumoren isoliert und näher charakterisiert werden. Da es sich bei OSF-2 um ein sekretorisches Protein handelt, sollte mit Hilfe dieser Untersuchungen die Quelle der Proteinexpression innerhalb des Tumors identifiziert werden.

3.1 Untersuchungen zur Expression von OSF-2

3.1.1 OSF-2-Expression in Tumor- versus Normalgewebe

Vergleichende Analysen der OSF-2-Proteinexpression in humanem Kopf-Hals-Tumorgewebe und entsprechendem Normalgewebe zeigten, dass die Expression in Tumorgewebe bei einem Großteil der untersuchten Proben deutlich erhöht ist (s. Abbildung 3.1). Bei einem Patienten konnte auch im Normalgewebe eine starke OSF-2-Expression nachgewiesen werden, in einem anderen Fall war nur eine sehr schwache OSF-2-Expression im Tumorgewebe und keine Expression in Normalgewebe detektierbar. Das SDS-Gel und der Western-Blot wurden unter Verwendung des anti-OSF-2-Antikörpers, wie in Kapitel 2.6.6 und 2.6.8 beschrieben, durchgeführt.

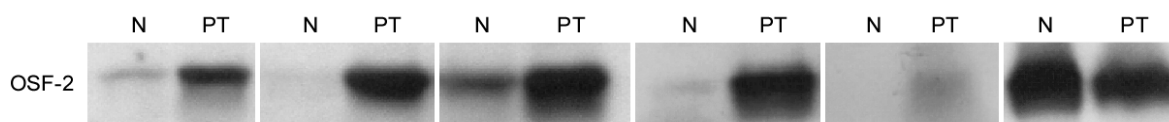


Abbildung 3.1: OSF-2-Expression in Tumor- und Normalgewebe des jeweils selben Patienten (n = 6). Mittels Western-Blot-Analyse ist bei vier von sechs Patienten im Tumorgewebe (PT) eine deutlich stärkere OSF-2-Expression nachweisbar als im jeweiligen Normalgewebe (N). Ein Patient zeigte im Normalgewebe ebenfalls eine sehr starke Expression, während OSF-2 in einer anderen Probe nur sehr schwach im Tumorgewebe und nicht im Normalgewebe detektiert werden konnte.

3.1.2 Immunhistochemie PEK OSF-2

Die immunhistochemischen Analysen von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Schnitten wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. K. Engels (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Frankfurt a. M.) durchgeführt. Repräsentative Gewebeschnitte sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

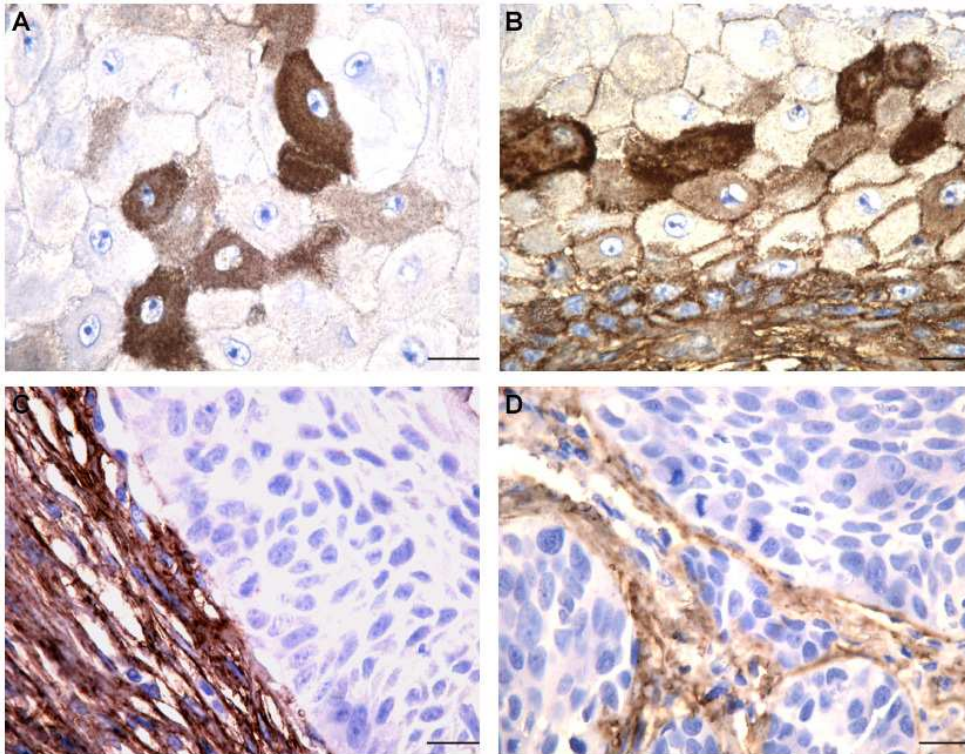


Abbildung 3.2: OSF-2-Expression und -Lokalisation in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom--Schnitten. OSF-2 konnte in der immunhistochemischen Analyse bei einigen Proben in Tumorzellen (A, B), bei Anderen (C, D) im Tumorstroma nachgewiesen werden. Maßstabsbalken, 20 µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die immunhistochemischen Analysen ergaben ein sehr heterogenes Bild der OSF-2-Expression mit teilweise sehr unterschiedlichen OSF-2-Proteinmengen innerhalb der jeweiligen Zelltypen (s. Abbildung 3.2 A). Einige Proben zeigten nur eine OSF-2-Expression im Tumorstroma, und keine Expression in Tumorzellen (s. Abbildung 3.2 C, 3.2 D). In anderen Proben konnte OSF-2 jedoch auch in Tumorzellen nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.2 A, 3.2 B). Die OSF-2-Proteinmenge in den Tumorzellen lag somit zwischen nicht-exprimiert und sehr stark exprimiert. Desweiteren konnte sehr deutlich gezeigt werden, dass OSF-2 als sekretorisches Protein verstärkt im Interzellullarraum vorliegt (s. Abbildung 3.2 B).

Ein Teil der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit Tumorzelllinien durchgeführt. Zelllinien sind ein wichtiges Hilfsmittel um zelluläre Prozesse auf molekularer Ebene aufklären zu können. Da die endogene OSF-2-Expression von Tumorzelllinien in der Literatur äußerst

kontrovers diskutiert wird (Ismail et al. 2000; Yoshioka et al. 2002; Gonzalez et al. 2003; Kim et al. 2005; Tai et al. 2005; Tilman et al. 2007; Puppini et al. 2008), wurde diese in der vorliegenden Arbeit für humane Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten analysiert.

3.1.3 OSF-2-Expression in Zelllinien

Die Expression von OSF-2 in humanen Zelllinien wurde mit Hilfe von Real Time-PCR-Experimenten auf mRNA-Ebene untersucht. Hierzu wurden die in Tabelle 3.1 aufgeführten humanen Zelllinien verwendet:

Tabelle 3.1: Verwendete humane Zelllinien zur Untersuchung der endogenen OSF-2-Expression

Zelllinie	Ursprung
CRL-1624	Plattenepithelkarzinom/Zunge
Carey24	Plattenepithelkarzinom/Larynx
Fadu	Plattenepithelkarzinom/Pharynx
H357	Plattenepithelkarzinom/Zunge
Detroit 562	Plattenepithelkarzinom/Pharynx
CCL-30	Plattenepithelkarzinom/Nasenscheidewand
MG63	Osteoblasten
SaOs	Osteoblasten
hOB18	primäre Osteoblasten
hOB19	primäre Osteoblasten
Ht29	kolorektales Adenokarzinom/Darm
Caco-2	kolorektales Adenokarzinom/Darm
H441	Adenokarzinom/Lunge
Pancl	Pankreaskarzinom/Bauchspeicheldrüse
SU8686	Pankreaskarzinom/Bauchspeicheldrüse
ISO-HAS	Hämangiosarkom
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen
A431	Epidermoidkarzinom
293T	epitheliale Nierenzellen

Nach RNA-Isolation (s. Kapitel 2.5.17) und cDNA-Synthese (s. Kapitel 2.5.19) wurde eine RT-PCR wie in Kapitel 2.5.21 beschrieben durchgeführt. Es wurden 2 µl cDNA pro Ansatz eingesetzt, und je 3 Ansätze pro Zelllinie gemessen. Da mit steigender Expression der C_T-Wert sinkt, wurden zur Darstellung der relativen OSF-2-Expression (bezogen auf das RNA-Polymerase II-Expressionslevel) Negativ-Werte gewählt (s. Abbildung 3.3). Zelllinien ohne nachzuweisende OSF-2-Expression (C_T-Wert > 36), wurden in der Darstellung aus Vollständigkeitsgründen mit aufgeführt.

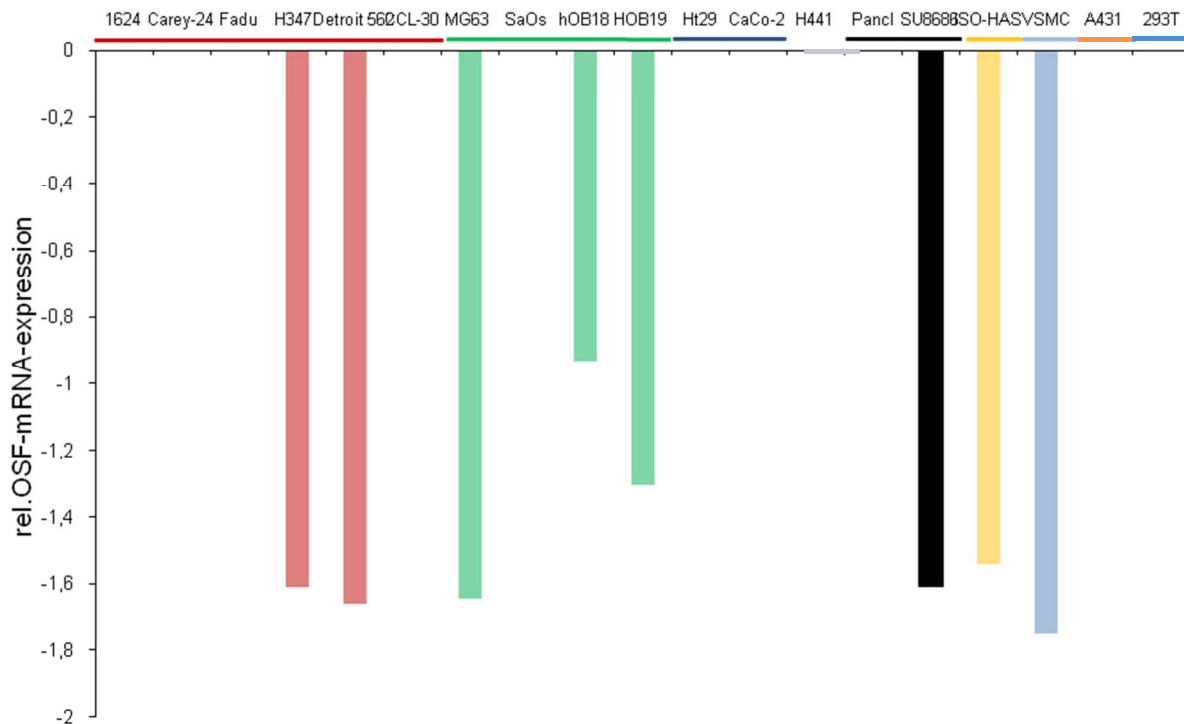


Abbildung 3.3: Endogene OSF-2-Expression in verschiedenen Zelllinien. Dargestellt ist die in der Real Time-PCR ermittelte relative OSF-2-mRNA-Expression bezogen auf die mRNA-Expression der RNA-Polymerase II in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Zelllinien (rot), Osteoblasten (grün), Bauchspeicheldrüsenkarzinom-Zelllinien (schwarz), Hämangiosarkomzellen (gelb) und vaskulären glatten Muskelzellen (blau). Weitere Erläuterungen siehe Text.

Wie aus Abbildung 3.3 hervorgeht, ist die relative OSF-2-mRNA-Expression stark abhängig von der jeweiligen Zelllinie. Während primäre Osteoblasten das höchste Expressionslevel zeigen, gibt es innerhalb der gleichen Tumorentität Zelllinien, die OSF-2 exprimieren sowie OSF-2-negative Zelllinien. Zu den OSF-2-exprimierenden Zelllinien gehören Detroit 562 (humanes Plattenepithelkarzinom/Pharynx), ISO-HAS (humanes Hämangiosarkom) sowie SU8686 (humanes Pankreaskarzinom/Bauchspeicheldrüse). Auch einige nicht-maligne Zelllinien wie VSMC (humane vaskuläre glatte Muskelzellen) und MG63 (humane Osteoblasten) zeigten eine deutliche OSF-2-Expression.

3.1.4 Validierung der Real Time-Ergebnisse

Die Ergebnisse der Real Time-PCR wurden auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenzfärbungen, immunhistochemischen Färbungen und/oder Western-Blot validiert, wie im Folgenden am Beispiel von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) und Osteoblasten exemplarisch gezeigt. Die Färbungen wurden unter Verwendung des anti-OSF-2-Antikörpers wie in Kapitel 2.7.1 und 2.8. beschrieben durchgeführt.

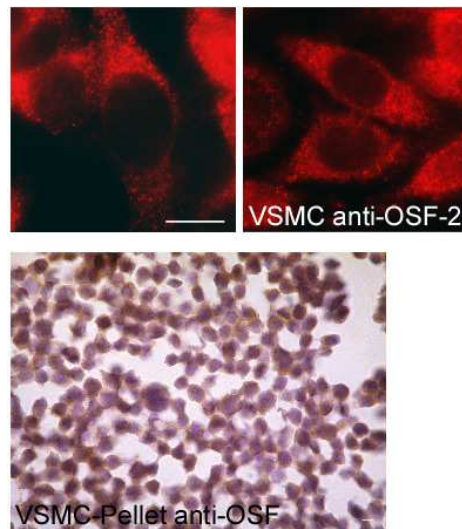


Abbildung 3.4: Expression und Lokalisation von OSF-2 in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). Maßstabsbalken, 10 μ m. Weitere Erläuterungen siehe Text.

In glatten Gefäßmuskelzellen konnte sowohl in der Immunfluoreszenzfärbung als auch in der immunhistochemischen Färbung des Zellpellets eine granulär-zytoplasmatische OSF-2-Expression gezeigt werden (s. Abbildung 3.4). Die Western-Blot-Analyse zeigt die endogene OSF-2-Expression primärer Osteoblasten (hOB18, hOB19) und einer Osteoblastenzelllinie (MG63) und konnte die Ergebnisse der Real Time-PCR bestätigen (s. Abbildung 3.3 und 3.5).

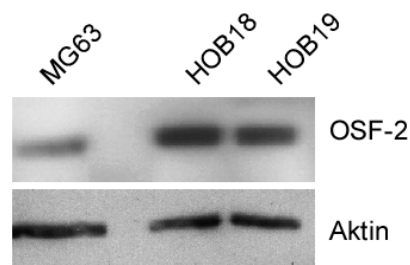


Abbildung 3.5: Endogene OSF-2-Expression in Osteoblasten. Gezeigt ist die exemplarische Western-Blot-Analyse primärer Osteoblasten (hOB18, hOB19) und einer Osteoblastenzelllinie (MG63), die die Ergebnisse der Real Time-PCR bestätigt.

3.1.5 OSF-2-Expression in Osteoblastenscaffolds

Zur Untersuchung der OSF-2-Expression in Osteoblastenscaffolds wurden uns freundlicherweise entsprechende Schnitte von Herrn Dr. C. Brochhausen (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Mainz) zur Verfügung gestellt. Scaffolds sind dreidimensionale Gerüste aus biodegradierbaren Materialien, die die Zellanhaftung und das Zellwachstum unterstützen. Hierbei wachsen Zellen in eine hochporöse, dreidimensionale Matrix ein, wobei die Zellproliferation durch

Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren stimuliert werden kann. Somit können einem Organismus lebende Zellen entnommen, *in vitro* expandiert, und zu einem späteren Zeitpunkt in einem dreidimensionalen Konstrukt als bioartifizielles Regenerat in die entsprechende Zielregion des Organismus rückimplantiert werden. Da die Konstrukte autologes Zellmaterial enthalten, werden "Tissue Engineering"-Implantate normalerweise vom Immunsystem als körpereigen erkannt und nicht abgestoßen. Die immunhistochemische Färbung der Osteoblastenscaffolds wurde unter Verwendung des anti-OSF-2-Antikörpers wie in Kapitel 2.8 beschrieben durchgeführt.

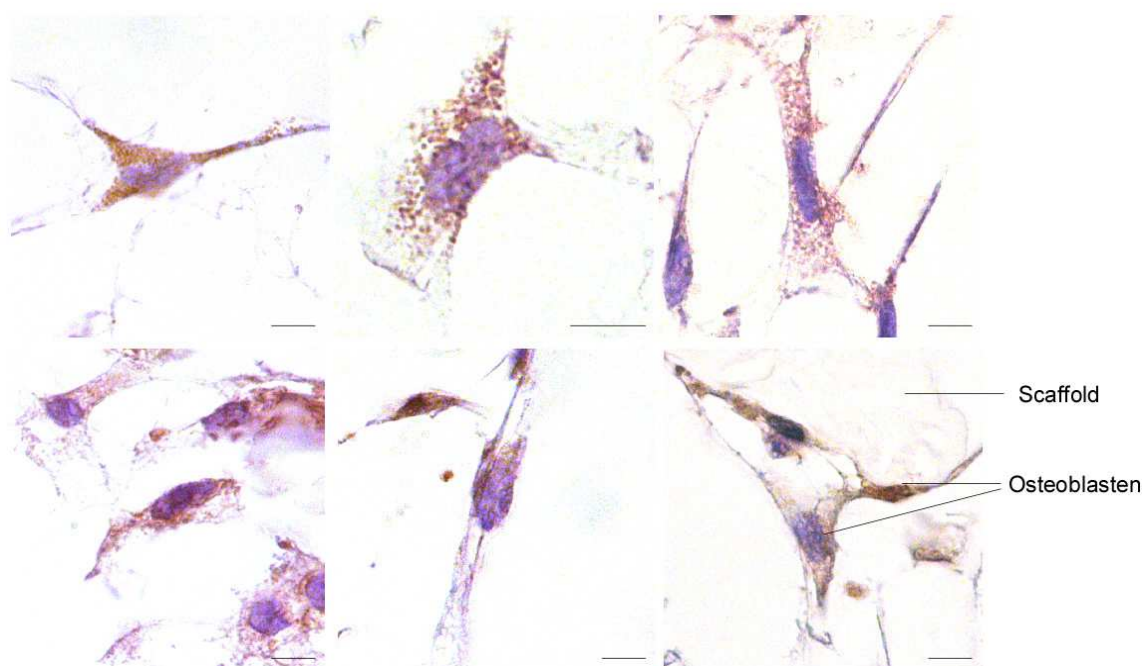


Abbildung 3.6: OSF-2-Expression und -Lokalisation in Osteoblastenscaffolds. Maßstabsbalken, 10 μm . Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die immunhistochemische Färbung von Osteoblasten in Polyurethan-Scaffolds zeigte eine deutliche OSF-2-Expression der Osteoblasten. Die Lokalisation des Proteins war hierbei zyttoplasmatisch und teilweise stark granulär (s. Abbildung 3.6).

3.1.6 OSF-2-Expression in der embryonalen Wachstumsfuge

Wie von Gillan und Kollegen gezeigt werden konnte, wird OSF-2 in verschiedenen Organen exprimiert, wobei eine Tendenz zu verstärkter Expression in fötalem Gewebe vorliegt (Gillan et al. 2002). Da OSF-2 zudem in (Prä-)Osteoblasten exprimiert wird (Litvin et al. 2004), wurde eine immunhistochemische Färbung (s. Kapitel 2.8) einer humanen embryonalen Wachstumsfuge durchgeführt (s. Abbildung 3.8). Die Wachstumsfuge stellt ein zonal strukturiertes Gewebe mit Chondrozyten in unterschiedlichen Proliferations- und Differenzierungsstadien in einem, ebenfalls zonal gegliederten, Extrazellulärmatrix-Scaffold dar (s. Abbildung 3.7). Die epiphysennahe

Reservezone aus monomorphen kleinen Zellen bildet hierbei den Zellpool für die folgenden Schichten. Treten diese Zellen in den Zellzyklus ein, so ordnen sie sich zu parallel angeordneten Säulen aus 10-20 Zellen an (Proliferationszone). Verlieren die Zellen ihre proliferative Kapazität, treten sie in die hypertrophe Zone ein und erhöhen ihr Volumen. Hypertrophe Chondrozyten leiten die Kalzifizierung der Matrix und die Vaskularisation ein. Nach der Einsprossung von Blutgefäßen und Osteoblasten wird die kalzifizierte Matrix durch Chondroklasten und Osteoklasten degradiert. Die verbleibenden Septen werden als Scaffold für die Ablagerung der von Osteoblasten synthetisierten Matrix genutzt. Hypertrophe Chondrozyten werden letztendlich resorbiert oder unterliegen der Apoptose (C. Brochhausen 2009).

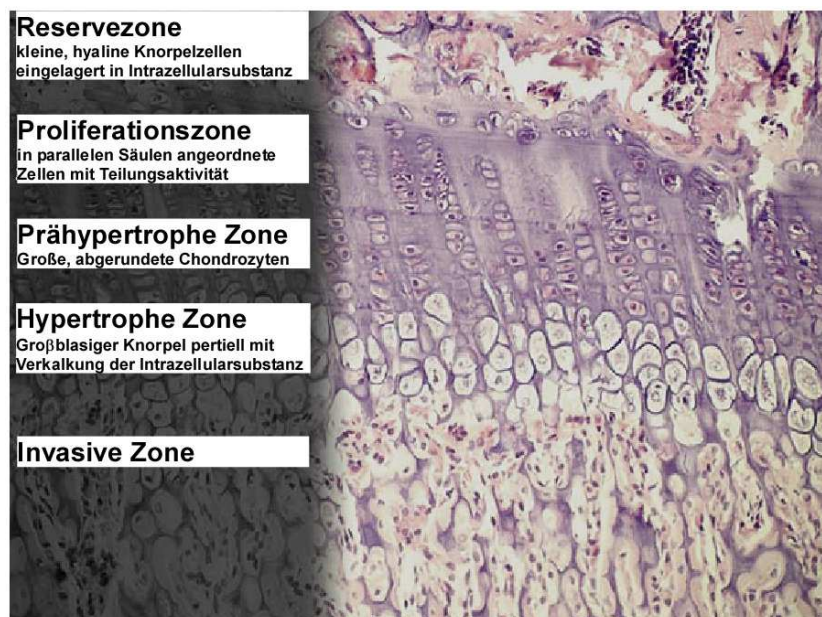


Abbildung 3.7: Aufbau einer embryonalen Wachstumsfuge, verändert nach (C. Brochhausen 2009). Die zonale Gliederung des Gewebes in Reservezone, Proliferationszone, prähypertrophe Zone, hypertrophe Zone und invasive Zone ist deutlich erkennbar. Weitere Erläuterungen s. Text.

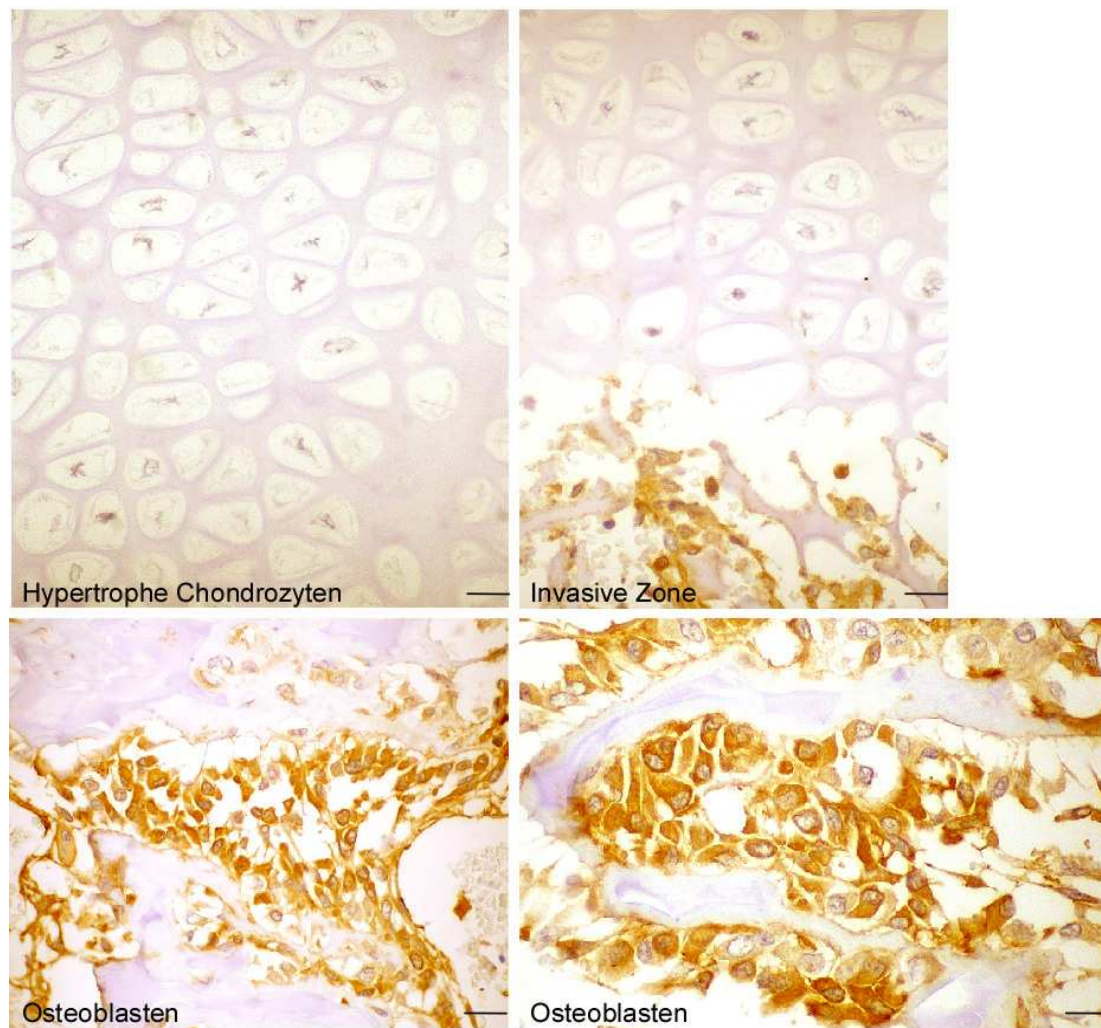


Abbildung 3.8: OSF-2-Expression und -Lokalisation innerhalb der humanen embryonalen Wachstumsfuge. Maßstabsbalken, 20 μm . Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die immunhistochemische Färbung der embryonalen Wachstumsfuge zeigte eine starke OSF-2-Expression in Osteoblasten, jedoch keine Expression in Chondrozyten. Die OSF-2-Lokalisation innerhalb der Osteoblasten war zytoplasmatisch, wobei die Plasmamembran häufig besonders stark gefärbt war (s. Abbildung 3.8).

3.2 Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von OSF-2

3.2.1 OSF-2-GFP-Lokalisation in Zelllinien

Um die Lokalisation von OSF-2-GFP in unterschiedlichen Zelllinien zu analysieren, wurden diese unter Verwendung von LipofectamineTM 2000 mit OSF-2-GFP transfiziert, und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass OSF-2 ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, wobei bei einigen Zelllinien eine granulär-zytoplasmatische Lokalisation beobachtet werden konnte (s. Abbildung 3.9).

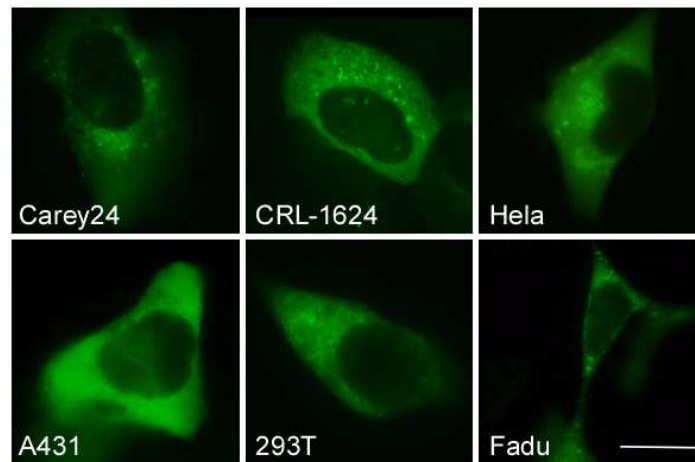


Abbildung 3.9: OSF-2-GFP-Lokalisation in verschiedenen Zelllinien. Maßstabsbalken, 10 μm . Erläuterungen siehe Text.

Die Lokalisation des eingebrachten OSF-2-GFP-Fusionskonstrukts konnte mittels Immunfluoreszenzfärbungen mit einem gegen OSF-2 gerichteten Antikörper ebenfalls spezifisch nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.10).

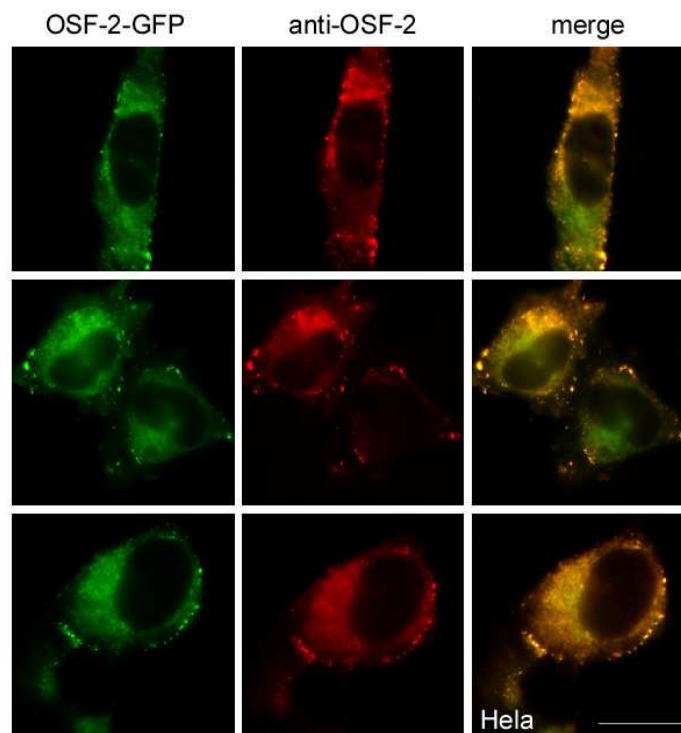


Abbildung 3.10: Nachweis der spezifischen Detektion von OSF-2 in Immunfluoreszenzfärbungen mittels eines gegen OSF-2 gerichteten Antikörpers. Die Transfektion von OSF-2-GFP in Hela-Zellen mit anschließender OSF-2-Immunfluoreszenzfärbung ergab eine zytoplasmatisch-granuläre Färbung, identisch zur Lokalisation von OSF-2-GFP. Maßstabsbalken, 10 μm .

Die OSF-2-Lokalisation nach OSF-2-Transfektion war in Immunfluoreszenzfärbungen ebenfalls zytoplasmatisch-granulär (s. Abbildung 3.11) und somit identisch zur OSF-2-GFP-Lokalisation (s. Abbildung 3.9 und 3.10).

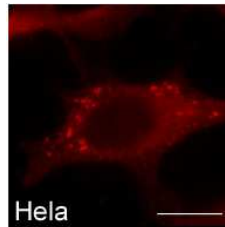


Abbildung 3.11: Nachweis der spezifischen Detektion von OSF-2 in Immunfluoreszenzfärbungen mittels eines gegen OSF-2 gerichteten Antikörpers. Die Transfektion von OSF-2 in HeLa-Zellen mit anschließender OSF-2-Immunfluoreszenzfärbung ergab eine zytoplasmatisch-granuläre Lokalisation, identisch zur Lokalisation von OSF-2-GFP in Abb. 3.10. Maßstabsbalken, 10 µm.

3.2.2 Identifizierung eines N-terminalen Sekretionssignals und Klonierung einer Sekretionsmutante

Intrinsische Eigenschaften eines Proteins können durch verschiedene Computerprogramme (z.B. Coils2, TopPred2 und SignalP) vorhergesagt werden. Diese analysieren mittels spezifischer Algorithmen die Primärstruktur von Proteinen und machen Wahrscheinlichkeitsangaben über das Vorhandensein von Coiled Coils, Transmembranregionen und Signalpeptiden. Um putative Signalsequenzen zu identifizieren, wurde die Aminosäuresequenz von OSF-2 mittels SignalP untersucht.

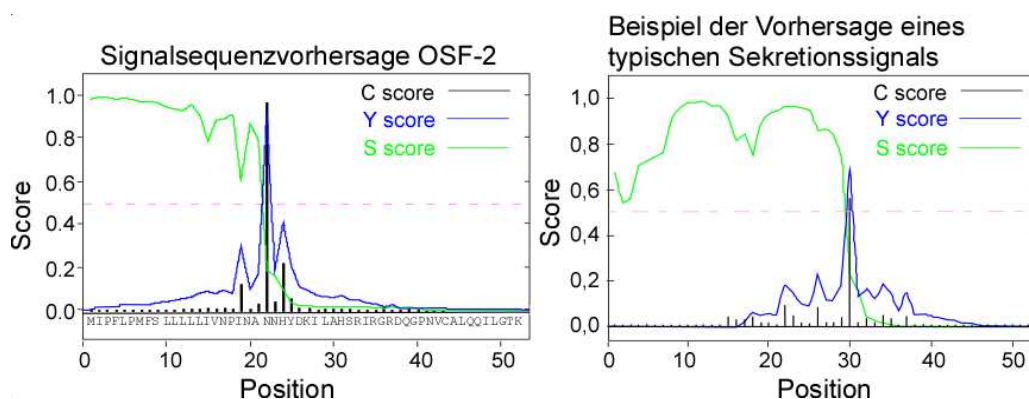


Abbildung 3.12: Bioinformatische Vorhersage eines N-terminalen OSF-2-Sekretionssignals. Unter Verwendung des Programms SignalP kann für OSF-2 ein N-terminales Sekretionssignal (AS1-21) ermittelt werden. Hierbei gibt der S-Score an, ob die Aminosäuren Teil des Sekretionssignals sind, der C-Score zeigt die Schnittstelle des Signalpeptids und der Y-Score setzt sich aus C-Score und S-Score zusammen und verbessert die Vorhersage der Schnittstelle.

Aufgrund der SignalP-Vorhersage (s. Abbildung 3.12) wurde eine OSF-2-GFP-Sekretionsmutante (OSF-2 Δ Sek-GFP) ohne putatives Sekretionssignal (AS1-21) kloniert (s. Abbildung 3.13) und in verschiedene Zelllinien transfiziert. Dies führte zu einer sehr homogenen zytoplasmatischen OSF-2-Lokalisation (s. Abbildung 3.14, A). Im Unterschied zur Transfektion von OSF-2-wt-GFP (s. Abbildung 3.9) konnten nach Transfektion der Sekretionsmutante bei keiner Zelllinie granuläre Strukturen beobachtet werden. Um nachzuweisen, dass das putative N-terminale Sekretionssignal in OSF-2 funktionell aktiv ist, wurde dieses in Fusion mit GFP kloniert und in HeLa-Zellen transfiziert. Das Sekretionssignal vermittelte hier eine zytoplasmatisch-granuläre Lokalisation des fusionierten GFP-Proteins. Im Gegensatz hierzu lokalisiert GFP-wt nach transientscher Transfektion homogen im Zytoplasma und Zellkern (s. Abbildung 3.14, B).

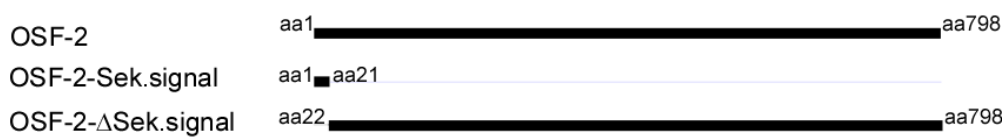


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung von OSF-2-wt, der OSF-2-Sekretionsmutante, sowie des klonierten Sekretionssignals.

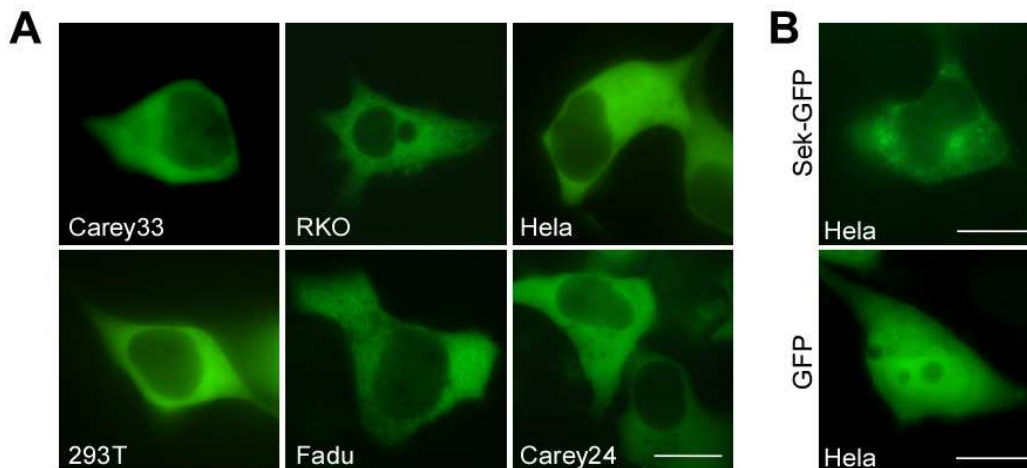


Abbildung 3.14: Untersuchungen zur Lokalisation der OSF-2-Sekretionsmutante sowie des Sekretionssignals Sek-GFP. (A) Die transiente Transfektion von OSF-2 Δ Sek-GFP in verschiedene Zelllinien ergab eine homogen-zytoplasmatische, jedoch keine granuläre Protein-Lokalisation. (B) Das Sekretionssignal von OSF-2 vermittelt hingegen eine zytoplasmatisch-granuläre Lokalisation des fusionierten GFP. Maßstabsbalken, 10 μ m.

Auch am konfokalen Mikroskop konnte die OSF-2-Sekretion nach Transfektion von OSF-2-GFP gezeigt werden. Eine WGA-Rhodamin-Membranfärbung ergab nach Transfektion von OSF-2-GFP eine stärkere OSF-2-GFP-WGA-Rhodamin-Kolokalisation als nach Transfektion der Sekretionsmutante (s. Abbildung 3.15).

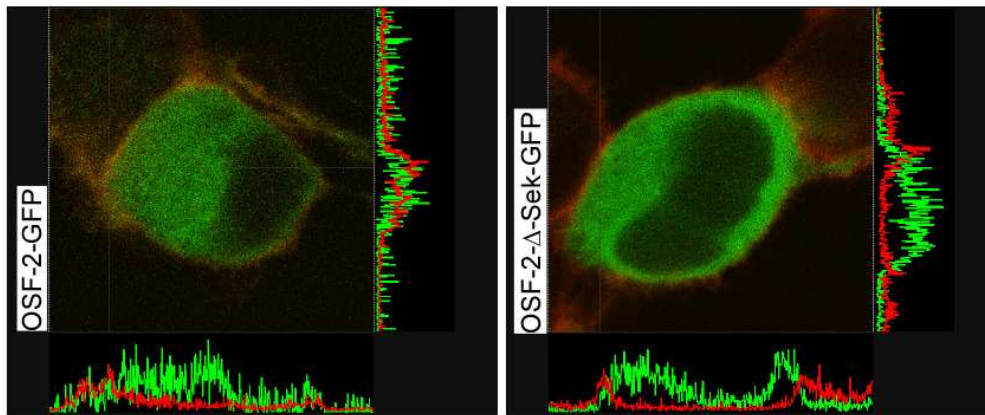


Abbildung 3.15: Untersuchung zur Sekretion von OSF-2-wt-GFP und OSF-2 Δ Sek-GFP. Die Immunfluoreszenzanalyse transfizierter, WGA-Rhodamin-gefärbter Zellen am konfokalen Mikroskop ergab eine verstärkte Kolokalisation von OSF-2-GFP und WGA, die als leichte Gelbfärbung an der Membran erkennbar ist. OSF-2 Δ Sek-GFP-transfizierte Zellen lassen hingegen keine Überlagerung von OSF-2-GFP und WGA an der Membran erkennen.

Um die OSF-2-Sekretion auch proteinbiochemisch nachzuweisen, wurden 293T-Zellen transient mit OSF-2-wt-GFP und OSF-2 Δ Sek-GFP transfiziert, nach 48h lysiert und wie in Kapitel 2.6.6 beschrieben auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Zusätzlich wurde serumfreies Medium, in dem die Zellen 24h nach Transfektion inkubiert wurden, aufgetragen, um zelluläre Sekretionsprodukte detektieren zu können. OSF-2-GFP konnte hierbei nicht nur in den Zelllysaten, sondern auch im Medienüberstand transfizierter Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte die Sekretionsmutante nur im Zelllysat, nicht aber im Medienüberstand detektiert werden (s. Abbildung 3.16).

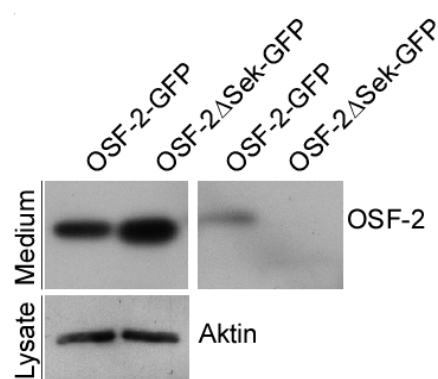


Abbildung 3.16: Proteinbiochemischer Nachweis der OSF-2-Sekretion. Nach Transfektion von OSF-2-wt-GFP und OSF-2 Δ Sek-GFP konnte OSF-2 im Western-Blot nicht nur in den Zelllysaten, sondern auch im Medienüberstand der OSF-2-wt-GFP-transfizierten Zellen detektiert werden. Trotz der erhöhten Proteinmenge im Lysat der OSF-2 Δ Sek-GFP-transfizierten Zellen im Vergleich zu OSF-2-wt-GFP-transfizierten Zellen, war im Medienüberstand dieser Zellen kein sekretiertes OSF-2 nachweisbar.

3.2.3 Klonierung und Lokalisation von Deletionskonstrukten

OSF-2 besitzt eine typische N-terminale Signalsequenz, gefolgt von einer Cystein-reichen Domäne, vier internen Repeat-Domänen und einer C-terminalen Domäne (Takeshita et al. 1993). Da noch unklar ist, über welche Domänen OSF-2-Funktionen vermittelt werden, wurden Deletionskonstrukte mit einer unterschiedlichen Anzahl funktioneller Domänen generiert (s. Abbildung 3.17). Nach Klonierung der Deletionsmutanten (s. Abbildung 3.17) in einen GFP-Vektor, wurden diese unter Verwendung von LipofectamineTM 2000 in Hela-Zellen transfiziert.

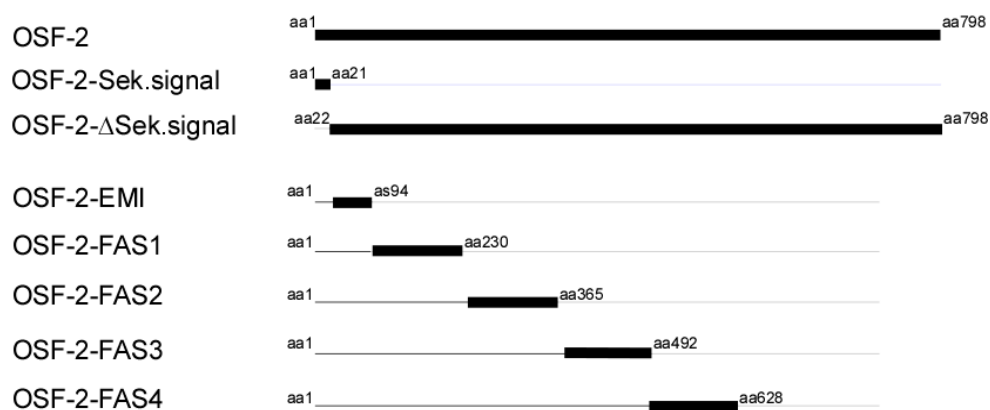


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung der klonierten und transfizierten OSF-2-Deletionskonstrukte. Erläuterungen siehe Text.

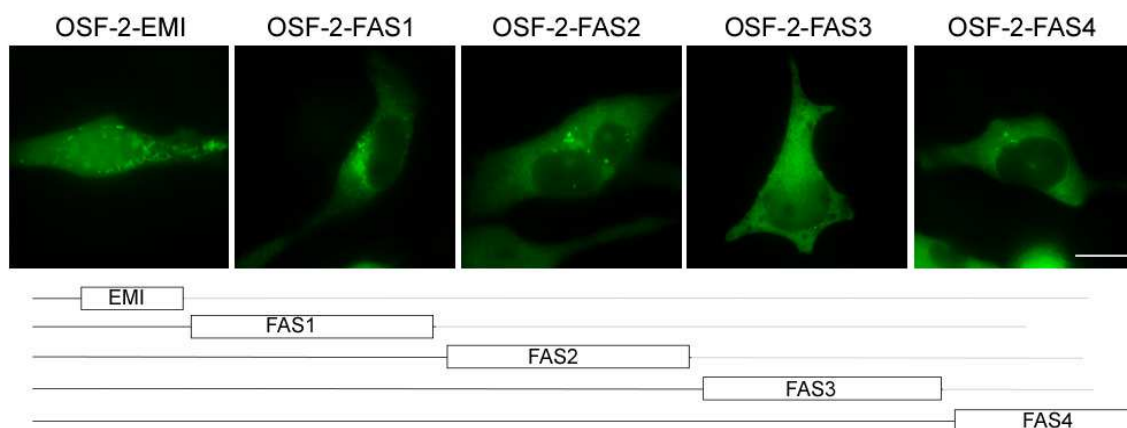


Abbildung 3.18: Untersuchungen zur Lokalisation von OSF-2-Deletionskonstrukten in Hela-Zellen. Maßstabsbalken, 10 µm. Erläuterungen siehe Text.

Nach transienter Transfektion der Deletionskonstrukte in Hela-Zellen konnte für OSF-2-EMI-GFP, OSF-2-FAS1-GFP und OSF-2-FAS2-GFP eine granulär-zytoplasmatische, für OSF-2-EMI-GFP teilweise auch eine nukleäre Proteinlokalisierung nachgewiesen werden. OSF-2-FAS3-GFP und OSF-2-FAS4-GFP zeigten hingegen eine homogenere Verteilung innerhalb der Zelle und wenig Akkumulation granulärer Strukturen. (s. Abbildung 3.18).

3.2.4 Subzelluläre Lokalisation von OSF-2-GFP und OSF-2 Δ Sek-GFP

Die Subzelluläre Lokalisation von OSF-2-GFP- und OSF-2 Δ Sek-GFP-transfizierten Zellen wurde durch Fraktionierung der Zellbestandteile mittels des Qproteome Cell Compartment Kit der Firma Qiagen biochemisch verifiziert (s. Kapitel 2.6.3). Hierbei konnte OSF-2-GFP in der Zytoplasmafraktion, der Membranfraktion und der Zytoskelettfraktion detektiert werden, während die Sekretionsmutante OSF-2 Δ Sek-GFP ausschließlich in der Zytoplasmafraktion sowie der Zytoskelettfraktion zu finden war (s. Abbildung 3.19).

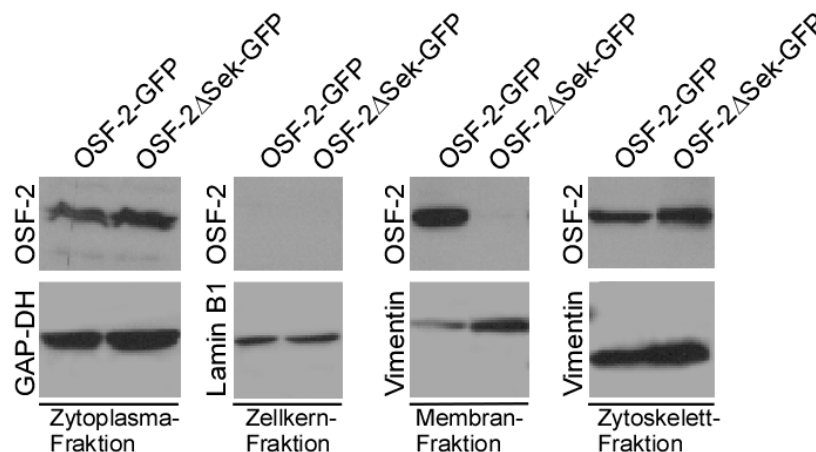


Abbildung 3.19: Subzelluläre OSF-2-Lokalisation OSF-2-GFP und OSF-2 Δ Sek-GFP-exprimierender Zellen. Erläuterungen siehe Text.

3.3 Untersuchungen zur OSF-2-Multimerisierung und der Isoformen von OSF-2

3.3.1 Multimerisierung: Ko-Immunpräzipitation

Die Detektion von OSF-2-Banden multipler Größe im Western-Blot führte zu der Vermutung, dass OSF-2 in der Lage ist Dimere bzw. Multimere zu bilden (Gillan et al. 2002; Baril et al. 2007; Norris et al. 2007). Um eine Multimerisierung biochemisch zu überprüfen, wurde eine Ko-Immunpräzipitation mit OSF-2-GFP- und OSF-2-Stop-kotransfizierten Zellen unter Verwendung von GFP-Beads durchgeführt (s. Abbildung 3.20). Die Immunpräzipitation erfolgte unter Verwendung des anti-GFP- μ MACS Epitope Tag Protein Isolation Kits (s. Kapitel 2.6.5).

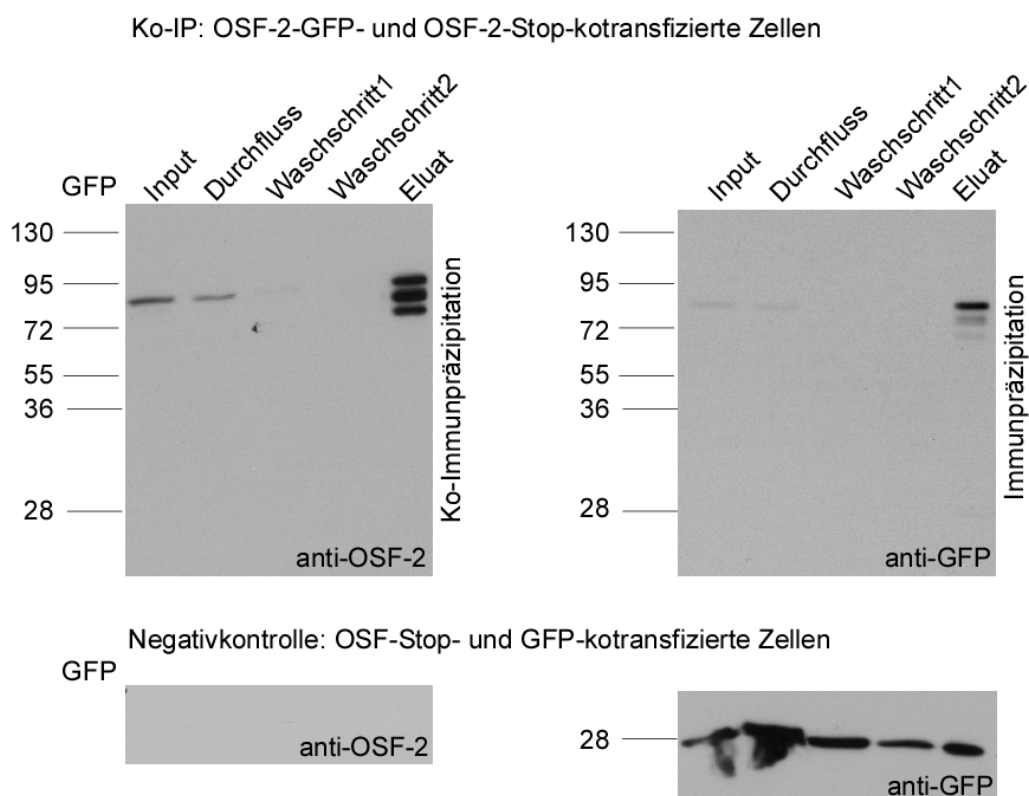


Abbildung 3.20: Immunpräzipitation von OSF-2-Stop- und OSF-2-GFP-transfizierten 293T-Lysaten. Auf dem OSF-2-Blot konnten drei Banden, auf dem GFP-Blot zwei Banden zwischen 72 und 95 kDa detektiert werden. Die Negativkontrolle, bestehend aus OSF-2-Stop- und GFP-kotransfizierten 293T-Zellen, zeigte nur im GFP-Blot eine Eluatbande bei ca. 30 kDa.

Nachdem im Western-Blot die präzipitierten Komplexe im IP-Eluat mittels OSF-2- und GFP-Antikörpern untersucht wurden, konnten auf dem OSF-2 Blot drei Banden, auf dem GFP-Blot zwei Banden zwischen 72 und 95 kDa nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle, bestehend aus OSF-2-Stop- und GFP-kotransfizierten 293T-Zellen, zeigte im GFP-Blot eine Eluatbande bei ca. 30 kDa, wobei keine Bande im OSF-2-Blot detektiert werden konnte (s. Abbildung 3.20).

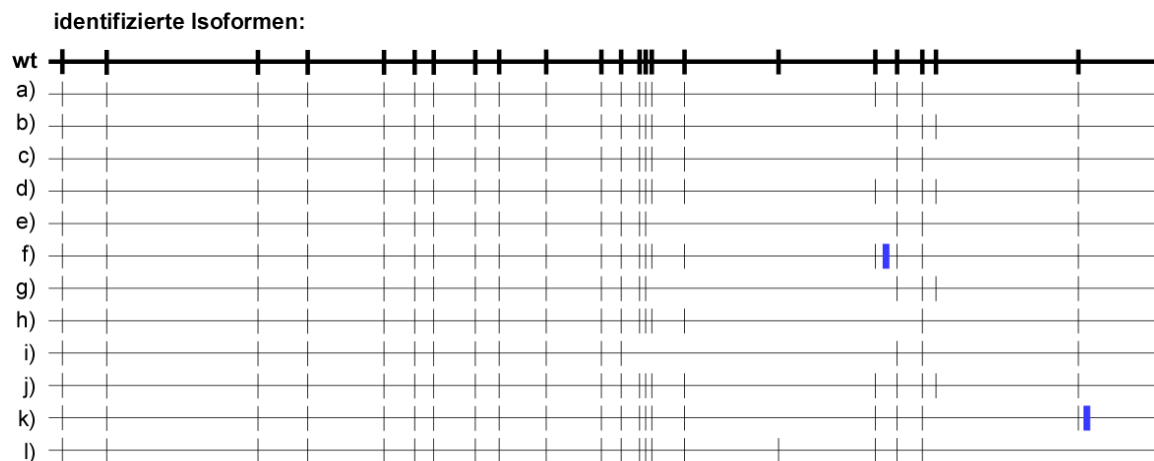
3.3.2 Untersuchung der OSF-2-Isoform-Expression

Beim Screenen humaner Plazenta- und Osteosarkoma-cDNA-Bibliotheken konnten 5 humane OSF-2-Isoformen identifiziert werden (Takeshita et al. 1993). Da sich die Isoformen nur in ihrem C-Terminus durch verschiedene "in-frame"-Insertionen und Deletionen unterschieden, wurde vermutet, dass die Isoformen durch alternatives Spleißen entstanden waren (Takeshita et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde die gewebespezifische Expression unterschiedlicher OSF-2 Isoformen untersucht, indem RNA aus Tumor-, Metastasen- und Normalgewebe des jeweils selben Patienten isoliert und der C-terminale OSF-2-Bereich (s. Abbildung 3.21) amplifiziert und sequenziert wurde. Hierbei konnten 9 Isoformen identifiziert werden, wobei die

als Wildtyp publizierte Isoform Q15063-1 (UniProtKB/Swiss-Prot) (Takeshita et al. 1993) nicht nachgewiesen werden konnte. (s. Abbildung 3.22, A).



Abbildung 3.21: Schematische Darstellung des C-terminalen OSF-2-Bereiches (aa 569-789), der zur Bestimmung der jeweiligen Isoformen amplifiziert und sequenziert wurde.



A		B	
Patient1	Isoformen	Zelllinien	Isoformen
PT	a, b(3), c(2)	CRL1624	d, l
M	a(3), c	Carey24	b, d
N	a, c(5)	Fadu	d
Patient2		MG63	a, b, c, k
PT	d, c(3)	HOB18	b, d
M	b, d(2)	SU8686	c, d
N	b, c(2), e, f	Pancl	b
Patient3		VSMC	d
PT	a(2), c(3), d		
M	a(2), c(3), g		
N	a, d, h, i		

Abbildung 3.22: Vergleichende Untersuchung der OSF-2-Isoform-Expression in (A) humanem Tumor-, Metastasen- und Normalgewebe des gleichen Patienten sowie (B) unterschiedlichen Zelllinien. Die als Wildtyp-publizierte Isoform Q15063-1 (UniProtKB/Swiss-Prot)(Takeshita et al. 1993) ist als Vergleichssequenz (wt) dargestellt. In den identifizierten Isoformen zusätzlich vorkommende Exons sind blau markiert. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Bei der Untersuchung der OSF-2-Isoform-Expression unterschiedlicher Zelllinien konnten 6 OSF-2-Isoformen identifiziert werden. Auch hier konnte die Wildtypsequenz nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.22, B).

3.4 Funktionelle Charakterisierung von OSF-2

Tumorzellen erlangen durch schrittweise genetische Veränderungen charakteristische physiologische Eigenschaften (s. Kapitel 1.1). Verschiedene Analysen wie z.B. die Untersuchung der Zell-Proliferation und -Migration, sowie des Zellüberlebens in An- und Abwesenheit eines spezifischen Proteins, ermöglichen eine funktionelle Protein-Charakterisierung und zeigen, ob dieses die physiologischen Eigenschaften der Zellen beeinflusst. Funktionelle Analysen zur Charakterisierung von OSF-2 wurden mit verschiedenen Zelllinien durchgeführt, wobei im Folgenden exemplarische Ergebnisse für die durchgeführten Assays gezeigt werden.

3.4.1 Proliferationsassay

Maligne Tumore entstehen durch klonale Expansion einer zur autonomen Proliferation befähigten Zelle (Hengst 2010). Um zu überprüfen ob OSF-2 das Zellwachstum zu beeinflussen vermag, wurden Proliferationsassays mit verschiedenen Tumorzelllinien (Fadu, MCF7, A431, CRL-1624) in mindestens drei unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Im Folgenden wird dies exemplarisch am Beispiel der Fadu-Zellen gezeigt. Mit Hilfe des Proliferationsassays ist es möglich, die Wachstumsrate einer Zellpopulation durch Messung des ATP-Gehalts metabolisch aktiver Zellen anhand einer Luziferasereaktion zu bestimmen (s. Kapitel 2.10.1). Da der Effekt von OSF-2 durch serumhaltiges Medium überdeckt wird, wurden Proliferationsassays mit 1% FCS-haltigem Medium durchgeführt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass eine Inkubation mit rekombinantem OSF-2 in einer Konzentration von 100 ng/ml keinen Einfluss auf die Wachstumsrate von Fadu-Zellen hat (s. Abbildung 3.23).

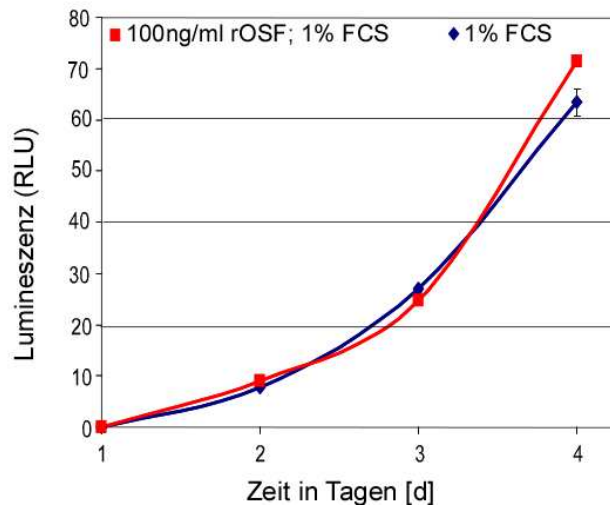


Abbildung 3.23: Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit von Fadu-Zellen in An- und Abwesenheit rekombinanten-OSF-2-Proteins. Gezeigt wird ein representatives Experiment aus mind. drei unabhängigen Wiederholungen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.4.2 Wundheilungs-Assay (“Scratch“-Assay)

Eines der wesentlichen Kennzeichen von malignen Zellen ist ihre Fähigkeit, in umgebendes Normalgewebe einzudringen (Invasion) und Metastasen über die Blut- und Lymphbahn, aber auch durch lokale Ausbreitung zu bilden (Brodland & Zitelli 1992; Hanahan & Weinberg 2000). Eine Voraussetzung für die Metastasierung eines Tumors besteht in der Fähigkeit der Tumorzellen zur Migration und Invasion. Um einen möglichen Einfluss von OSF-2 auf das Migrationsverhalten von Fadu-Zellen in rOSF-2-haltigem Medium (100 ng/ml) zu beobachten, wurden Wundheilungsassays mit Kopf-Hals-Tumorzelllinien (Fadu, HNCCUM-02T) in mindestens drei unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Im Folgenden wird dies exemplarisch am Beispiel der Fadu-Zellen gezeigt. Da der Effekt von rOSF-2 durch serumhaltiges Medium überdeckt wird, wurde der Assay wie in Kapitel 2.10.2 beschrieben, jedoch in serumfreiem Medium, durchgeführt. Hierbei wurde die Migration von Zellen in 10% FCS-haltigem Medium, in serumfreiem Medium und von Zellen in serumfreiem Medium mit 100 ng rOSF-2/ml verglichen.

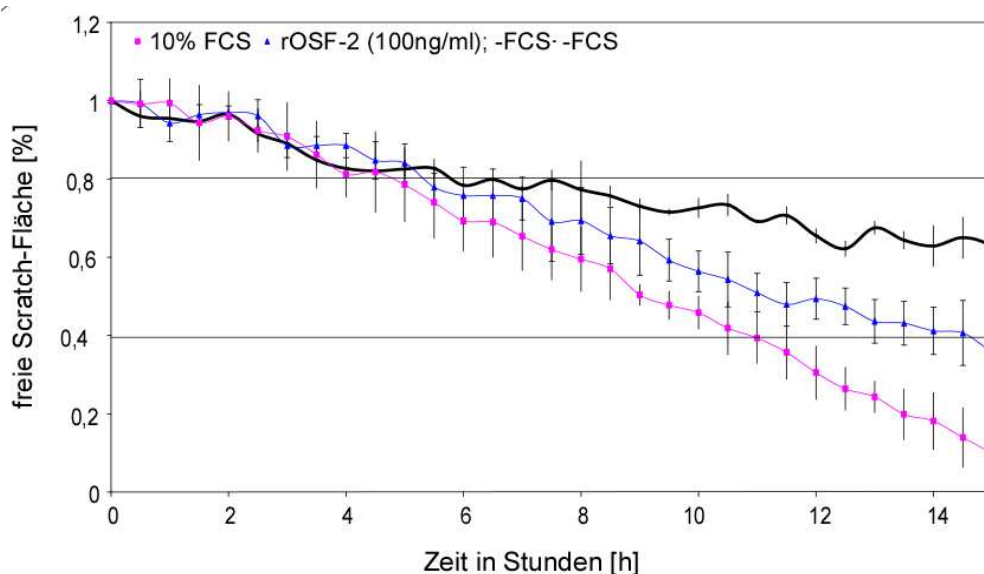


Abbildung 3.24: Untersuchung des Migrationsverhaltens von Fadu-Zellen in rOSF-2-haltigem Medium (100 ng/ml). Gezeigt wird ein representatives Experiment aus mind. drei unabhängigen Wiederholungen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Bei der Durchführung des Wundheilungs-Assays konnte beobachtet werden, dass die durch einen Scratch erzeugte freie Fläche am Schnellsten auf der Kulturfläche geschlossen wurde, auf der Fadu-Zellen in 10% FCS-haltigem Medium kultiviert wurden. Die Migrationsgeschwindigkeit war am Langsamsten, wenn Zellen in FCS-freiem Medium kultiviert wurden. Durch Zugabe von 100 ng rOSF-2/ml serumfreies Medium konnte das Migrationsverhalten der Fadu-Zellen deutlich beschleunigt werden (s. Abbildung 3.24).

3.4.3 Zellüberlebens-Assay

Sobald ein Tumor eine bestimmte Größe erreicht hat muss das Gefäßsystem erweitert werden, um eine ausreichende Versorgung des Tumors zu gewährleisten (Bouck et al. 1996; Hanahan & Folkman 2000; Hanahan & Weinberg 2000). Da das Gefäßsystem innerhalb des Tumors jedoch in hohem Maß desorganisiert ist, kommt es dennoch häufig zu hypoxischen Regionen die nicht ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden können (Helmlinger et al. 1997) (s. Kapitel 1.4.6). Um das Überleben der Zellen unter Stressbedingungen zu testen, wurden Zellen in serumfreiem Medium bzw. in rOSF-2-enthaltendem serumfreiem Medium kultiviert, und die Zellzahl in regelmäßigen Abständen bestimmt (s. Kapitel 2.10.1). Wie aus Abbildung 3.25 hervorgeht, erhöhte die Inkubation mit 100 ng/ml rOSF-2-enthaltendem Medium bei Serumentzug das Überleben der Fadu-Zellen deutlich.

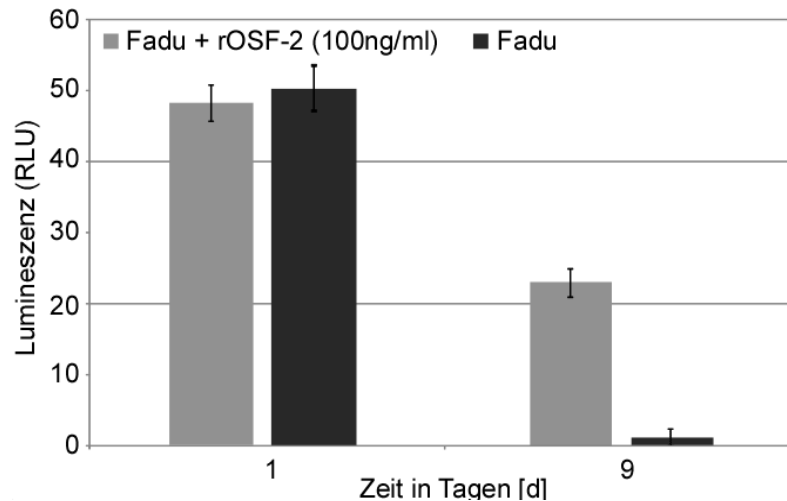


Abbildung 3.25: Untersuchung des Einflusses von rOSF-2 (100 ng/ml) auf das Überleben von Fadu-Zellen. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment aus mind. drei unabhängigen Wiederholungen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.4.4 Inverser Adhäsionsassay

Einer der ersten Schritte in der Metastasierung ist die Ablösung von Tumorzellen vom Zellverband (Weiss & Ward 1983; Kharraishvili et al. 2011), die u.a. abhängig von der Adhäsion der jeweiligen Zellen ist. In Kultur gehaltene Zellen können (in Anwesenheit des Chelatbildners EDTA) durch die Endoprotease Trypsin von ihrem Substrat abgelöst werden. Hierbei wird die Zelladhäsion durch Spaltung von Oberflächenproteinen aufgehoben. Gleichzeitig bindet EDTA zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} , welche von vielen Adhäsionsproteinen benötigt werden. In Abhängigkeit von der Adhäsion an das Kultursubstrat benötigen Zellen unterschiedlich viel Zeit um sich von diesem zu lösen. Um den Einfluß von OSF-2 im Ablösungs-Prozess zu untersuchen, wurde ein inverser Adhäsionsassay mit stabil OSF-2 bzw. dessen sekretionsdefiziente Mutante exprimierenden A431-Zellen durchgeführt (s. Kapitel 2.10.6)(s. Abbildung 3.26).

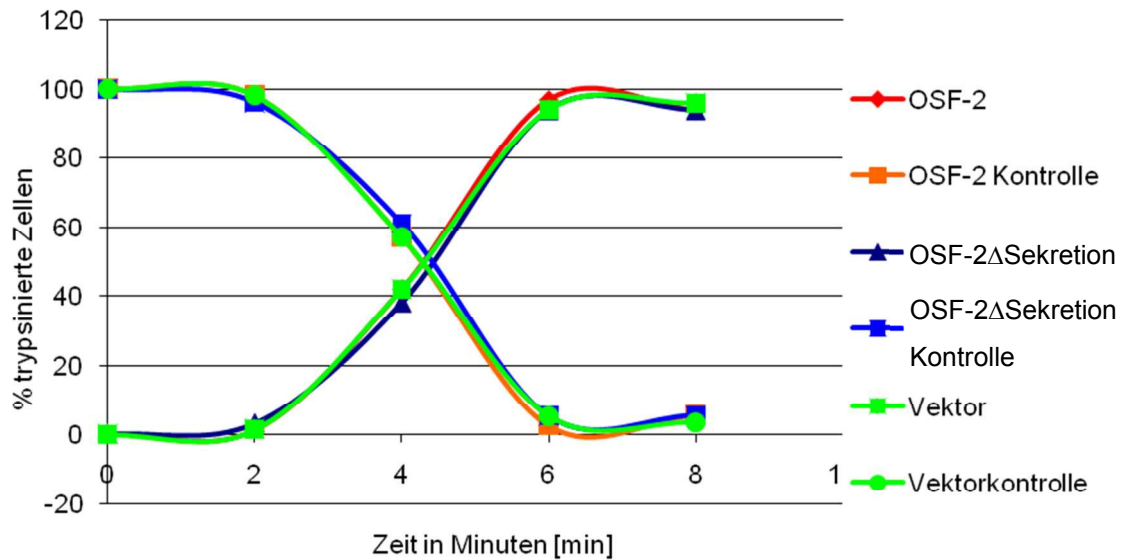


Abbildung 3.26: Untersuchung des Einflusses von OSF-2 bzw. OSF-2ΔSek auf die Ablösungsgeschwindigkeit von Zellen vom Substrat. Die Zeit, die die Zellen benötigen, um sich vom Substrat zu lösen, ist für alle Zellen identisch. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Versuche zeigten, dass weder die Wildtyp-Form von OSF-2 noch dessen sekretionsdefiziente Mutante einen Einfluß auf die Ablösungsgeschwindigkeit der Zellen vom Substrat hat. Die Geschwindigkeit ist in beiden Fällen identisch zu der Geschwindigkeit der Vektor-transfizierten Kontrollzellen. Da die Zahl der noch anhaftenden Zellen ebenfalls bestimmt wurde (s. Abbildung 3.26, „OSF-2 Kontrolle/ OSF-2-ΔSekretion Kontrolle/ Vektorkontrolle“), kann die Ungenauigkeit der Zählung als Fehlerquelle ausgeschlossen werden.

3.4.5 PI3-Kinase-Inhibitor-Assay

Die PI3-Kinase aktiviert den PI3K/Akt-Signalweg durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen in der Zellmembran, welche wiederum als Bindestellen für weitere Proteine, u.a. Akt, fungieren. Eine Inhibition der PI3-Kinase führt somit zur Inhibition des Akt/PKB-Signalwegs und letztendlich zur Inhibition von Migration und Proliferation. Da in der Literatur beschrieben wurde, dass OSF-2 den Akt/PKB-Signalweg aktiviert, wurde eine definierte Menge Tumorzellen ausgesät und 6 Tage, in An- und Abwesenheit des PI3-Kinase-Inhibitors, mit rekombinantem OSF-2-Protein und 1% FCS inkubiert. Die Zellzahl wurde anschließend unter Verwendung des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Kits (s. Kapitel 2.10.1) ermittelt.

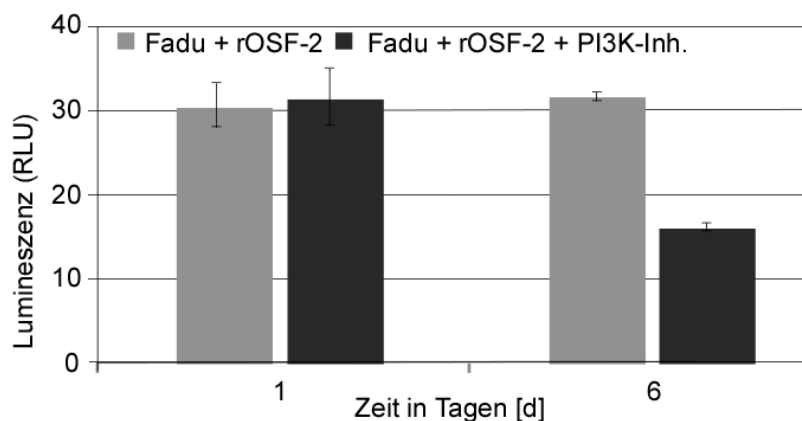


Abbildung 3.27: Untersuchung zur Inhibition der PI3-Kinase. Erläuterungen s. Text.

Die Zellzahl der Fadu-Zellen nach Inkubation mit rOSF-2 in 1% FCS-haltigem Medium entsprach nach 6 Tagen in etwa der an Tag 1 gemessenen Zellzahl. In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass bei Inkubation in 1% FCS-haltigem Medium keine meßbare Proliferation der Fadu-Zellen stattfindet. Die zusätzliche Inkubation mit PI3K-Inhibitor führte zur Verringerung der Zellzahl um ca. 50% (s. Abbildung 3.27). Das Versuchs-Setting erlaubt allerdings keine Unterscheidung zwischen Zellüberleben und Apoptose. Um ein verbessertes Zellüberleben gegen eine verminderte Apoptoserate abgrenzen zu können, müsste hier zusätzlich ein Apoptoseassay durchgeführt werden.

3.5 Beteiligung von OSF-2 an intrazellulären Signalwegen

Wie für verschiedene Tumorentitäten gezeigt werden konnte, ist OSF-2 ein Ligand von $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen (Gillan et al. 2002); (Bao et al. 2004); (Shao et al. 2004); (Kudo et al. 2006)) bzw. von $\alpha_6\beta_4$ -Integrinen (Baril et al. 2007). Integrine sind nicht nur an Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt, sie spielen auch eine wichtige Rolle für die Zellproliferation und -migration. Als Transmembranproteine ohne enzymatische Aktivität übertragen sie Signale aus der direkten Umgebung der Zelle durch Interaktion mit Signal- und Adapterproteinen (Zaidel-Bar et al. 2007; Legate et al. 2009) und können verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktivieren. Um eine mögliche Integrin-vermittelte Aktivierung des Akt/PKB-Signaltransduktionsweges durch OSF-2 zu untersuchen, wurden Hela-Zellen 3 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert, und anschließend 30 min mit Insulin (100 nM), rOSF-2, (100 ng/ml), konditioniertem Medium oder einem PI3K-Inhibitor (10 nM) behandelt und fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde unter Verwendung eines phospho-Akt-Antikörpers, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, durchgeführt.

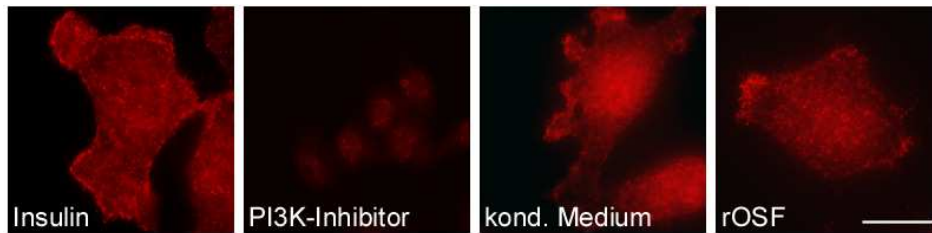


Abbildung 3.28: Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 30 min mit Insulin (100 nM), rOSF-2 (100 ng/ml), konditioniertem Medium oder einem PI3K-Inhibitor (10 nM) behandelt, anschließend fixiert, und mit einem phospho-Akt Antikörper angefärbt. Weitere Erläuterungen s. Text. Maßstabsbalken, 10 μ m.

Bei einem Großteil der Zellen konnte nach Inkubation mit Insulin eine positive phospho-Akt-Färbung beobachtet werden. Zellen, die mit PI3K-Inhibitor behandelt wurden, waren phospho-Akt-negativ. Die Inkubation mit konditioniertem Medium bzw. rOSF-2 führte bei vielen Zellen zu einer unvollständigen Membranfärbung. Um die Immunfluoreszenzfärbung (s. Abbildung 3.28) statistisch auszuwerten, wurden je 200 Zellen gezählt, und das Ergebnis graphisch dargestellt (s. Abbildung 3.29).

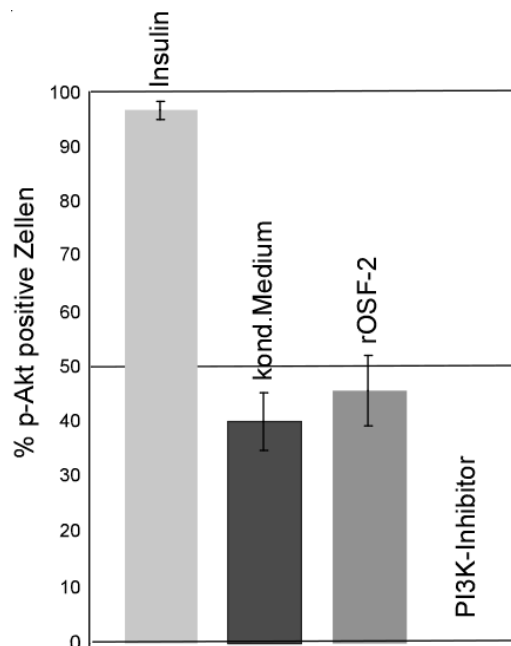


Abbildung 3.29: Graphische Darstellung der Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung nach Inkubation von HeLa-Zellen mit Insulin (100 nM), rOSF-2 (100 ng/ml), konditioniertem Medium oder einem PI3K-Inhibitor (10 nM). Weitere Erläuterungen s. Text.

In der graphischen Auswertung wird deutlich, dass nach Inkubation mit Insulin mehr als 95% aller Zellen eine positive phospho-Akt-Färbung zeigten. Im Gegensatz dazu waren nach Inkubation mit PI3K-Inhibitor weniger als 1% der Zellen gefärbt. Nach Inkubation mit rOSF-2 bzw.

konditioniertem Medium lag die Anzahl phospho-Akt-positiven Zellen zwischen 40 und 50% (s. Abbildung 3.30). Dieser Versuch wurde mit Hela-Zellen durchgeführt, da hier die Immunfluoreszenzfärbung am deutlichsten sichtbar und damit am besten auswertbar war.

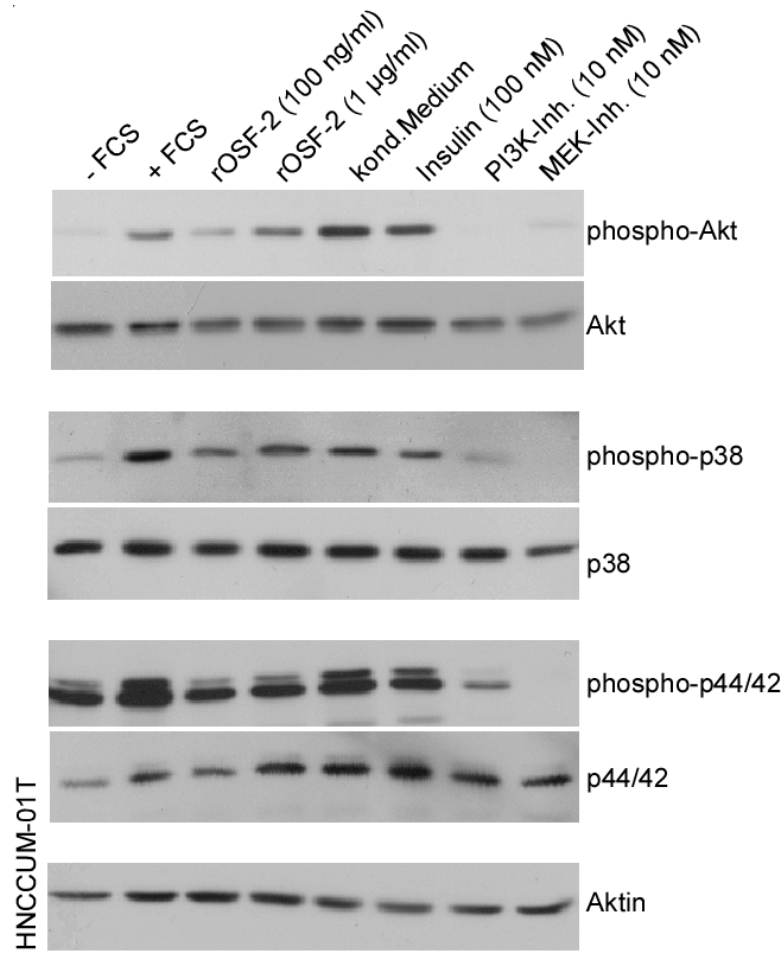


Abbildung 3.30: Proteinbiochemischer Nachweis der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden in Kopf-Hals-Tumorzellen (HNCUM-01T). Die Zellen wurden zunächst 12 h in serumfreiem Medium inkubiert, die anschließende Behandlung erfolgte für eine Dauer von 30 min in ebenfalls serumfreiem Medium. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Der proteinbiochemische Nachweis der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden erfolgte mittels Western-Blot-Analyse (s. Abbildung 3.30). Hierbei wurde die Phosphorylierung von Akt, p38 und p44/42 nach Inkubation einer Kopf-Hals-Tumorzelllinie mit FCS, rOSF-2, konditioniertem Medium, Insulin, PI3K- und MEK-Inhibitor untersucht. Nach Inkubation mit FCS oder rOSF-2 war eine leichte, nach Inkubation mit konditioniertem Medium oder Insulin eine starke Akt-Phosphorylierung nachweisbar. Die Inhibition von PI3K verhinderte die Phosphorylierung vollständig, während eine MEK-Inhibition die Akt-Phosphorylierung nicht beeinflusste. Eine schwache Aktivierung von p38 erfolgte nach Inkubation der Zellen mit rOSF-2, konditioniertem Medium oder Insulin, während FCS eine stärkere Aktivierung induzierte. Die Inkubation mit PI3K- oder MEK-Inhibitor führte zu einer vollständigen Inhibition der

p38-Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von p44/42 erfolgte nach Inkubation der Zellen mit FCS, Insulin oder konditioniertem Medium, wobei auch hier die Inhibition der PI3K oder MEK zu einer vollständigen Inhibition der Phosphorylierung führte.

3.6 Rolle von OSF-2 in der EMT

In der Endphase der Tumorentwicklung spielt die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die Umwandlung von epithelialen Zellen in Zellen eines mesenchymalen Phänotyps, eine wichtige Rolle. Hierbei werden u.a. Adhäsionsmoleküle herabreguliert, was die Migrationsfähigkeit der Zellen erhöht. Wie Yan und Kollegen zeigen konnten (Yan & Shao 2006), induziert stabil exprimiertes OSF-2 in 293T-Zellen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie und führt zu einer verstärkten Expression von Vimentin, EGFR und der Matrixmetalloproteinase 9. Um die Induktion einer EMT in Tumorzellen zu überprüfen, wurden Epithelzellen eines Cervixkarzinoms sowie Kopf-Hals-Tumorzellen mit OSF-GFP transfiziert bzw. extrinsisch 3 Tage mit rOSF-2 (100 ng/ml) behandelt. Eine Hoch- oder Herabregulation verschiedener EMT-Marker wurde anschließend mittels Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Analyse untersucht. Es konnte jedoch bei keiner der verwendeten Zelllinien eine Änderung in der Proteinexpression der untersuchten EMT-Marker gezeigt werden (s. Abbildung 3.31 und 3.32).

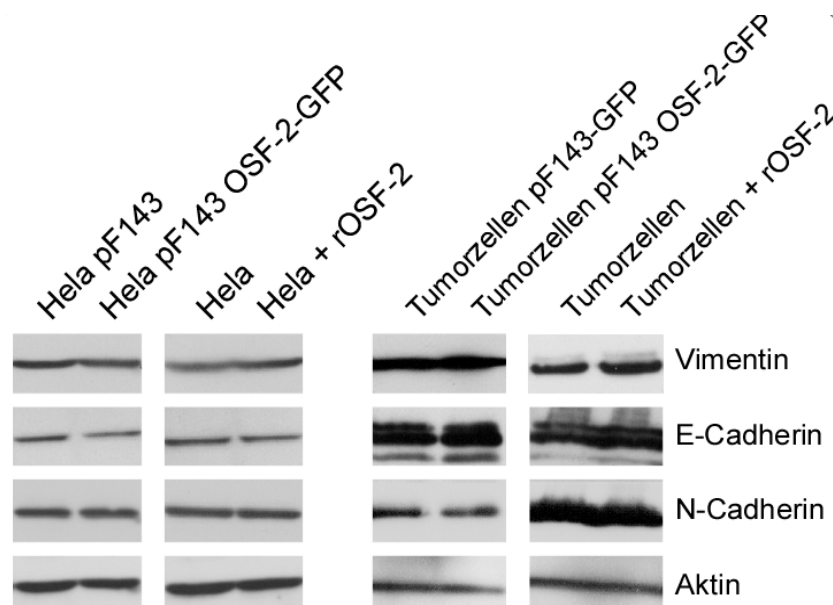


Abbildung 3.31: Untersuchung des Einflusses von OSF-2 auf die EMT. Nach Inkubation mit rOSF-2 (1 µg/ml) bzw. nach Transfektion von OSF-2-GFP konnten keine Änderungen in der Expression der EMT-Marker Vimentin, E-Cadherin und N-Cadherin detektiert werden.

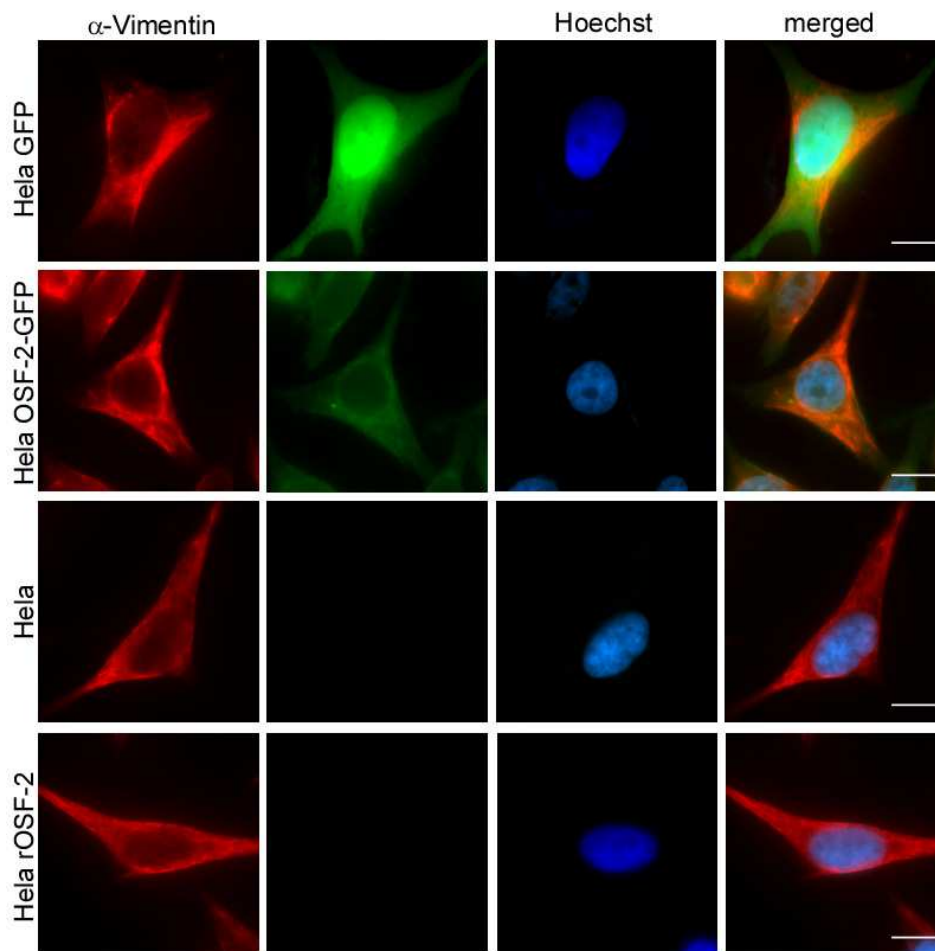


Abbildung 3.32: Untersuchung des Einflusses von OSF-2 auf die EMT. Nach Inkubation mit rOSF-2 (1 µg/ml) bzw nach Transfektion von OSF-2-GFP konnten in den Immunfluoreszenzfärbungen keine Änderungen in der Expression der EMT-Marker Vimentin, E-Cadherin und N-Cadherin detektiert werden. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Vimentinfärbungen von Hel-Zellen. Maßstabsbalken, 10 µm.

3.7 Untersuchung der Auswirkung einer OSF-2-Expression auf das Tumorwachstum *in vivo*

Um den Einfluß der OSF-2-Expression auf das Tumorwachstum *in vivo* zu überprüfen, wurden stabile Zelllinien subkutan in Thymus-negative, und daher immun-inkomponente, Nacktmäuse injiziert und das Tumorwachstum in regelmäßigen Abständen kontrolliert (s. Kapitel 2.11). Es wurden je 10^6 OSF-2-GFP-exprimierende, OSF-2 Δ Sek-GFP exprimierende Zellen, sowie als Kontrolle GFP-exprimierende A431-Zellen verwendet. Wie aus Abbildung 3.33 hervorgeht, konnte nach Injektion von OSF-2-GFP-exprimierenden Zellen kein signifikant verstärktes Tumorwachstum nachgewiesen werden. Die Sekretion von OSF-2 bzw. die Reduktion der OSF-2-Sekretion führte im Vergleich zur GFP-Kontrolle lediglich zu einem geringfügig höheren Tumolvolumen.

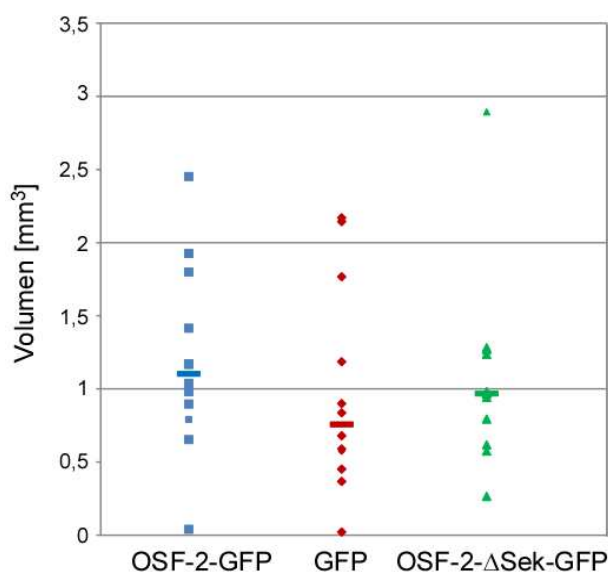


Abbildung 3.33: Einfluß der OSF-2-Expression auf das Tumorwachstum *in vivo*. Dargestellt ist das Volumen des Tumors bei Tötung der Maus nach Versuchsende. Nach subkutaner Injektion von 10^6 stabil exprimierenden A431-Zellen in je 12 Nacktmäuse konnte kein signifikanter Einfluß der OSF-2-Sekretion auf das Tumorwachstum festgestellt werden.

3.8 OSF-2-Expression in primären Tumorzellen und TAFs

Zelllinien stellen als *in vitro*-Modelle wichtige Hilfsmittel bei zell- und molekularbiologischen Untersuchungen dar. Sie sind unbegrenzt teilungsfähig, stehen dem Anwender jederzeit nahezu unverändert zur Verfügung, und ermöglichen daher zeitlich ausgedehnte Studien sowie experimentelle Serien. Dennoch stellen Zelllinien artifizielle Systeme dar. Primärzellen bilden hingegen eine Brücke zwischen der artifiziellen *in vitro*-Situation und *in vivo*-Tierversuchen, da sie den Bedingungen im Organismus viel näher kommen als Zelllinien. Für OSF-2 wird derzeit diskutiert, ob die geringe endogene OSF-2-Expression in Zelllinien auf die, von Wachstumsfaktoren weitestgehend unabhängigen, in Kultur gehaltenen transformierten Zellen zurückzuführen ist. Da in der Literatur zudem kontrovers diskutiert wird, ob das sekretierte OSF-2-Protein von Tumorzellen oder Zellen des Tumorstromas exprimiert wird, wurden in der vorliegenden Arbeit Tumor-assoziierte Fibroblasten und Tumorzellen eines humanen Kopf-Hals-Tumors separiert, charakterisiert und auf ihre OSF-2-Expression hin untersucht.

3.8.1 Isolation und Charakterisierung primärer Tumorzellen und TAF

Tumor-assoziierte Fibroblasten stellen den Hauptanteil der Zellen des Tumorstromas dar und spielen bei der Tumorentstehung, -progression und -metastasierung eine wichtige Rolle (Xouri & Christian 2009). Die Charakterisierung der isolierten humanen Kopf-Hals-Tumorzellen sowie der Tumor-assoziierten Fibroblasten fand hauptsächlich über Immunfluoreszenzfärbungen statt. Da die isolierten Tumorzellen eine sehr starke Proliferation zeigten, konnten hier zusätzlich funktionelle Assays durchgeführt werden. Die Tumorzellen konnten als Zelllinie etabliert werden,

und werden im Folgenden bis Passage 5 als primäre Tumorzellen bezeichnet. Um Verwechslungen zu vermeiden, werden die Zellen bei Versuchen, die nach Passage 5 durchgeführt wurden als StauMa (Labor Prof. Stauber, Universitätsklinikum Mainz)-Zellen bezeichnet.

3.8.2 Separation primärer Tumorzellen und TAFs

Die Isolation und Separation primärer Tumorzellen und Tumor-assoziiierter Fibroblasten wurde mittels differentieller Trypsinisierung durchgeführt und ergab eine morphologisch heterogene Tumorkultur sowie eine morphologisch homogene TAF-Kultur (s. Abbildung 3.34).

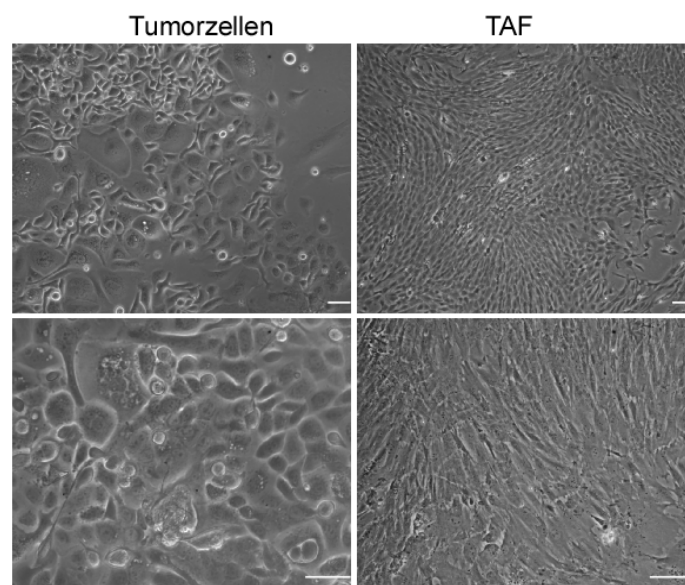


Abbildung 3.34: Isolation und Separation primärer Tumorzellen und TAFs. Dargestellt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der morphologisch heterogenen Tumorkultur und der morphologisch homogenen TAF-Kultur. Maßstabsbalken, 30 μm .

3.8.3 Immunfluoreszenzanalyse primärer Tumorzellen und TAFs

Um eine mögliche Verunreinigung der primären Tumorkultur durch Fibroblasten auszuschließen, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Immunfluoreszenzanalysen mit Fibroblasten- und Epithelialmarkern durchgeführt (s. Abbildung 3.35).

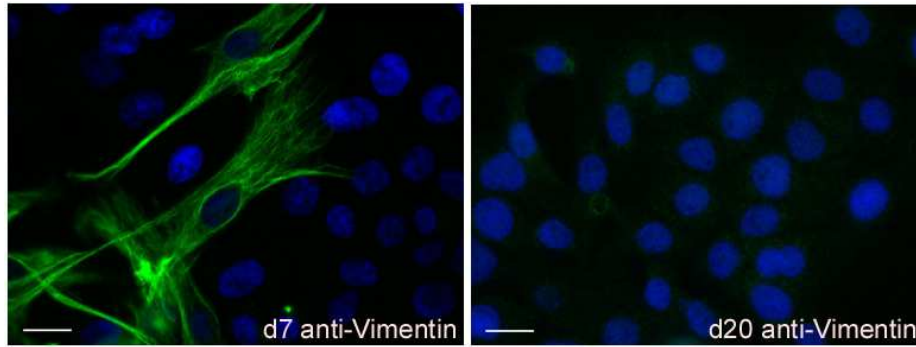


Abbildung 3.35: Untersuchung der primären Tumorkultur auf mögliche Verunreinigungen durch Fibroblasten. Dargestellt sind jeweils zwei repräsentative Aufnahmen der angegebenen Zeitpunkte. Maßstabsbalken, 10 μm . Weitere Erläuterungen siehe Text.

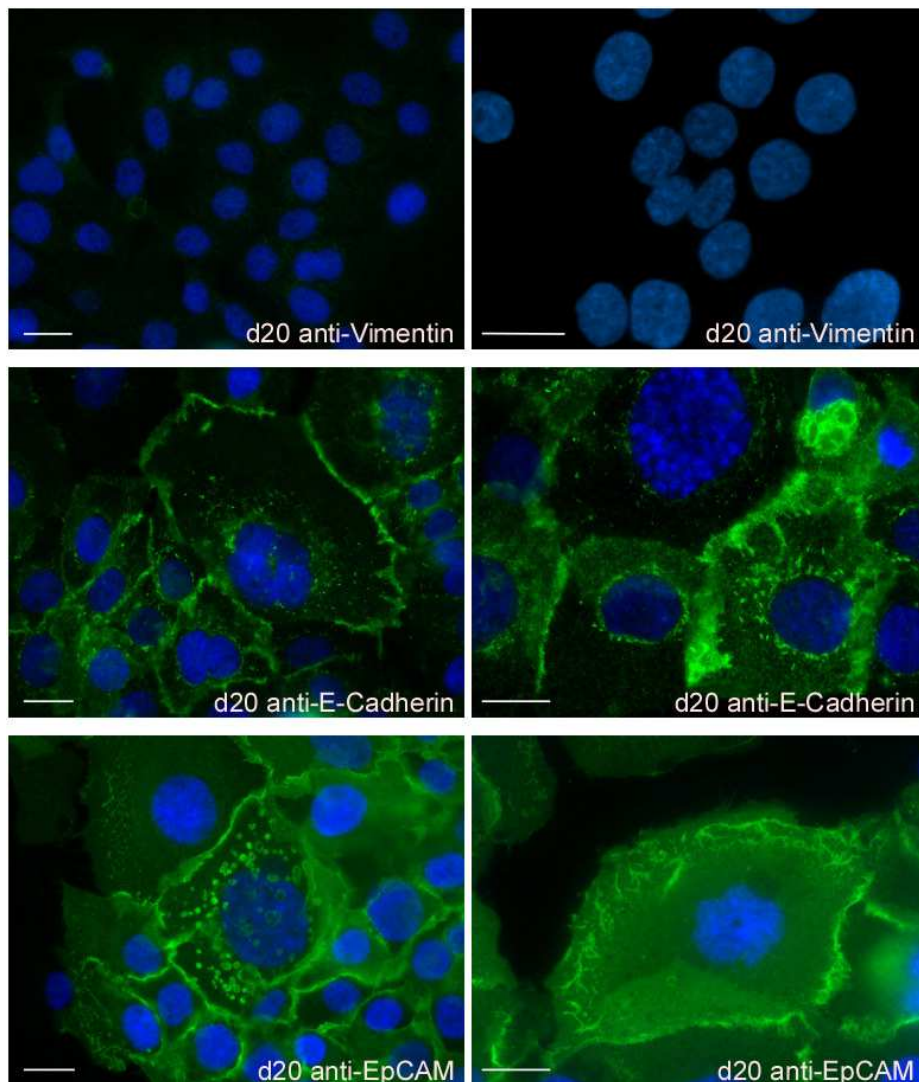


Abbildung 3.36: Untersuchung der primären Tumorkultur auf mögliche Fibroblasten-Verunreinigungen und Nachweis epithelialer Marker. Dargestellt sind jeweils zwei repräsentative Aufnahmen der angegebenen Zeitpunkte. Maßstabsbalken, 10 μm . Weitere Erläuterungen siehe Text.

Mittels Immunfluoreszenzanalyse konnten an Tag 20 in allen Zellen die epithelialen Marker EpCAM und E-Cadherin nachgewiesen werden. Die negative Immunfärbung mit dem Fibroblastenmarker Vimentin zeigte, dass die Kultur frei von Fibroblasten war. Die Funktionalität des Vimentin-Antikörpers konnte durch eine Immunfärbung zu einem früheren Zeitpunkt nach Isolation der Zellen (Tag 7) nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.36).

3.8.4 Transfektion von EpCAM-GFP in primäre Tumorzellen

Um die Transfektionseffizienz der primären Tumorzellen zu testen, wurde EpCAM-GFP unter Verwendung von Lipofectamine™ 2000 in die Tumorzellen transfiziert (s. Kapitel 2.9.3). Die

Tumorzellen zeigten eine Transfektionseffizienz von etwa 80%, wobei EpCAM-GFP die gleiche Lokalisation wie endogenes EpCAM aufwies (s. Abbildung 3.37).

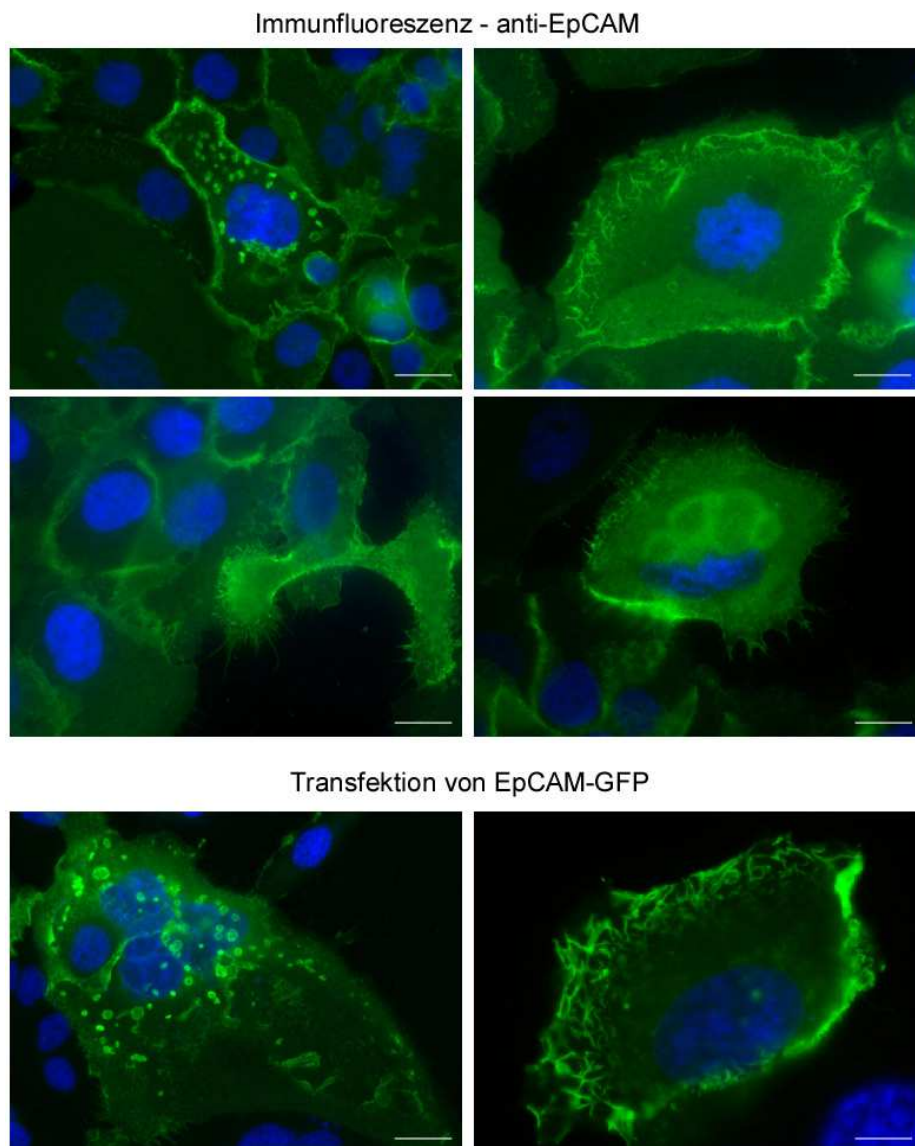


Abbildung 3.37: Vergleich der Lokalisation endogenen EpCAMs mit der Lokalisation von EpCAM-GFP nach transienter Transfektion in primäre Tumorzellen. Maßstabsbalken, 10 μm . Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.8.5 Wundheilungs-Assay (“Scratch“-Assay)

Die Migration von Tumorzellen spielt sowohl bei der Tumorgenese als auch bei der Metastasierung eine wichtige Rolle. Die Migrationsfähigkeit der StauMa-Zellen wurde im “Scratch“-Assay mit der Migrationsfähigkeit zweier humaner Tumorzelllinien verglichen (s. Kapitel 2.10.2). Hierbei konnte beobachtet werden, dass die StauMa-Zellen sehr viel langsamer migrieren als die etablierten Tumorzelllinien. Bei Abbruch des Assays nach 17 h waren hier mehr als 60% der zuvor offenen Fläche immer noch unbesiedelt (s. Abbildung 3.38).

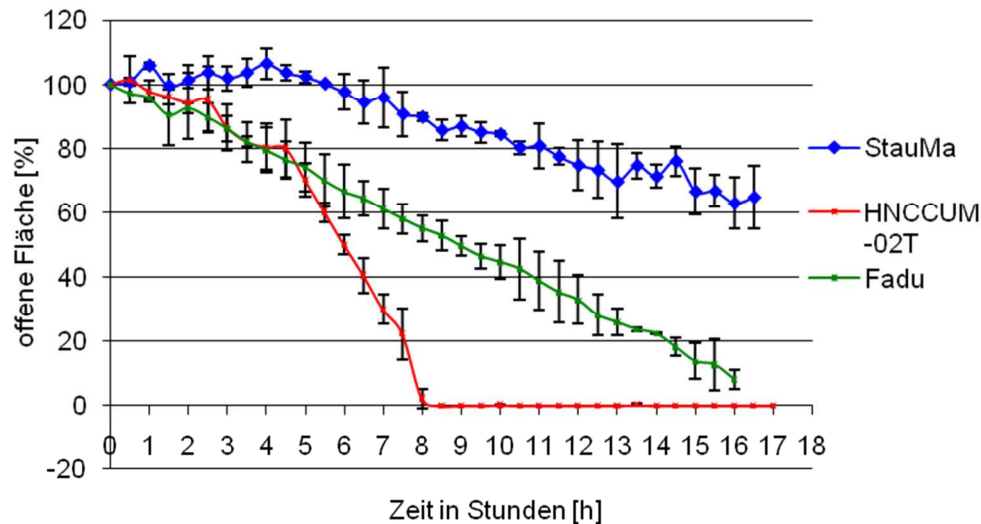


Abbildung 3.38: Untersuchung der Migrationsgeschwindigkeit von StauMa-Zellen. Erläuterungen s. Text.

3.8.6 Tumorsphären-Formations-Assay

Während der Scratch-Assay eine Aussage über die Migrationsfähigkeit der Zellen erlaubt, wurde die Fähigkeit zur Proliferation („Klonogenität“) im Tumorsphären-Formations-Assay ermittelt. Hierbei wurde analysiert welcher Prozentsatz der Tumorzellen dazu in der Lage ist Tumorsphären zu bilden, wobei maligne Zellen generell eine größere Tendenz zeigen, Sphäroide zu bilden als nicht-maligne Zellen (Rak et al. 1995). Um die Fähigkeit der Sphäroidbildung zu untersuchen, wurden 20.000 Stauma-Zellen pro ml Kulturmedium in unbeschichtete Kulturschalen ausgesät und 10 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei der anschließenden Analyse im Durchlichtmikroskop zeigte sich, dass StauMa-Zellen Sphäroide unterschiedlicher Größe ausbilden können. Einige Zellen konnten sogar auf den unbeschichteten Kulturschalen adhären und proliferieren. Dieser Versuch wurde ebenfalls mit zwei Vergleichs-Tumorzelllinien durchgeführt, die beide in gleichem Maße dazu in der Lage waren, Sphäroide zu bilden und auf unbeschichteten Kulturschalen anzuhängen (s. Abbildung 3.39).

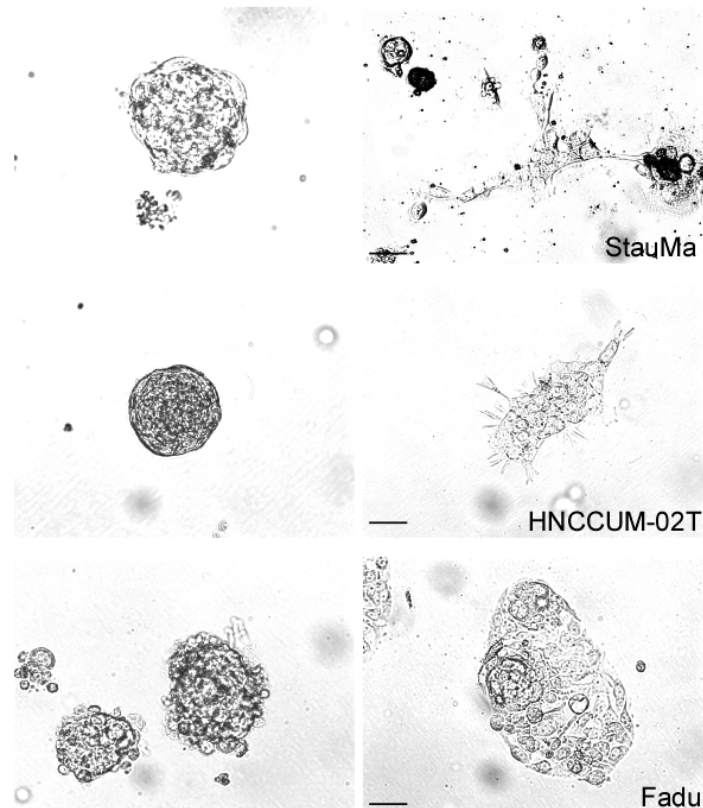


Abbildung 3.39: Untersuchung der Fähigkeit zur Sphäroidbildung. Sowohl StauMa-Zellen als auch die humanen Vergleichszelllinien Fadu und HNCCUM-02T waren dazu in der Lage Sphäroide zu bilden und auf unbeschichteten Kulturschalen zu adhären. Maßstabsbalken, 100 μm .

3.8.7 Zellüberleben bei Serumentzug

Die vorherrschenden Bedingungen in Tumorgewebe sind Sauerstoff- und Nährstoffmangel. Um bei diesen Bedingungen überleben zu können, müssen Tumorzellen eine hohe Stressresistenz aufweisen. Um das Überleben der StauMa-Zellen nach Serumentzug zu überprüfen, wurden 10^3 Zellen pro well ausgesät und nach Adhäsion an die verwendeten 96-well-Platten in serumfreiem Medium kultiviert. Als Vergleichszelllinie wurde eine humane Plattenepithelkarzinomlinie aus dem Pharynx (Fadu) gewählt. Nach 6 Tagen wurde die Zellzahl erneut bestimmt, wobei nachgewiesen werden konnte, dass die Zellzahl der nicht-apoptotischen StauMa-Zellen um das 10-fache größer war als die Zellzahl der Vergleichszelllinie (s. Abbildung 3.40).

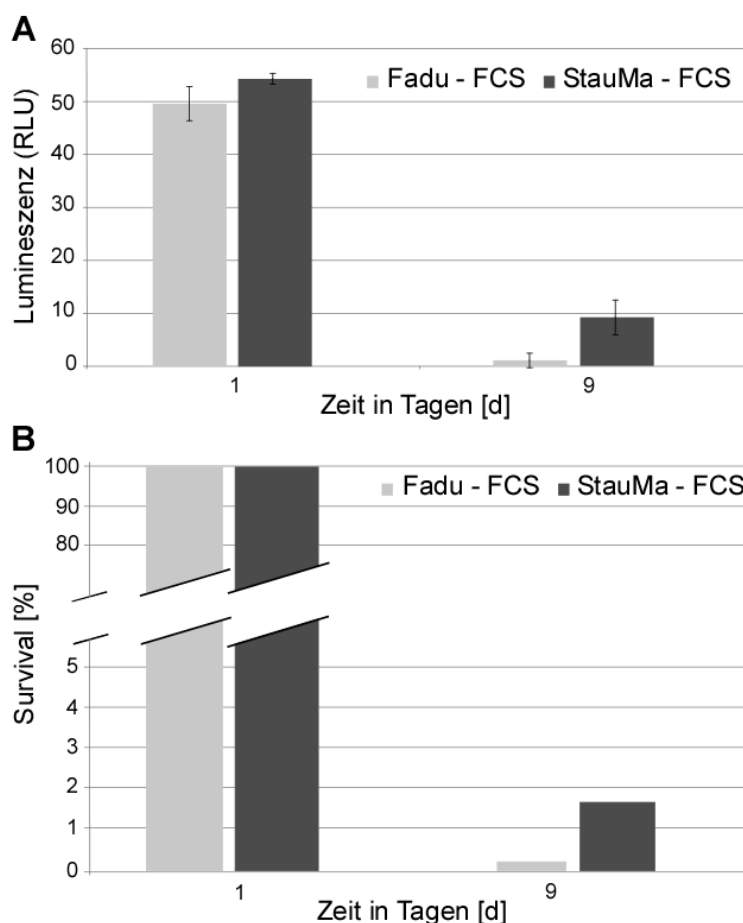


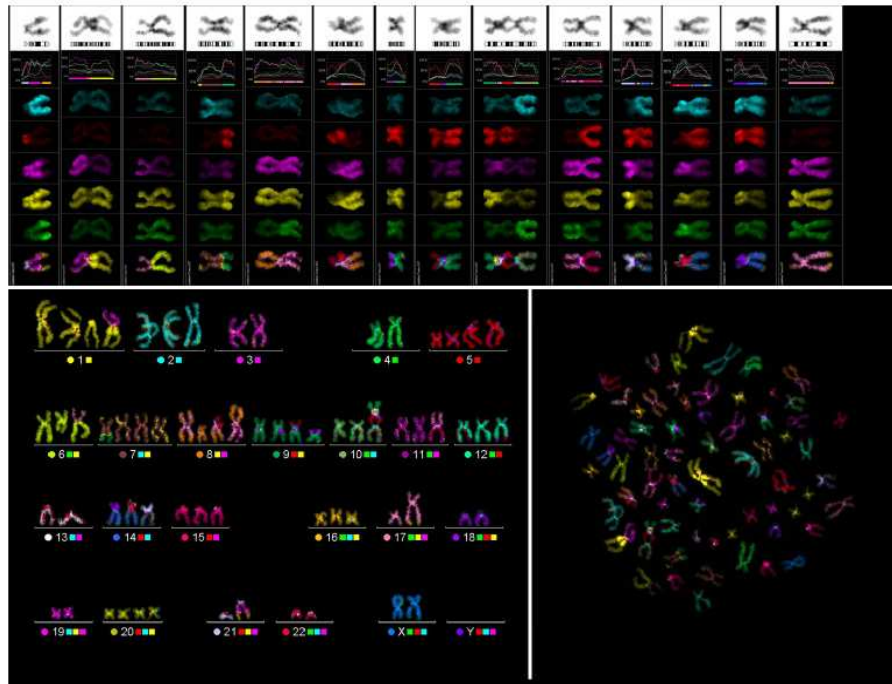
Abbildung 3.40: Untersuchung des Zellüberlebens bei Serumentzug. (A) Die Zellzahl der StauMa-Zellen wurde durch Inkubation in serumfreiem Medium weniger stark reduziert als die Zellzahl der Vergleichszelllinie (Fadu). (B) Nach 6-tägiger Inkubation in serumfreiem Medium war die Zellzahl der StauMa-Zellen um das 10-fache größer als die Zellzahl der Vergleichszelllinie (Fadu).

3.8.8 FISH (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung)

Mit Hilfe der FISH-Analyse lassen sich Chromosomenaberrationen wie Translokationen und Amplifikationen nachweisen. Charakteristisch für einen großen Prozentsatz solider epithelialer Tumore ist ihre genetische Instabilität, die sich u.a. in Chromosomen- oder Mikrosatelliten Instabilität (Lengauer et al. 1997; Lengauer et al. 1998) zeigt. Die genetische Instabilität kann bereits zu Beginn der Tumorentstehung existieren oder während des Tumorstadiums beträchtlich zunehmen, wobei die Bildung neuer, aggressiver Subklone zu einer beträchtlichen Heterogenität innerhalb des Tumors beiträgt (Cahill et al. 1999). Zum Zeitpunkt der Primärdiagnose besteht daher ein Tumor in der Regel bereits aus verschiedenen Zellpopulationen mit genetisch unterschiedlichen Genotypen. Dies könnte eine Erklärung für die zum Teil sehr unterschiedlichen klinischen Verläufe von Patienten mit gleichem Tumorstadium und gleicher Behandlung darstellen. Die FISH-Analyse der humanen Tumorzellen wurde in Kooperation mit Frau Prof. Shirley Knauer und Herr PD Dr. Wolfgang Gödecke (Zentrum für Medizinische Biotechnologie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt. Sie ergab eine Vielzahl

chromosomaler Veränderungen. Fast alle Chromosomen waren von Amplifikationen und/oder Translokationen betroffen (s. Abbildung 3.41).

Metaphase 7



Metaphase 10

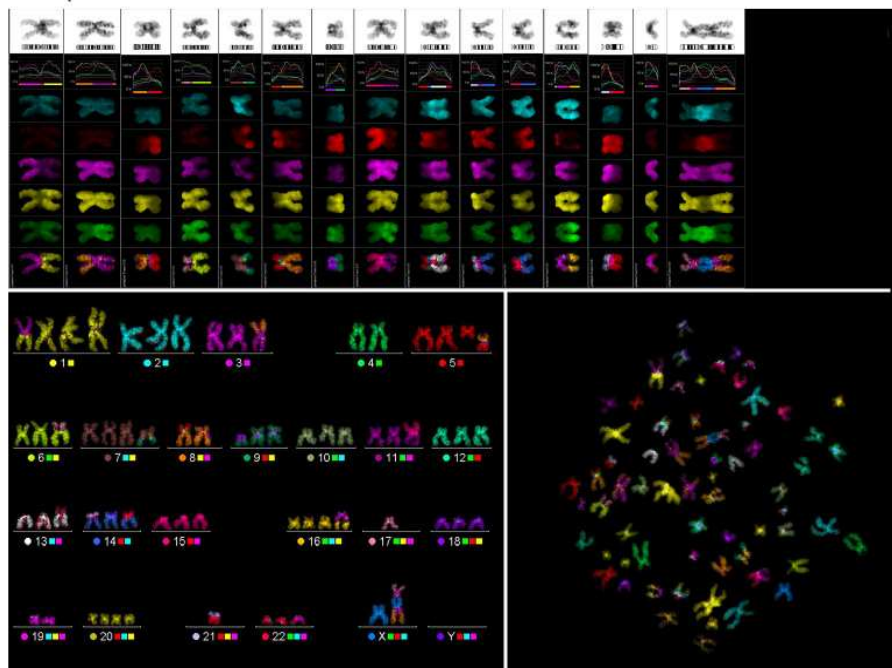


Abbildung 3.41: Nachweis chromosomaler Aberrationen in StauMa-Zellen. Die FISH-Analyse ergab eine Vielzahl chromosomaler Veränderungen. Fast alle Chromosomen zeigten Amplifikationen und/oder Translokationen.

3.8.9 RNA- und microRNA-Isolation und Microarray

Tumor-assoziierte Fibroblasten stellen den zellulären Hauptanteil des Tumorstromas dar und spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorinitiation, -progression und -metastasierung (Xouri & Christian 2009). Dennoch ist noch wenig bekannt, wie Veränderungen der stromalen Genexpression die Tumorprogression beeinflussen. Genexpressionsprofile ermöglichen die Charakterisierung und Klassifizierung von Tumoren (Sorlie et al. 2001) bzw. definierter Zelltypen innerhalb eines Tumors (Singer et al. 2008). Sie können von prognostischer und/oder diagnostischer Relevanz sein (Sorlie et al. 2001; van 't Veer et al. 2002; van de Vijver et al. 2002; Wang et al. 2005) und sind besonders gut geeignet, um komplexe Veränderungen wie die Tumor-Stroma-Interaktionen zu analysieren. Zur Untersuchung der differentiellen Genexpression wurden Gesamt-RNA und microRNA aus den primären Tumorzellen sowie den Tumor-assoziierten Fibroblasten isoliert (s. Kapitel 2.5.17). Um Qualität und Quantität der RNA- und microRNA-Isolation zu überprüfen, wurden diese mit Hilfe des NanoDrops photometrisch gemessen und auf einem Agilent RNA 6000 Nano LabChip analysiert (s. Kapitel 2.5.18 und Abbildung 3.42).

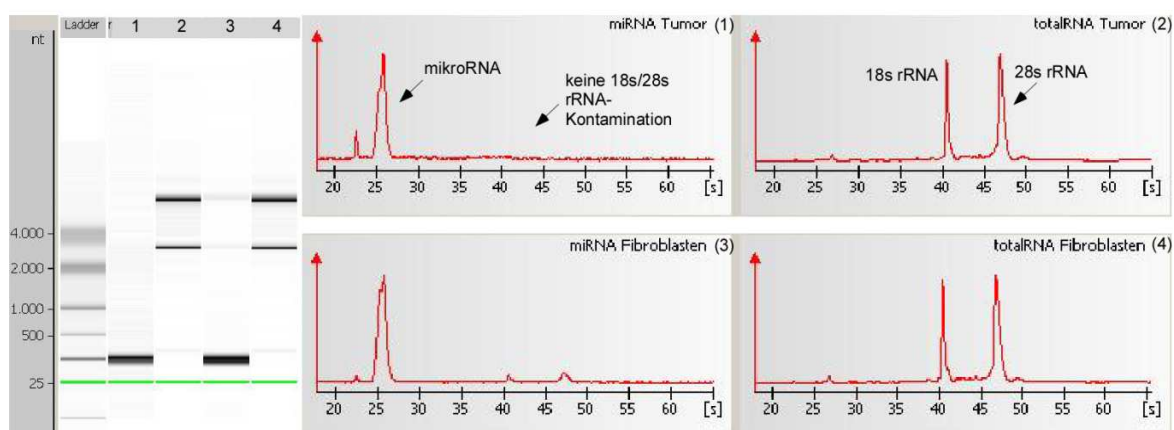


Abbildung 3.42: Analyse der isolierten RNA und microRNA. Die Agilent-Analyse ergab einen Peak für die isolierte microRNA sowie einen 18S und einen 28S rRNA-Peak für die isolierte RNA. Die MicroRNA zeigt keine Verunreinigung mit 18S oder 28S rRNA.

Die Analyse der RNA- und microRNA-Qualität auf dem Agilent RNA 6000 Nano LabChip ergab saubere RNA bzw. microRNA-Banden für Tumorzellen und Tumor-assoziierte Fibroblasten, so dass je 5 µg der Tumor- und TAF-RNA, und je 2 µg der Tumor- und TAF-microRNA zur Durchführung eines Microarrays verwendet wurden. Die Microarrays wurden im Chip-Labor von Herrn PD Dr. Ludger Klein-Hitpass (Universitätsklinikum Essen) durchgeführt (s. Abbildung 3.43). Erste Auswertungen der Daten ergaben für OSF-2 in TAFs eine Hochregulation um den Faktor 21,13 im Vergleich zur Expression in Tumorzellen.

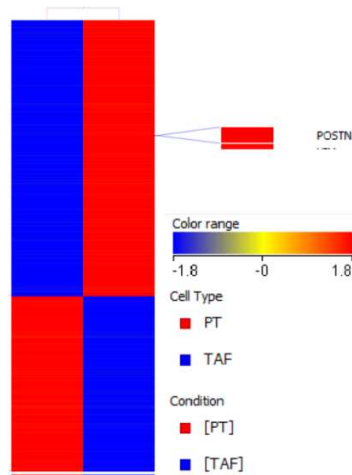


Abbildung 3.43: Graphische Übersichtsdarstellung der Microarray-Ergebnisse. Im Vergleich zur Expression in Tumorzellen ist OSF-2 (POSTN) in Tumor-assoziierten Fibroblasten hochreguliert.

3.8.10 Analyse der mRNA-Expression in Tumorzellen und TAFs

Die Validierung der Microarray-Ergebnisse hinsichtlich der OSF-2-Expression primärer Tumorzellen und Tumor-assoziiierter Fibroblasten fand mittels RT-PCR sowie quantitativer Real time-PCR statt (s. Kapitel 2.5.21). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die primären Tumorzellen weniger OSF-2 exprimierten als die Tumor-assoziierten Fibroblasten, während die Menge der Referenz GAP-DH in beiden Proben identisch war (s. Abbildung 3.44).

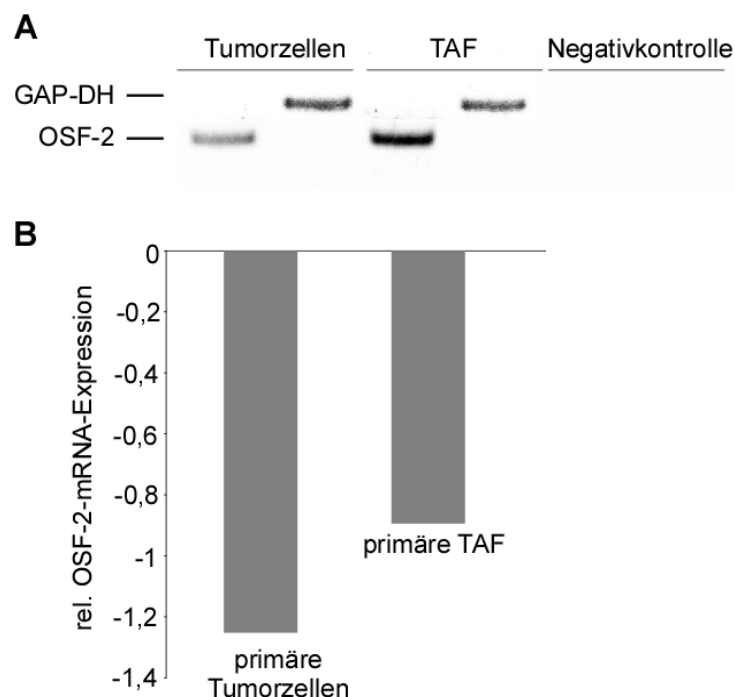


Abbildung 3.44: Validierung der Microarray-Ergebnisse hinsichtlich der OSF-2-Expression primärer Tumorzellen und Tumor-assoziiierter Fibroblasten. (A) Analyse der OSF-2-Expression mittels RT-PCR. Erläuterungen siehe Text. (B) Auswertung der Ergebnisse der Real Time-PCR. Dargestellt ist die relative OSF-2-mRNA-Expression bezogen auf die mRNA-Expression der RNA-Polymerase II. Da die

OSF-2-Expression mit steigendem C_t -Wert sinkt, wurde die relative OSF-2-mRNA-Expression als Negativ-Wert dargestellt. Die primären Tumorzellen exprimieren also deutlich weniger OSF-2 als primäre Tumor-assoziierte Fibroblasten.

Die Ergebnisse des Microarrays konnten mittels RT-PCR und Real Time-PCR bestätigt werden. Auch hier konnte eine höhere OSF-2-Expression in den primären Tumor-assoziierten Fibroblasten gezeigt werden (s. Abbildung 3.44).

3.8.11 OSF-2-Expression in primären Tumorzellen

Da die Proteinexpression sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene reguliert werden kann, korreliert die mRNA-Konzentration nicht zwangsläufig mit der Menge exprimierten Proteins. Daher wurden neben Genexpressionsanalysen zusätzlich Experimente auf Proteinebene durchgeführt. Um die OSF-2-Expression in primären Tumorzellen zu zeigen, wurde ein Zellpellet, wie in Kapitel 2.8 beschrieben, unter Verwendung des anti-OSF-2-Antikörpers gefärbt (s. Abbildung 3.45). Die Zellen zeigten eine starke OSF-2-Färbung, während die Negativkontrolle ungefärbt blieb.

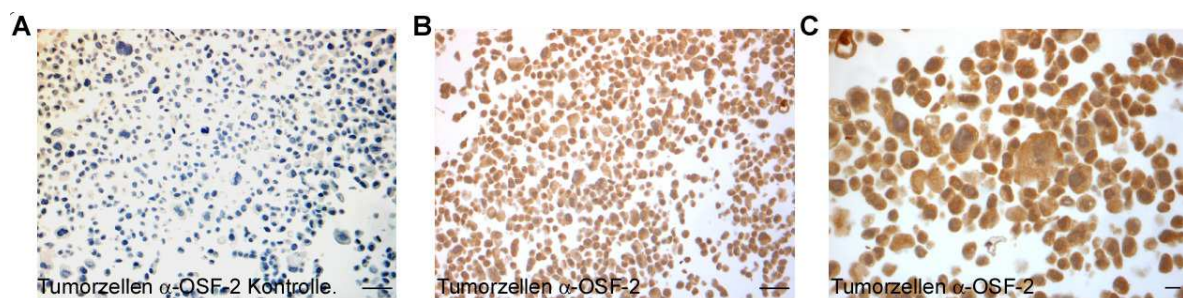


Abbildung 3.45: Nachweis der OSF-2-Expression in primären Tumorzellen. Die immunhistochemische Färbung eines Tumor-Zellpellets zeigte eine starke OSF-2-Expression. Maßstabsbalken, 100 μ m (A, B) bzw. 10 μ m (C).

Die Immunfluoreszenzfärbung der primären Tumorzellen wurde unter Verwendung des anti-OSF-2-Antikörpers, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, durchgeführt, und ergab eine zytoplasmatische OSF-2-Lokalisation mit deutlich erkennbaren granulären Strukturen im Zytoplasma (s. Abbildung 3.46).

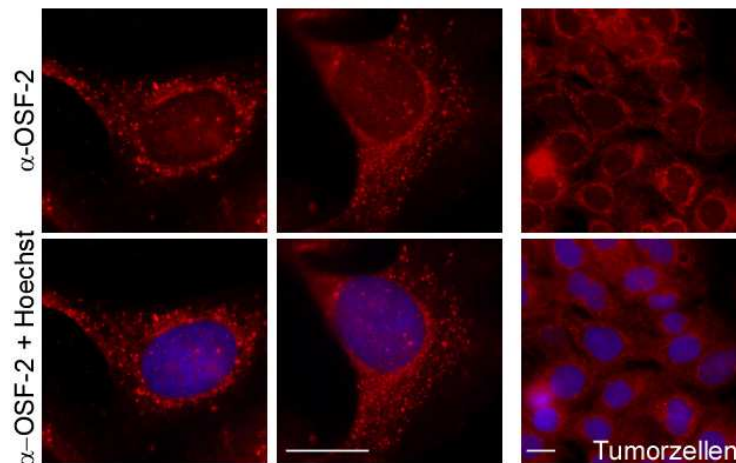


Abbildung 3.46: Nachweis der OSF-2-Expression in primären Tumorzellen. Maßstabsbalken, 10 μm . Erläuterungen siehe Text.

3.8.12 Untersuchung der Tumorigenität der isolierten Tumorzellen am subkutanen Xenograft-Mausmodell

3.8.13 Tumorinitiation und –wachstum *in vivo*

Um die Tumorigenität der StauMa-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden Xenograft-Versuche in Thymus-negativen, und daher immun-inkompetenten, Nacktmäusen durchgeführt. Nach subkutaner Injektion verschiedener Tumorzellzahlen in die rechte und linke Flanke wurde das Tumorwachstum beobachtet, und die Tumore direkt nach Versuchsende entnommen und weiterverarbeitet. Je höher die Tumorigenität der injizierten Zellen, desto niedriger sollte hier die Zellzahl sein, die ein Tumorwachstum auslöst. Teile der Tumore wurden zur Zellisolation genutzt (s. Kapitel 2.9.5), andere Teile wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur RNA-Isolation verwendet oder für immunhistochemische Färbungen in Formalin fixiert.

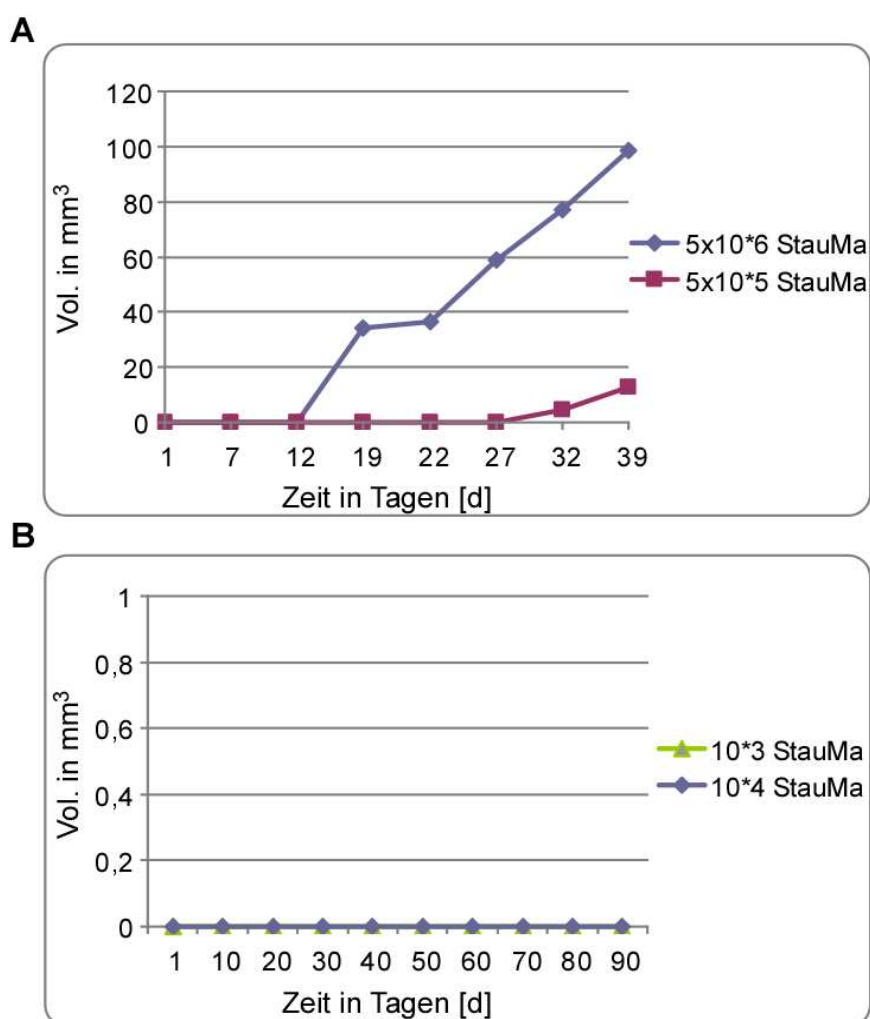


Abbildung 3.47: Untersuchung der Tumorigenität der isolierten Tumorzellen in Thymus-negativen Nacktmäusen. Dargestellt ist das Tumolvolumen zu den jeweiligen Zeitpunkten sowie bei Versuchsende, nach Tötung der Maus. Es wurden 10^3 , 10^4 , 5×10^5 , sowie 5×10^6 StauMa-Zellen subkutan in die rechte und linke Mausflanke injiziert. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Nach Injektion von 5×10^6 StauMa-Zellen konnte ein Tumorwachstum ab Tag 12 beobachtet werden, nach Injektion von 5×10^5 Zellen war das Tumorwachstum erst ab Tag 32 messbar. Das Endvolumen der Tumore bei Tötung der Maus lag dementsprechend bei fast 100 mm^3 für 5×10^6 Tumorzellen und bei etwa 12 mm^3 für 5×10^5 Tumorzellen (s. Abbildung 3.46). Nach Injektion von 10^3 und 10^4 StauMa-Zellen konnte kein Tumorwachstum beobachtet werden. Der Versuch wurde hier nach 90 Tagen abgebrochen.

3.8.14 Isolation muriner Tumorzellen, Fibroblasten und TAF

Aus den in Kapitel 3.8.13 induzierten und nach Tötung der Tiere entnommenen Maustumoren wurden mit Hilfe des MACS-Systems Tumorzellen und TAF isoliert. Desweiteren wurde Gewebe der Ohrmuschel der jeweiligen Maus präpariert, um hieraus nicht-Tumor-assoziierte, normale primäre Fibroblasten zu gewinnen (s. Kapitel 2.9.5-2.9.7 und Abbildung 3.48).

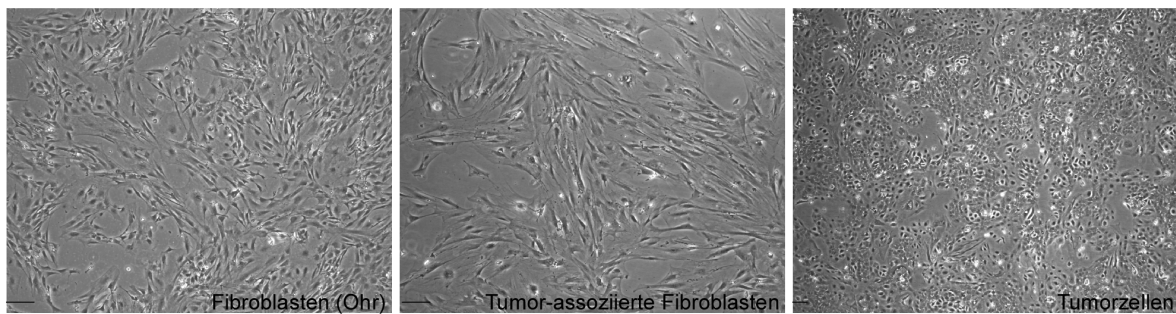


Abbildung 3.48: Lichtmikroskopaufnahmen isolierter Fibroblasten, Tumorzellen und Tumor-assoziiertes Fibroblasten nach Isolation aus Mausgewebe. Maßstabsbalken, 50 µm.

Im Anschluß an die Isolation der Tumorzellen wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit dem epithelialen Marker EpCAM und dem Fibroblastenmarker Vimentin durchgeführt, um die Reinheit der isolierten Zellpopulation zu überprüfen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle Zellen EpCAM-positiv und Vimentin-negativ waren. Eine Immunfluoreszenzanalyse der Tumor-assoziierten Fibroblasten sowie der normalen Fibroblasten war leider nicht möglich, da diese nicht lange genug in Kultur gehalten werden konnten (s. Abbildung 3.49).

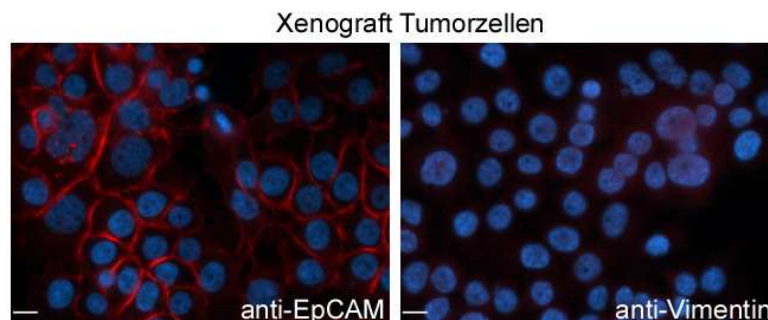


Abbildung 3.49: Untersuchung der Reinheit der isolierten murinen Tumorzellpopulation. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzanalyse der Tumorzellen mit dem epithelialen Marker EpCAM und dem Fibroblastenmarker Vimentin. Maßstabsbalken, 10 µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.8.15 RNA- und microRNA-Isolation muriner Fibroblasten, Tumorzellen und Tumor-assoziiertes Fibroblasten

Die Injektion der humanen Tumorzellen in Nacktmäuse ermöglicht den Vergleich des Genexpressionsprofils der aus humanem Gewebe isolierten Zellen mit dem Expressionsprofil der aus Maustumorgewebe isolierten, bereits in Kultur gehaltenen, humanen Tumorzellen. Auch wird, im Gegensatz zum humanen Material, ein Vergleich Tumor-assoziiertes Fibroblasten mit aus Normalgewebe isolierten murinen Fibroblasten möglich. Zur Untersuchung der differentiellen Genexpression muriner Fibroblasten, Tumorzellen und TAF, wurden RNA und microRNA aus den

entsprechenden Zellen isoliert (s. Kapitel 2.5.17). Um Qualität und Quantität der Gesamt- und microRNA zu überprüfen, wurde diese am NanoDrop photometrisch vermessen und auf einem Agilent RNA 6000 Nano LabChip analysiert (s. Kapitel 2.5.18 und Abbildung 3.50).

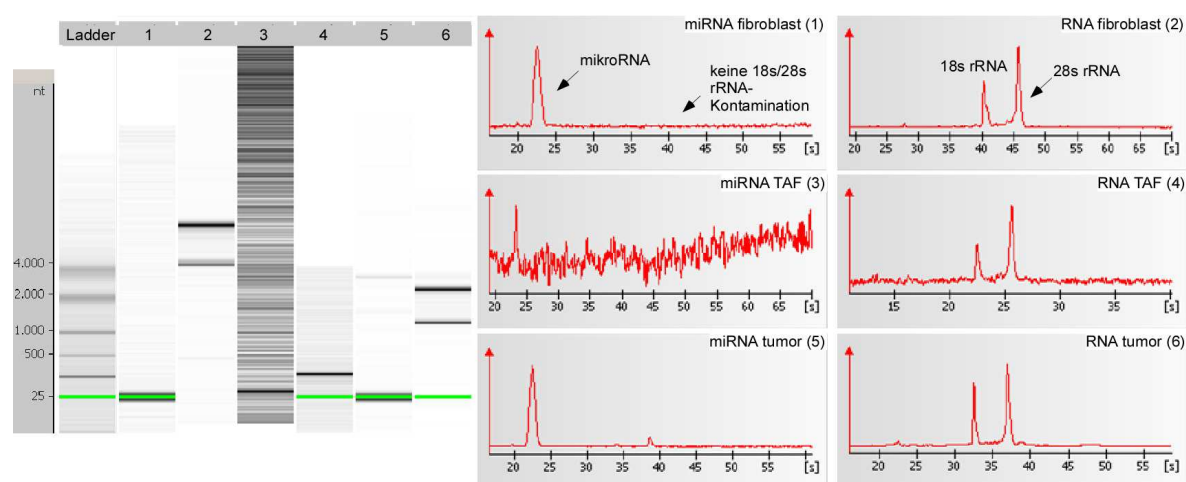


Abbildung 3.50: Analyse der isolierten murinen RNA und microRNA. Die Agilent-Analyse ergab einen Peak für die isolierte microRNA sowie einen 18S und einen 28S rRNA-Peak für die isolierte RNA. Die microRNA aus murinen, normalen Fibroblasten und Tumorzellen zeigte keine Verunreinigung mit 18S oder 28S rRNA. Die Isolation der microRNA aus Tumor-assoziierten Fibroblasten war leider nicht erfolgreich.

Die Analyse der RNA- und microRNA-Qualität auf dem Agilent RNA 6000 Nano LabChip ergab zwar saubere RNA bzw. microRNA-Banden für Tumorzellen und aus Normalgewebe isolierte Fibroblasten (Ohr). Die Isolation der microRNA der Tumor-assoziierten Fibroblasten war jedoch leider nicht erfolgreich. Die Durchführung des RNA-Microarrays ist derzeit in Vorbereitung.

3.8.16 Vergleich der OSF-2-Isoform-Expression primärer Tumorzellen und TAFs

Die OSF-2-Isoform-Expression der primären Tumorzellen im Vergleich zu Tumor-assoziierten Fibroblasten wurde mittels Amplifikation des C-terminalen OSF-2-Bereichs (s. Abbildung 3.21) und anschließender Sequenzierung untersucht. Hierbei konnten vier OSF-2-Isoformen identifiziert und festgestellt werden, dass weder Tumorzellen noch Tumor-assoziierte Fibroblasten eine Expression spezifischer OSF-2-Isoformen zeigten (s. Abbildung 3.51). Die in der Literatur als Wildtyp propagierte Sequenz (Takeshita et al. 1993) konnte wiederum nicht nachgewiesen werden.

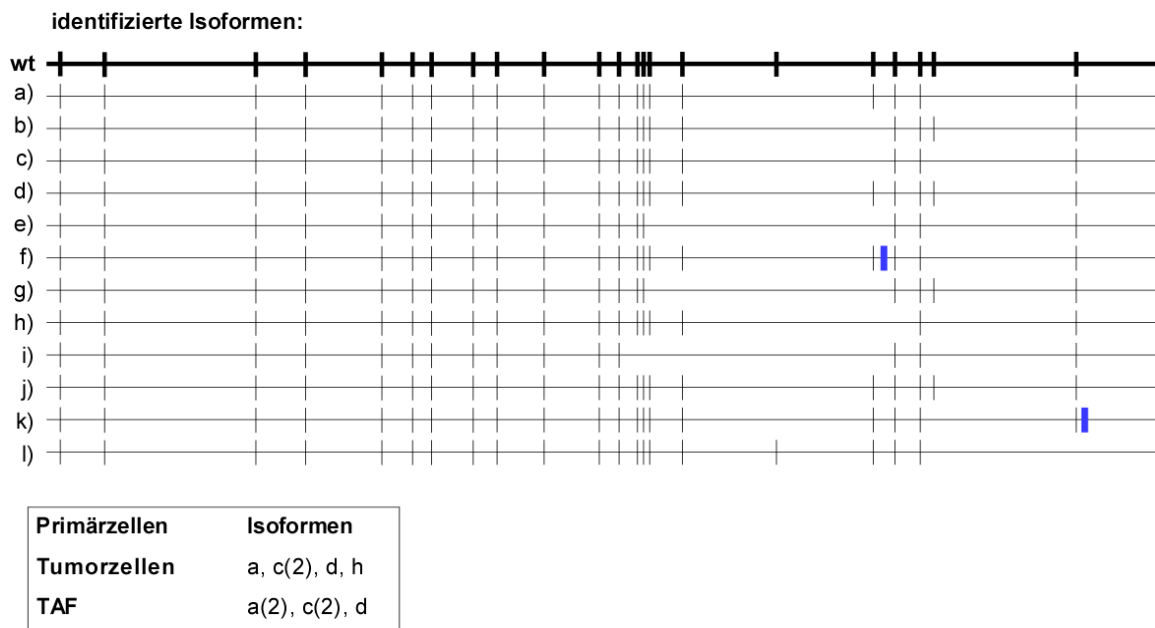


Abbildung 3.51: Untersuchung der OSF-2-Isoform-Expression primärer Tumorzellen und TAF. Die als Wildtyp publizierte Isoform Q15063-1 (UniProtKB/Swiss-Prot) (Takeshita et al. 1993) ist als Vergleichssequenz dargestellt. In den identifizierten Isoformen zusätzlich vorkommende Exons sind blau markiert. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.8.17 *In vivo*-Untersuchung der Tumorigenität und des Tumorzellwachstums CD133⁺-angereicherter Zellen

Neben der Tumorigenität der isolierten Zellen, wurden Tumorigenität und -wachstum CD133⁺-angereicherter StauMa-Zellen untersucht. CD133 ist ein Transmembran-Glykoprotein mit fünf die Membran durchdringenden Bereichen und zwei extrazellulären Schleifen. Es ist ein putativer Tumorstammzellmarker und findet Verwendung in der Anreicherung von Tumorstammzellen immundefizienter Mäuse (Burkert et al. 2006).

Die Tumorstammzelltheorie besagt, dass ein Tumor hierarchisch aufgebaut ist und nur ein kleiner Teil der Tumorzellpopulation dazu in der Lage ist, Tumorzellwachstum zu initiieren und aufrechtzuerhalten (Monroe et al.; Ailles & Prince 2009). Tumorstammzellen sind somit von enormer Bedeutung für die Tumorigenese. Bisher wurden aus verschiedenen Tumorentitäten wie Lunge (Chen et al. 2008), Bauchspeicheldrüse (Hermann et al. 2007), Leber (Ma et al. 2008), Prostata (Miki et al. 2007) und Kopf-Hals (Zhang et al. 2009) CD133-angereicherte Tumorstammzellen isoliert. Auch mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode der magnetischen Zellsortierung (MACS) der Firma Miltenyi konnten bereits (CD44⁺-)Tumorstammzellen aus einer Kopf-Hals-Tumorzelllinie isoliert werden (Okamoto et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden mit CD133-MACS-Microbeads-fraktionierte Tumorzellen (s. Kapitel 2.9.5) für Transplantationsexperimente verwendet. Nach subkutaner Injektion von 10⁶ CD133⁻- und 10⁶ CD133⁺-Zellen in die rechte und linke Flanke einer Thymus-negativen Nacktmaus wurde das Tumorzellwachstum über

mehrere Wochen beobachtet, und die Tumore nach Tötung des Versuchstieres sofort entnommen. Teile des CD133⁺-Tumors wurden zur Isolation von Zellen verwendet, Weitere in Formalin fixiert. Während des Xenograft-Versuchs konnte das Tumorwachstum des CD133⁺-Tumors bereits nach 12 Tagen, das Tumorwachstum des CD133⁻-Tumors erst nach 22 Tagen beobachtet werden. Dementsprechend hatte der CD133⁺-Tumor bei Tötung der Maus bereits ein Volumen von über 90 mm³ erreicht, während der CD133⁻-Tumor nur ein Volumen von etwa 13 mm³ erreichte. Der CD133⁻-Tumor war somit so klein, dass keine Zellen isoliert werden konnten und der komplette Tumor in Formalin fixiert wurde. Nach Injektion von 10³ und 10⁴ Tumorzellen, bei denen durch Anreicherung CD133⁺-Zellen der mögliche Tumorstammzellanteil erhöht wurde, konnte kein Tumorwachstum beobachtet werden (s. Abbildung 3.52, B). Der Versuch wurde nach 90 Tagen abgebrochen.

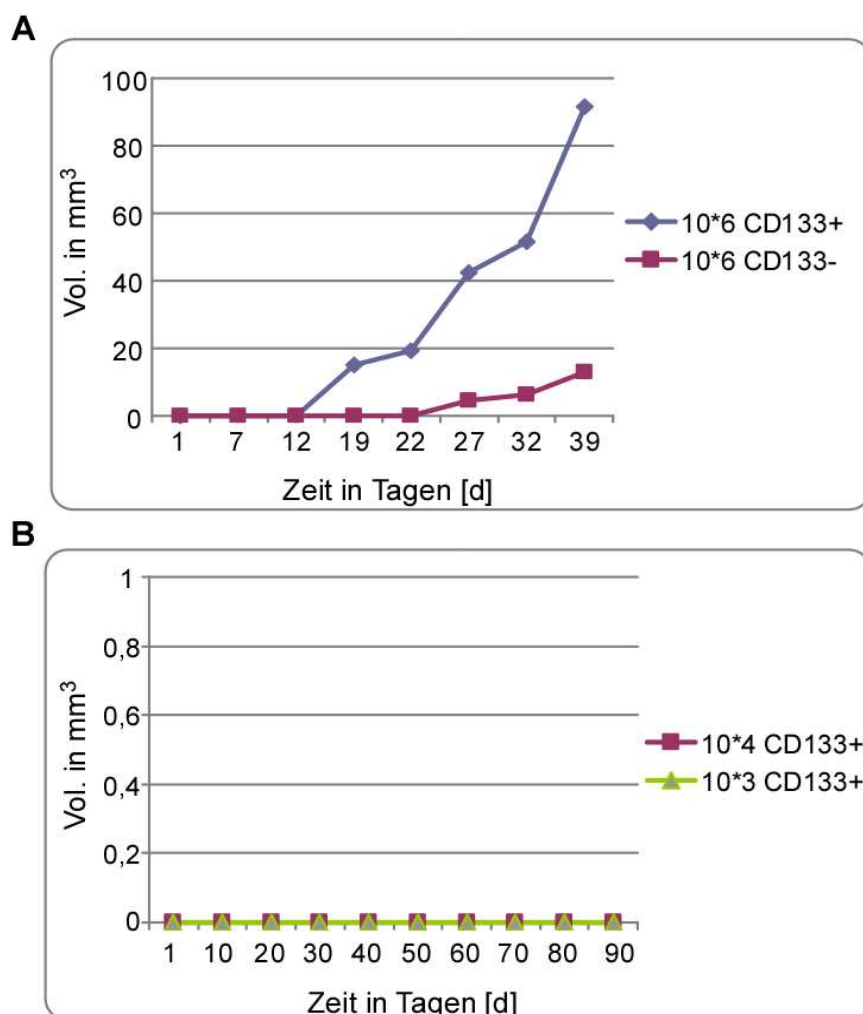


Abbildung 3.52: Untersuchung der Tumorigenität der CD133⁺- und CD133⁻-StauMa-Zellen in Thymus-negativen Nacktmäusen. Dargestellt ist das Tumolvolumen zu den jeweiligen Zeitpunkten sowie bei Versuchsende, nach Tötung der Maus. Es wurden 10⁶ CD133⁺- und CD133⁻- bzw. 10³ und 10⁴ CD133⁺-StauMa-Zellen subkutan in die rechte und linke Flanke injiziert. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Um Unterschiede in der CD133-Expression innerhalb der Tumore nachzuweisen, wurden immunhistochemische Färbungen des in Formalin fixierten Tumorgewebes durchgeführt (s. Kapitel 2.8). Hierbei konnten im CD133⁺-Tumor deutlich mehr CD133⁺-Zellen nachgewiesen werden, als im CD133⁻-Tumor (s. Abbildung 3.53).

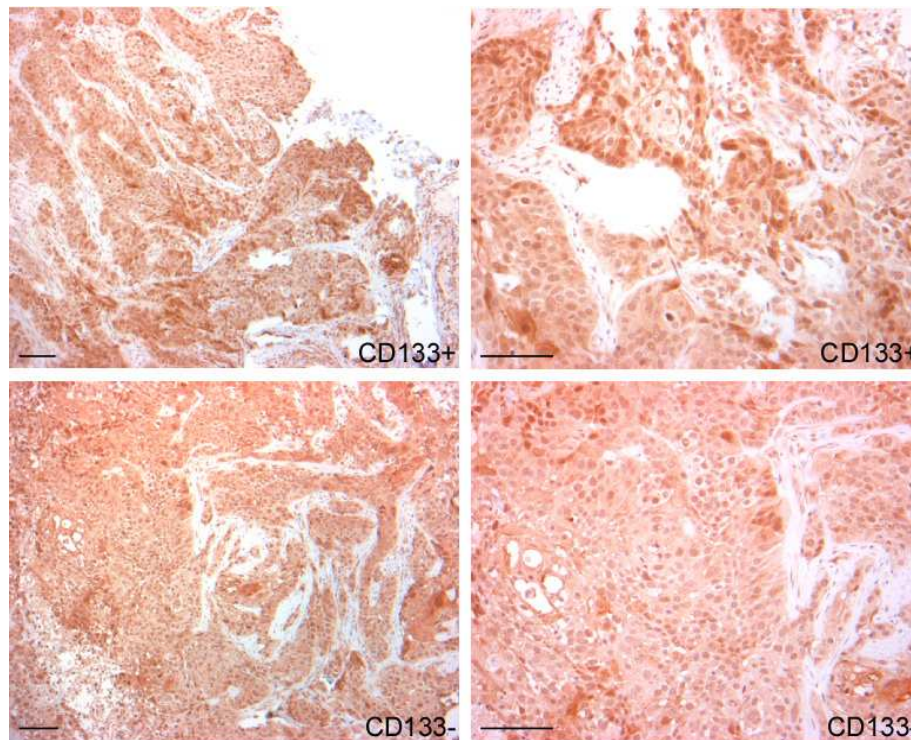


Abbildung 3.53: Nachweis der CD133-Expression in Xenografttumoren. Gezeigt sind je zwei repräsentative Teilbereiche der gefärbten Tumorschnitte. Im CD133⁺-Tumor konnten deutlich mehr CD133⁺-Zellen nachgewiesen werden als im CD133⁻-Tumor. Maßstabsbalken, 100 μ m.

Nach Isolation und Separation von Tumorzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten aus dem CD133⁺-Tumorgewebe wurden Fluoreszenzfärbungen mit dem epithelialen Marker EpCAM und dem Fibroblastenmarker Vimentin durchgeführt um die Reinheit der Zellpopulation zu überprüfen. Da die Tumor-assoziierten Fibroblasten nicht lange in Kultur gehalten werden konnten, war hier eine Immunfluoreszenzanalyse leider nicht möglich. Die Immunfluoreszenzaufnahmen der isolierten Tumorzellen zeigten eine positive EpCAM-Färbung, wohingegen die Vimentin-Färbung negativ verlief (s. Abbildung 3.54).

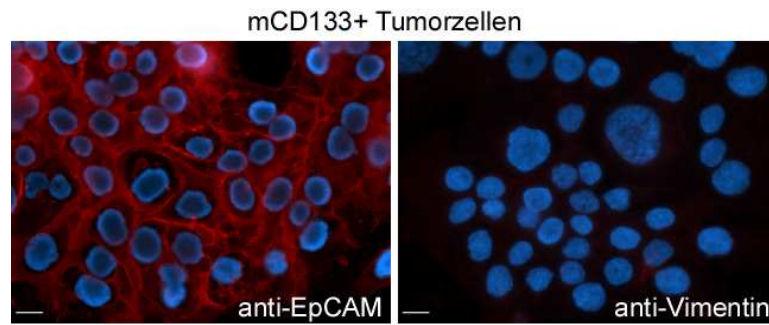


Abbildung 3.54: Immunfluoreszenzanalyse muriner Tumorzellen nach Isolation aus CD133-positivem Tumorgewebe. Erläuterungen s. Text. Maßstabsbalken, 10 µm.

3.8.18 OSF-2 RT PCR CD133-positiver Tumor and TAFs

Bei der Isolation der Tumor-assoziierten Fibroblasten aus CD133-positiven Xenografttumoren war es leider nicht möglich die Tumor-assoziierten Fibroblasten vollständig von den Tumorzellen zu separieren, weshalb keine RT-PCR durchgeführt werden konnte.

3.8.19 Virus-Screen

Der humane Papillomavirus (HPV), insbesondere der Subtyp HPV-16 wird mit etwa 30% der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen in Verbindung gebracht und ist vor allem mit Tumoren des Oropharynx assoziiert (Liebertz et al. 2010)). Für die isolierten, humanen Kopf-Hals-Tumorzellen konnte allerdings keine Infektion mit humanen Papillomaviren nachgewiesen werden (siehe Kapitel 2.5.23 und Abbildung 3.55). Als Positivkontrolle wurden die als HPV-positiv bekannten HeLa-Zellen verwendet.

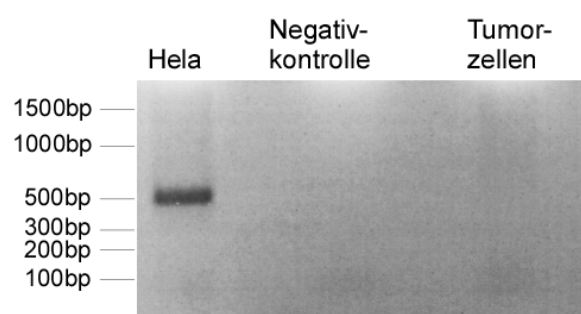


Abbildung 3.55. Analyse zum spezifischen Nachweis von Papillomaviren in humanen Tumorzellen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.9 Ausblick: Vermittlung der Zelladhäsion durch Implantat-Beschichtung mit rOSF-2

Die Beschichtung von Implantatmaterial mit rekombinanten Proteinen, die die Adhäsion körpereigener Zellen erhöhen und damit die Integration des Implantats in das Zielgewebe erleichtern, gewinnt in der regenerativen Medizin zunehmend an Bedeutung (Jenissen 2003; Liu et al. 2005; Schliephake et al. 2005). Aufgrund seiner adhäsiven Eigenschaften sollte OSF-2 daher auch im Hinblick auf dessen Verwendungsmöglichkeit in der regenerativen Medizin untersucht werden. Hier könnte OSF-2 die Biokompatibilität sowie die Biofunktionalität von Implantaten verbessern. In der vorliegenden Arbeit wurden in einem ersten Vorversuch Metallplättchen, die freundlicherweise von Herrn PD Dr. A. Hofmann (Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Mainz) zur Verfügung gestellt wurden, mit rekombinantem OSF-2-Protein beschichtet und mit humanen Zahnfleischfibroblasten besiedelt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung mit rOSF-2 im Vergleich zu unbeschichteten Plättchen eine verstärkte Adhäsion der Fibroblasten vermittelt (s. Abbildung 3.56). Die Auswertung des Assays wurde von Frau Dipl. Biol. Verena Fetz am Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader (Mainzer Screening Center) durchgeführt.

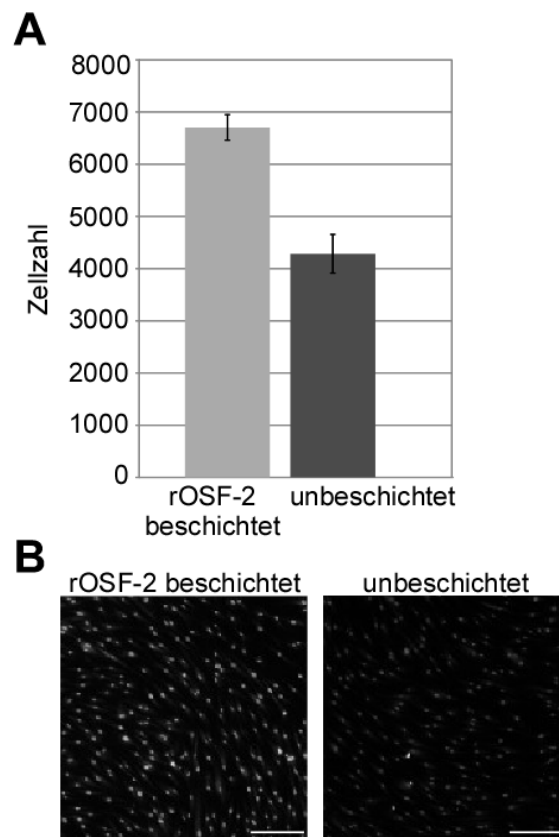


Abbildung 3.56: Verbesserung der Zelladhäsion durch Beschichtung von Metallplättchen mit rOSF-2. (A) Die Adhäsion von HGF-1-Zellen auf mit rOSF-2 beschichtete Metallplättchen ist im Vergleich zu

unbeschichteten Plättchen deutlich erhöht. (B) Dargestellt sind repräsentative Teilbereiche der Metallplättchen nach Besiedlung durch Fibroblasten. Maßstabsbalken, 100 µm.

4 Diskussion

Die funktionelle Rolle von OSF-2 in Krebserkrankungen wird momentan kontrovers diskutiert, da sowohl tumorfördernde (Bao et al. 2004; Shao et al. 2004; Tai et al. 2005; Yan & Shao 2006; Baril et al. 2007; Erkan et al. 2007) als auch tumorunterdrückende OSF-2-vermittelte Funktionen (Yoshioka et al. 2002; Kim et al. 2005; Kanno et al. 2008) dokumentiert werden konnten. Ziel dieser Arbeit war es, das in Kopf-Hals-Tumoren überexprimierte Protein OSF-2 molekularbiologisch zu charakterisieren und funktionell zu analysieren, um so dessen möglichen Nutzen als prognostischen/diagnostischen Biomarker oder als Ziel für neuartige Krebstherapien zu untersuchen.

Tumore bestehen jedoch nicht nur aus neoplastischen Tumor-, sondern auch aus nicht-neoplastischen Stromazellen, zu denen Fibroblasten, Tumor-assoziierte Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten und inflammatorische Zellen gehören (De Wever & Mareel 2003). Tumor-assoziierte Fibroblasten stellen hierbei den zellulären Hauptanteil des Tumorstromas dar und spielen eine wichtige Rolle bei der Tumoringitiation, -progression und -metastasierung (Xouri & Christian 2009). Da derzeit noch kontrovers diskutiert wird, ob das Sekretionsprotein OSF-2 von Tumorzellen oder Zellen des Tumorstromas gebildet wird (Bao et al. 2004; Fukushima et al. 2008; Utispan et al.; Choi et al. 2011), wurden in dieser Arbeit primäre Tumorzellen und Tumor-assoziierte Fibroblasten aus humanen Kopf-Hals-Tumoren isoliert und im Hinblick auf ihre OSF-2-Expression analysiert. Darüberhinaus wurden mit beiden Zelltypen Genexpressionsanalysen durchgeführt, da noch wenig bekannt ist, wie Veränderungen der stromalen Genexpression die Tumorprogression beeinflussen. Genexpressionsprofile ermöglichen die Charakterisierung und Klassifizierung von Tumoren (Sorlie et al. 2001) bzw. definierter Zelltypen innerhalb eines Tumors (Singer et al. 2008) und sind besonders gut geeignet, um komplexe Wechselwirkungen wie Tumor-Stroma-Interaktionen zu analysieren.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen humanen Tumorgewebes war es möglich eine neue Tumorzelllinie des frontalen Sinus zu etablieren. Arbeiten mit Primärzellen und jungen Tumorzelllinien sind in der Tumorbilogie von großer Bedeutung, da diese eine Brücke zwischen artifiziellen *in vitro*-Experimenten mit Zelllinien und *in vivo*-Tierversuchen bilden und die komplexen Bedingungen im Organismus besser widerspiegeln als Zelllinien. Die in dieser Arbeit verwendeten primären Zellen wurden daher über ihre OSF-2-Expression hinaus untersucht und charakterisiert.

4.1 OSF-2 - Expression

Eine erhöhte OSF-2-Expression von Tumorgewebe versus korrespondierendem Normalgewebe konnte mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. In 5 von 6 Proben konnte hierbei eine starke OSF-2-Expression im Tumorgewebe gezeigt werden (s. Abbildung 3.1). Dies entspricht den Ergebnissen der zuvor durchgeführten Microarray-Experimente, bei denen

ebenfalls eine erhöhte Expression von OSF-2 im Tumorgewebe festgestellt wurde. Die Expression von OSF-2 im Normalgewebe reicht von nicht-exprimiert bis sehr stark exprimiert, wobei die hohe Variabilität in der OSF-2-Expression auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte (Tilman et al. 2007). Die Überexpression von OSF-2 im Kopf-Hals-Tumorgewebe entspricht einem Großteil bislang veröffentlichter Daten. Bisher konnte in verschiedensten Tumorentitäten wie Ovarialkarzinomen, Darm-, Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs, eine Überexpression von OSF-2 gezeigt werden (Ismail et al. 2000; Bao et al. 2004; Shao et al. 2004; Baril et al. 2007; Erkan et al. 2007). Auch für Kopf-Hals-Tumore war eine Überexpression von OSF-2 nachzuweisen (Gonzalez et al. 2003; Kudo et al. 2006). Im Gegensatz hierzu wurde in Blasen- und Lungenkrebs jedoch eine Herabregulation von OSF-2 festgestellt (Yoshioka et al. 2002; Kim et al. 2005). Die OSF-2-Überexpression folgt scheinbar keiner nachvollziehbaren Regelmäßigkeit.

Tumore bestehen jedoch nicht nur aus Tumor- sondern auch aus Stromazellen, zu denen Fibroblasten, Tumor-assoziierte Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten und inflammatorische Zellen gehören (De Wever & Mareel 2003). Stromazellen spielen eine wichtige Rolle in der Krebsprogression und Metastasierung (De Wever & Mareel 2003; Bhowmick et al. 2004; Desmouliere et al. 2004; Orimo & Weinberg 2006) und können die Tumorgenese, Angiogenese und Invasierung (Choi et al. 2011) u.a. durch Sekretion von Wachstumsfaktoren, Proteasen, Chemokinen und angiogenen Faktoren (Li et al. 2007) stimulieren. Da bislang kontrovers diskutiert wurde, ob OSF-2 in Tumorzellen oder im Tumorstroma gebildet wird, und die Western-Blot-Analyse keinerlei Aussage über den OSF-2-exprimierenden Zelltyp gibt, wurden zusätzlich immunhistochemische Analysen von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Schnitten durchgeführt (s. Abbildung 3.2). Hier konnte OSF-2 bei einigen Proben in Tumorzellen, bei anderen hingegen im Tumorstroma detektiert werden. Auch innerhalb eines Zelltyps variierte das Expressionslevel sehr stark. Teilweise war selbst in benachbarten Tumorzellen eine sehr schwache respektive eine äußerst starke Expression nachweisbar (s. Abbildung 3.2 A und B). Hierbei ist nicht nur der Grund für die unterschiedlich starke Färbung der Zellen unklar, sondern auch, ob die OSF-2-Detektion in der endogenen Expression oder aber in der Aufnahme extrinsischen, also sekretierten, OSF-2-Proteins begründet ist. Aufgrund der guten Qualität der Immunfärbung sind methodische Aspekte als Grund hierfür auszuschließen. Besonders auffallend an den immunhistochemischen Färbungen war das starke Vorhandensein von OSF-2 im Interzellularraum (s. Abbildung 3.2 B). Diese stellte einen ersten Hinweis auf die Sekretion des Proteins dar, welche in dieser Arbeit auch biochemisch belegt wurde (s. Kapitel 3.2.2-3.2.4). In der Literatur wird von einigen Gruppen eine OSF-2-Expression im Tumorstroma postuliert (Erkan et al. 2007; (Sasaki et al. 2001); (Sasaki et al. 2003); (Sasaki et al. 2001), andere konnten hingegen mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungsversuchen OSF-2-mRNA im Zytoplasma von Tumorzellen nachweisen, und postulieren eine Expression in Tumorzellen (Shao et al. 2004; Baril et al. 2007). Als Grund für die hohe Variabilität der OSF-2-Expression innerhalb einer Tumorentität wird der unterschiedliche Anteil an Fibroblasten und damit die unterschiedliche

Anzahl OSF-2-exprimierender Zellen innerhalb des Tumors diskutiert (Tilman et al. 2007). Bei im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen humanen Kopf-Hals-Tumorgewebes konnte sowohl in Tumorzellen als auch in Tumor-assoziierten Fibroblasten eine OSF-2-Expression nachgewiesen werden (s. Kapitel 3.8.9-11), wobei gezeigt werden konnte, dass Tumor-assoziierte Fibroblasten deutlich mehr OSF-2 exprimieren als Tumorzellen (Faktor 21,13). Die OSF-2-Expression scheint sich also nicht auf einzelne Zelltypen zu beschränken. Entgegen der in der Literatur postulierten OSF-2-Expression in Tumor- oder Stromazellen konnte somit gezeigt werden, dass beide Zelltypen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, an der Expression beteiligt sind.

Die endogene OSF-2-Expression in Zelllinien wurde bislang ebenfalls äußerst kontrovers diskutiert. Im Gegensatz zum niedrigen OSF-2-Expressionslevel welches verschiedene Gruppen für Tumorzelllinien propagieren (Ismail et al. 2000; Yoshioka et al. 2002; Gonzalez et al. 2003; Kim et al. 2005; Tai et al. 2005), konnte in anderen Fällen eine OSF-2-Expression in Zelllinien nachgewiesen werden (Tai et al. 2005; Tilman et al. 2007; Puppini et al. 2008). Ein niedriges OSF-2-Expressionslevel in Tumorzelllinien wird häufig dazu herangezogen, um die Theorie zu stützen, dass OSF-2 im Tumor nicht von Tumor- sondern von Stromazellen produziert wird. Expressionsunterschiede zwischen einzelnen Tumorentitäten würden sich dann darauf zurückführen lassen, dass die Tumore unterschiedliche Mengen Stromazellen enthalten (Sasaki et al. 2001; Sasaki et al. 2001; Sasaki et al. 2003). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die geringe OSF-2-Expression in Zelllinien wäre, dass die in Kultur gehaltenen Zellen transformiert sind und keine zusätzlichen Wachstumsstimuli benötigen. OSF-2 würde von diesen Zellen also nicht mehr zur Aktivierung von Zellwachstum und -proliferation benötigt und deshalb herabreguliert. Für einige OSF-2-negative Zelllinien konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die OSF-2-Expression nach Injektion in Nacktmäuse, nach der sich die Zellen in einer relativ nährstoffarmen Umgebung befinden, hochreguliert wird (Gillan et al. 2002; Bao et al. 2004; Kim et al. 2005; Tai et al. 2005).

In dieser Arbeit konnte nicht nur auf mRNA-, sondern auch auf Proteinebene in verschiedensten Zelllinien eine OSF-2-Expression gezeigt werden (s. Kapitel 3.1). Ein Nachweis war sowohl in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzelllinien als auch in einer Pankreaskarzinom-, einer Osteoblasten-, einer humanen Hämangiosarkomlinie sowie humanen vaskulären glatten Muskelzellen möglich (s. Abbildung 3.3). Da aber auch OSF-2-negative Zelllinien der gleichen Tumorentitäten detektiert wurden, wäre es möglich, dass die Expression nicht organ- sondern zelllinienspezifisch ist.

Auch im Normalgewebe mit Ursprung in unterschiedlichen Organen ist OSF-2 exprimiert (Kruzynska-Frejtag et al. 2001; Gillan et al. 2002; Kruzynska-Frejtag et al. 2004; Tai et al. 2005), wobei dies in fötalem Gewebe scheinbar stärker ausgeprägt ist (Kruzynska-Frejtag et al. 2001; Gillan et al. 2002). Diese ubiquitäre Expression kann sicherlich als ersten Hinweis auf eine recht allgemeine Proteinfunktion gewertet werden. In Übereinstimmung zu der von Gillan und Kollegen

gezeigten Tendenz zu erhöhter OSF-2-Expression in fötalem Gewebe (Gillan et al. 2002), konnte in der vorliegenden Arbeit eine hohe OSF-2-Expression in Osteoblasten der humanen embryonalen Wachstumsfuge gezeigt werden (s. Abbildung 3.8). Auch in Osteoblastenscaffolds konnte eine hohe OSF-2-Expression gezeigt werden (s. Abbildung 3.6). Osteoblastenscaffolds sind dreidimensionalen Konstrukte, die nach Zellentnahme und *in vitro*-Expansion, als bioartifizielle Regenerate in die Zielregion eines Organismus rückimplantiert werden. Da die Konstrukte autologes Zellmaterial enthalten, werden "Tissue Engineering"-Implantate normalerweise vom Immunsystem als körpereigen erkannt und nicht abgestoßen. OSF-2 könnte in bioartifiziellen "Tissue Engineering"-Implantaten die Adhäsivität sowie das Überleben der umliegenden Zellen erhöhen und die Integration des Implantats in das betreffende Gewebe verbessern.

4.2 OSF-2 - Lokalisation

OSF-2 ist ein 93 kDa-Protein, für das mittels SignalP-Analyse ein 21 Aminosäure langes N-terminales Sekretionssignal vorhergesagt werden kann (s. Abbildung 3.12). Nach Transfektion des OSF-2-Volllänge Proteins in verschiedene Tumorzelllinien konnte eine zytoplasmatisch-granuläre Lokalisation beobachtet werden (s. Abbildung 3.9), die der Lokalisation anderer sekretorischer Proteine (Robertson et al. 2003; Durvasula & Shankland 2005; Lonka-Nevalaita et al. 2010) entspricht. Immunfluoreszenzfärbungen OSF-2-GFP-transfizierter Zellen bestätigten die zytoplasmatisch-granuläre Lokalisation und dienten dem Nachweis der Antikörperspezifität (s. Abbildung 3.10). Auffällig war hier das vermehrte Vorhandensein der Granulae an der Plasmamembran, welche ein Indiz für die Sekretion des Proteins darstellten. Auch konnte über die Immunfluoreszenzfärbung nach Transfektion eines unfusionierten OSF-2-Konstruktes eine zytoplasmatisch-granuläre Proteinlokalisierung nachgewiesen werden, so dass durch Fusion mit GFP möglicherweise hervorgerufene Effekte auf die Lokalisation von OSF-2 ausgeschlossen werden konnten (s. Abbildung 3.11). Um die Funktionalität des Sekretionssignals zu überprüfen, wurde eine OSF-2-Mutante ohne Sekretionssignal kloniert und in verschiedene Tumorzelllinien transfiziert (s. Abbildung 3.13). Die beobachtete Proteinlokalisierung war hier ebenfalls zytoplasmatisch, allerdings konnten keine granulären Strukturen beobachtet werden, was einen Hinweis auf die nicht-stattfindende Proteinsekretion darstellte. Nach Transfektion des an GFP fusionierten Sekretionssignals konnte die gleiche Proteinlokalisierung wie nach Transfektion von OSF-2-wt beobachtet werden (s. Abbildung 3.14), wobei die zytoplasmatischen Granulae stark fluoreszierten. Da sich die Fusion an andere Proteine auf die GFP-Faltung auswirken kann und sich das Sekretionssignal und OSF-2-wt deutlich in ihrer Größe unterscheiden, könnten sich die Unterschiede in der Fluoreszenz der GFP-Fusionsproteine auf den jeweiligen Fusionspartner zurückführen lassen (Sacchetti & Alberti 1999; Evanko 2006). Die durch das N-terminale Sekretionssignal verursachte Proteinsekretion bzw. die Inhibition der Proteinsekretion durch Deletion des Sekretionssignals, konnte somit durch transiente Transfektion verschiedener OSF-2-Konstrukte morphologisch nachgewiesen werden.

Der biochemische Nachweis der Sekretion erfolgte mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung OSF-2-wt-GFP- und OSF-2 Δ Sek-GFP-transfizierter Zellen. Hier konnte im Gegensatz zu OSF-2-wt-GFP-transfizierten Zellen im Überstand der OSF-2 Δ Sek-GFP-transfizierten Zellen kein OSF-2 nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.16).

Bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation von OSF-2-wt-GFP und OSF-2 Δ Sek-GFP konnten beide Proteine wie erwartet in der Zytoplasmafraktion, nicht jedoch in der nukleären Fraktion nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.19). Beide Proteine waren zudem in der Zytoskelett-Fraktion zu finden. Interessanterweise war in der Membran-Fraktion nur OSF-2-wt-GFP detektierbar. Eine Assoziation der Sekretionsmutante mit Sekretionsvesikeln oder der Plasmamembran kam offenbar nicht zustande. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Sekretion des Proteins ausschließlich vom Vorhandensein des N-terminalen Sekretionssignals abhängig ist. In der Literatur wird die OSF-2-Lokalisation zumeist zytoplasmatisch (Tai et al. 2005; Li et al. 2006; Riener et al. 2009; Schramm et al. 2009), selten nukleär (Puglisi et al. 2008; Jackson-Boeters et al. 2009) oder zytoplasmatisch-nukleär (Yoshioka et al. 2002) beschrieben.

Da noch unklar ist, über welche Domänen die OSF-2-Funktion vermittelt wird, wurden Deletionskonstrukte mit einer unterschiedlichen Anzahl funktioneller Domänen generiert. Die Transfektion ergab wie erwartet für alle Konstrukte eine zytoplasmatisch-granuläre Lokalisation wobei OSF-2-EMI-GFP auch im Nukleus lokalisiert, was möglicherweise auf Diffusionseffekte aufgrund seiner geringen Größe von ~37kDa zurückzuführen ist (s. Abbildung 3.18).

4.3 OSF-2 - Multimerisierung

Viele Proteinfunktionen werden über Interaktionen oder Multimerisierung vermittelt. Die Detektion von OSF-2-Banden multipler Größe im Western-Blot führte zu der Vermutung, dass OSF-2 möglicherweise dazu in der Lage ist Dimere bzw. Multimere zu bilden (Gillan et al. 2002; Baril et al. 2007; Norris et al. 2007). Die Stabilität des propagierten 170 kDa-Multimers unter reduzierenden Bedingungen schließt allerdings eine Beteiligung von Disulfidbrücken aus (Gillan et al. 2002).

Um eine Dimerisierung biochemisch nachzuweisen, wurde eine Immunpräzipitation mit OSF-2-GFP- und OSF-2-Stop-kotransfizierten Zellen unter Verwendung von anti-GFP-Beads durchgeführt (s. Abbildung 3.20). Im Falle einer Dimerisierung würden eine OSF-2-GFP Bande sowie eine OSF-2-Stop-Bande erwartet, andernfalls würde nur eine OSF-2-GFP-Bande erwartet. Im Western-Blot konnten unter Verwendung des anti-OSF-2-Antikörpers drei Banden im Eluat detektiert werden. Die dritte Bande könnte hier aufgrund von Degradationsprozessen entstanden sein (Landgraf et al. 2008), was v.a. bei einem Protein der vorliegenden Größe nahe liegt. Die Detektion einer einzigen Bande im Input deutet allerdings eher darauf hin, dass OSF-2 nicht dimerisiert und zwei der drei Banden aufgrund von Degradationsprozessen entstanden sind.

Nach Inkubation der Blot-Membran mit anti-GFP-Antikörper erhält man eine OSF-2-GFP-Bande, sowie eine schwache Bande auf Höhe ungetagten OSF-2-Proteins, die sich wahrscheinlich auf unvollständiges "strippen" der Western-Blot Membran zurückführen lässt. In der Negativkontrolle,

in der OSF-2-Stop- und GFP- kotransfizierte Zellen verwendet wurden, konnte ausschließlich eine GFP Bande bei ~30 kDa detektiert werden, womit die Spezifität der Immunpräzipitation gezeigt werden konnte. Bei Verwendung des anti-OSF-2-Antikörpers konnten erwartungsgemäß keine Banden detektiert werden. Aufgrund der nicht ganz eindeutigen Ergebnisse der Ko-Immunpräzipitation muss diese unter Verwendung anderer Protein-Tags wiederholt, und/oder in weiterführenden Experimenten wie dem Yeast-Two-Hybrid-Screening oder dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) die Dimerisierung von OSF-2 nachgewiesen werden. Hierbei könnte die Verwendung der OSF-2-Deletionskonstrukte die Identifizierung der möglichen Interaktionsdomänen sehr erleichtern.

4.4 OSF-2 - Isoformen

OSF-2 wurde ursprünglich als Adhäsionsmolekül aus einer murinen Osteoblastenzelllinie isoliert (Takeshita et al. 1993). Mit einer murinen cDNA als Sonde, konnten humane Plazenta- und Osteosarkoma-cDNA-Bibliotheken gescreent, und verschiedene OSF-2-Klone sequenziert werden. Die so identifizierten 5 humanen OSF-2-Isoformen unterschieden sich nur in ihrem C-Terminus durch verschiedene "in-frame"-Insertionen und Deletionen. Daher war zu vermuten, dass diese Isoformen durch alternatives Spleißen entstanden waren (Takeshita et al. 1993). Horiuchi und Kollegen konnten vier murine OSF-2-Isoformen nachweisen, die sich ebenfalls innerhalb ihres C-terminalen Bereichs unterschieden. Auch hier wurden alternative Spleißprozesse postuliert. Auf mRNA-Ebene konnte zudem die unterschiedliche Expression der murinen Isoformen in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden (Horiuchi et al. 1999). Auch konnte eine zusätzliche murine OSF-2-Isoform identifiziert werden, welche entwicklungspezifisch reguliert wird (Litvin et al. 2004). Darüber hinaus scheint die Expression verschiedener muriner OSF2-Isoformen nach einem akuten Herzinfarkt zeitlich bedingt zu sein (Shimazaki et al. 2008).

Wie sich die einzelnen humanen OSF-2-Isoformen in ihrer Funktion unterscheiden ist derzeit noch nicht bekannt. Das Vorhandensein verschiedener Spleißvarianten mit unterschiedlichen Funktionen könnte jedoch die zum Teil sehr kontroversen Ergebnisse bezüglich der OSF-2-Funktion innerhalb des Tumorgewebes zumindest ansatzweise erklären. So könnte OSF-2 beispielsweise je nach Exonzusammensetzung und Vorhandensein funktioneller Domänen als Tumorsuppressor oder -aktivator wirken.

In dieser Arbeit wurde die gewebespezifische Expression humaner OSF-2-Isoformen untersucht, indem RNA aus Tumor-, Metastasen- und Normalgewebe des gleichen Patienten isoliert und der C-terminale OSF-2-Bereich sequenziert wurde. Hierbei konnten 12 humane OSF-2-Isoformen identifiziert werden. Beim Vergleich der OSF-2-Sequenzen konnte jedoch keine gewebespezifische OSF-2-Isoform-Expression nachgewiesen werden. Auch von der Art der Zelllinie scheint das Vorhandensein verschiedener OSF-2-Spleißvarianten unabhängig zu sein. Beim Vergleich primärer Tumorzellen und Tumor-assoziiertes Fibroblasten konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Isoform-Expression festgestellt werden. Interessanterweise konnte die

als Wildtyp publizierte OSF-2-Sequenz Q15063-1 (UniProtKB/Swiss-Prot) weder im humanen Gewebe noch in den untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Dies lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass es sich bei der OSF-2-wt-Sequenz nicht um die am häufigsten vorzufindende, sondern um die erstbeschriebene OSF-2-Sequenz handelt. Die Ergebnisse bezüglich der OSF-2-Isoform-Expression in unterschiedlichen Geweben, Zelllinien und Zelltypen lassen auf keine spezifische Funktion bestimmter Spleißvarianten bzw. bestimmter Expressionsmuster schließen (s. Abbildung 3.22). Eine potentielle funktionelle Zuordnung einzelner Isoformen bleibt somit abzuwarten.

Für die funktionelle Charakterisierung der Isoformen wäre es allerdings von Vorteil, wenn die einzelnen Arbeitsgruppen die OSF-2-Isoformen, mit denen sie arbeiten, identifizieren und zusammen mit ihren Ergebnissen veröffentlichen würden. Eine Heterogenität der Ergebnisse aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Isoformen könnte somit ausgeschlossen werden. Die "in-frame"-Insertionen und Deletionen der detektierten Isoformen weisen, wie in der Literatur beschrieben (Takeshita et al. 1993; Horiuchi et al. 1999), auf alternative Spleißmechanismen hin.

4.5 Funktionelle Charakterisierung

Die funktionelle Rolle von OSF-2 in Krebserkrankungen wird momentan kontrovers diskutiert, da sowohl tumorfördernde (Bao et al. 2004; Shao et al. 2004; Tai et al. 2005; Yan & Shao 2006; Baril et al. 2007; Erkan et al. 2007) als auch tumorunterdrückende OSF-2-vermittelte Funktionen (Yoshioka et al. 2002; Kim et al. 2005; Kanno et al. 2008) dokumentiert werden konnten.

Krebs ist eine Erkrankung deregulierten Zellwachstums. Tumorzellen besitzen, einer Theorie Hanahan und Weinberg zufolge, ein unlimitiertes Replikationspotential, sind unabhängig von Wachstumsfaktoren, sowie unempfindlich gegenüber Wachstumsinhibitoren. Desweiteren verfügen sie über die Fähigkeit zur Invasierung und Metastasierung, zur dauerhaften Angiogenese sowie zur Evasion der Apoptose (Hanahan & Weinberg 2000). Um zu überprüfen, ob OSF-2 zur Entwicklung dieser charakteristischen Eigenschaften der Tumorzellen beitragen könnte, wurden verschiedene funktionelle Assays durchgeführt. Hierbei wurden u.a. Zellproliferation, -migration, -adhäsion, sowie das Überleben der Zellen unter Stressbedingungen getestet.

So konnte gezeigt werden, dass die exogene Zugabe rekombinanten Proteins in einer Konzentration von 100 ng/ml, die Proliferation von Kopf-Hals-Tumorzellen nicht beeinflusst (s. Abbildung 3.23), wohingegen die gleiche Menge rOSF-2 die Migration dieser Zellen deutlich verstärkt (s. Abbildung 3.24). In der Literatur konnte übereinstimmend hierzu nachgewiesen werden, dass die Überexpression von OSF-2 in HNSCC-Zellen (Kudo et al. 2006) wie auch in einer Blasenkarzinomzelllinie (Kim et al. 2005) keinen Einfluß auf die Zellproliferation hat. Im Gegensatz hierzu konnte die Zugabe von rOSF-2 die Proliferation einer Darmkrebszelllinie *in vitro* konzentrationsabhängig verstärken. Die verwendete Menge rOSF-2 lag hier mit bis zu 20 µg/ml allerdings vergleichsweise hoch (Tai et al. 2005).

Zellmigration ist ein Prozess, der nicht nur für die Embryonalentwicklung, Wundheilungsprozesse und verschiedene Immunfunktionen bedeutsam ist (Ridley et al. 2003), sondern auch eine wichtige Rolle in der Tumorangio-genese und Metastasierung spielt (Hood & Cheresch 2002). Die Migrationsgeschwindigkeit von Zellen kann durch verschiedene Umweltfaktoren moduliert werden. Wachstumsfaktoren und Chemokine können beispielsweise über Aktivierung von PI3K, RAC und Rho eine promigratorische Signaltransduktion induzieren (Friedl & Wolf 2003). Gillan und Kollegen konnten zeigen, dass die Migration ovarialer Tumorzellen verstärkt wird, wenn sie auf mit rOSF-2-beschichteten Kulturschalen ausgesät werden (Gillan et al. 2002), während die Gruppe um Lindner nachweisen konnte, dass eine Überexpression von OSF-2 die Zellmigration in mesenchymalen Zellen erhöht (Lindner et al. 2005). Auch ein biphasischer Effekt auf die Migration von Pankreaskarzinomzellen konnte gezeigt werden. Während OSF-2 in hohen Konzentrationen (1 µg rOSF-2/ml) die Zellmigration stimulierte, inhibierte es in niedrigen Konzentrationen (150 ng rOSF-2/ml) die Migration der Pankreaskarzinomzellen (Kanno et al. 2008). Obwohl die in dieser Arbeit verwendete rOSF-2-Konzentration mit 100 ng/ml unter der von Kanno verwendeten Konzentration lag, konnte ein migrationsfördernder Effekt beobachtet werden (s. Abbildung 3.24).

Um unter den in Tumorgewebe vorherrschenden Bedingungen, Sauerstoff- und Nährstoffmangel, überleben zu können, müssen Tumorzellen eine hohe Stressresistenz aufweisen. Die Inkubation mit rOSF-2 (100 ng/ml)-enthaltendem Medium verbesserte das Überleben von Tumorzellen unter Stressbedingungen wie Serumentzug deutlich (s. Abbildung 3.25). Baril und Kollegen konnten in Übereinstimmung hierzu zeigen, dass die Inkubation mit rOSF-2 das Überleben einer Pankreaskarzinomzelllinie unter hypoxischen Bedingungen erhöht (Baril et al. 2007). Auch das Überleben einer Darmkrebszelllinie wurde durch OSF-2-Überexpression unter Stressbedingungen wie Serumentzug oder Hypoxie positiv beeinflusst. Dies traf ebenso auf das Überleben endothelialer Zellen unter Stressbedingungen zu (Bao et al. 2004). Die unter Verwendung von HNSCC-Zellen erhaltenen Ergebnisse stehen daher in Einklang mit einem Großteil bisher veröffentlichter Daten in anderen Tumorentitäten.

Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass OSF-2 die Adhäsion verschiedener (Tumor-) Zellen verstärkt (Horiuchi et al. 1999; Gillan et al. 2002; Kudo et al. 2006; Choi et al. 2011). Der gegenläufige Prozess, die Ablösung der Tumorzellen vom Substrat *in vitro*, bzw. von der Extrazellulärmatrix *in vivo*, wird als initiales Ereignis des Metastasierungsprozesses betrachtet (Weiss & Ward 1983; Kharraishvili et al. 2011). Hierbei spielen Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Proteasen eine wichtige Rolle (Hanahan & Weinberg 2000). Auch wenn über die Rolle von OSF-2 im Ablösungs-Prozeß bisher noch wenig bekannt ist, gibt es in der Literatur Hinweise auf eine Funktion von OSF-2 in der Metastasierung (Bao et al. 2004; Kudo et al. 2006; Yan & Shao 2006). So konnten Yan und Kollegen zeigen, dass OSF-2 zur epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), und damit zu einer verstärkten Metastasierung tumorigener, nicht-metastatischer 293T Zellen beiträgt (Yan & Shao 2006). Kudo und Kollegen konnten ebenfalls eine invasionsfördernde Wirkung durch OSF-2 nachweisen (Kudo et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit waren allerdings zwischen OSF-2-GFP-, OSF-2 Δ Sek-GFP- und GFP-exprimierenden Zellen keine Unterschiede in der Zellablösung vom Substrat feststellbar (s. Abbildung 3.26). Falls OSF-2 die Metastasierung von Kopf-Hals-Tumoren beeinflusst, muss seine Funktion folglich dem initialen "detachment"-Prozess nachgeschaltet sein.

Als EMT bezeichnet man den Übergang von Zellen mit epithelialen Eigenschaften in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften. Meist wird die Epithelial-Mesenchymale-Transition mit dem Erwerb metastatischen Potentials gleichgesetzt (Yan & Shao 2006). Erreicht ein Tumor das invasive Stadium, so verlieren die Epithelzellen ihre Polarität und lösen ihre Zell-Zell-Kontakte, so dass sie die Basalmembran passieren können. Sind sie in ihrer Zielregion angekommen, können die Zellen adhären und wieder zu Epithelzellen differenzieren. Die Zellen besitzen somit kurzzeitig mesenchymale Eigenschaften charakterisiert durch eine spindelförmige Morphologie und eine erhöhte Motilität (Cui et al. 1996; Putz et al. 1999; Janda et al. 2002). Auf molekularer Ebene kommt es zu Veränderungen der Expression, Verteilung und/oder Funktion von Proteinen wie Vimentin (Kiemer et al. 2001; Savagner 2001), Integrinen (Maschler et al. 2005), Matrixmetalloproteinasen (Kupferman et al. 2000; Lakka et al. 2004) und Cadherinen (Hazan et al. 2000). Yan und Kollegen konnten zeigen, dass OSF-2 zur EMT und damit zum Metastasierungspotential tumorigener, nicht-metastasierender 293T Zellen beiträgt (Yan & Shao 2006). OSF-2 überexprimierende 293T-Zellen zeigten u.a. eine veränderte Morphologie, eine verstärkte MMP-9-Aktivität und exprimierten EMT-relevante Gene wie Vimentin und Fibronektin (Yan & Shao 2006). Auch am Bauchspeicheldrüsenkarzinom konnte gezeigt werden, dass die Expression von OSF-2 die Morphologie der Tumorzellen verändert und eine epithelial-mesenchymale Transition verursacht. Diese führte zu einer verringerten Tumorbildung, verhinderte die Metastasierung *in vivo* und verursachte *in vitro* eine verminderte Migrationsfähigkeit (Kanno et al. 2008). Andererseits erhöhte eine hohe Konzentration des rekombinanten Proteins (1 μ g/ml) die Migrationsfähigkeit der Zellen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass weder die Überexpression von OSF-2-GFP, noch die Inkubation mit rOSF-2 einen Einfluß auf die epithelial-mesenchymale Transition von Kopf-Hals-Tumorzellen bzw. von Zervixkarzinomzellen hat (s. Abbildung 3.31). Hierbei wurde allerdings nur eine Konzentration rekombinanten Proteins (100 ng/ml) verwendet. Unterschiede zu bereits veröffentlichten Ergebnissen bezüglich des Einflusses von OSF-2 auf die EMT könnten sich möglicherweise auf die verwendete Zelllinie und/oder die verwendete Konzentration rekombinanten Proteins (100 ng/ml) zurückführen lassen.

Zelllinien stellen als *in vitro*-Modelle wichtige Hilfsmittel bei zell- und molekularbiologischen Untersuchungen dar. Sie ermöglichen auch zeitlich ausgedehnte Studien und stehen dem Anwender jederzeit nahezu unverändert zur Verfügung. Da sich die hier erhaltenen Ergebnisse aufgrund komplexer *in vivo*-Wechselwirkungen jedoch nicht einfach auf einen Organismus übertragen lassen, können Arbeiten mit Zelllinien Untersuchungen *in vivo* nicht vollständig ersetzen. Gerade im Hinblick auf Proteine mit noch unbekannter Funktion wie OSF-2 sind

in vivo-Versuche von enormer Bedeutung, da hier auch Effekte auf andere Zelltypen wie beispielsweise endotheliale Zellen gezeigt werden können. *In vivo* kommen zudem auch Wechselwirkungen des zu untersuchenden Proteins mit der Extrazellulärmatrix zum Tragen. Da das Tumorstroma sehr variabel ist (Mueller & Fusenig 2004) und eine wichtige Rolle bei der Entstehung, Progression und Metastasierung eines Tumors spielt (Zigrino et al. 2005) ist es naheliegend, dass es auch das Therapieansprechen eines Tumors mitbeeinflusst. OSF-2-könnte somit, über Wechselwirkungen mit der Extrazellulärmatrix, eine Rolle über die Tumorentstehung und –progression hinaus spielen.

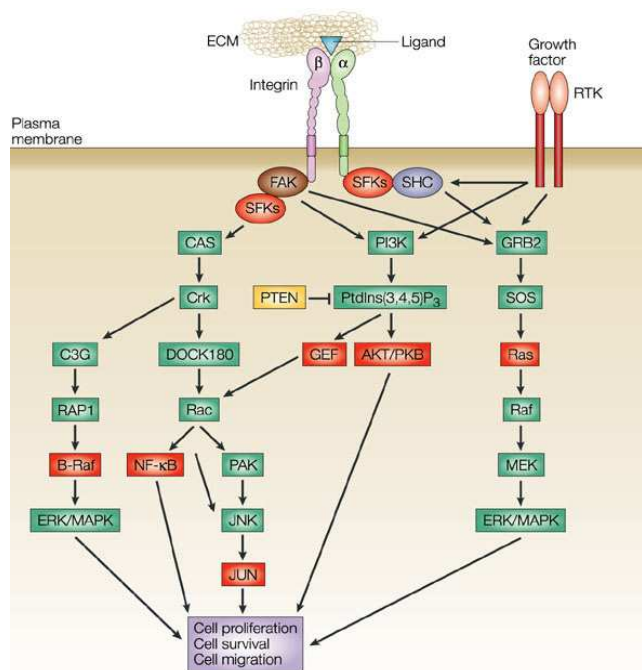
Um den Einfluß der OSF-2-Expression auf das Tumorwachstum *in vivo* zu überprüfen, wurden stabile Zelllinien subkutan in Nacktmäuse injiziert, und das Tumorwachstum in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Nach Injektion OSF-2-GFP-, OSF-2 Δ Sek-GFP- und GFP-exprimierender Tumorzellen konnten jedoch keine signifikanten Änderungen des Tumorwachstums beobachtet werden (s. Abbildung 3.33). Durch Überprüfung der OSF-2-Expression vor und nach Injektion, konnte hierbei sichergestellt werden, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Injektion noch OSF-2 exprimierten. Einige Arbeitsgruppen (Bao et al. 2004; Shao et al. 2004; Yan & Shao 2006) konnten eine tumorfördernde Wirkung OSF-2-exprimierender Zellen *in vivo* zeigen, wobei hier jedoch Zellen anderer Tumorentitäten injiziert wurden und teilweise auch andere Mausstämmen verwendet wurden (Shao et al. 2004) (Yan & Shao 2006).

Die Kontroversität der Ergebnisse bezüglich der Expression sowie der funktionellen Bedeutung von OSF-2 könnte auf die Heterogenität der Tumore auch innerhalb einer Tumorentität zurückzuführen sein (s. Kapitel 1.3.3). Bisher finden sich in der Literatur noch zu wenige Ergebnisse, die sich auf den gleichen Tumortyp beziehen, und miteinander vergleichbar wären. Darüber hinaus werden viele Versuche nur mit einer kleinen Anzahl an Gewebeproben oder Zelllinien durchgeführt. Großangelegte Studien mit einer hohen Probenzahl sowie die identische oder zumindest vergleichbare Durchführung der funktionellen Assays in den einzelnen Forschungsgruppen würden hier sicherlich zu verlässlicheren Ergebnissen führen. Beispielsweise unterscheidet sich die Menge des verwendeten rekombinanten Proteins zwischen den einzelnen Studien beträchtlich. So werden Zellen mit Konzentrationen zwischen 20 μ g rOSF-2/ml (Tai et al. 2005) und 100 ng rOSF-2/ml (Bao et al. 2004) behandelt. Teilweise konnten sogar durch unterschiedliche Konzentrationen rOSF-2-vermittelte biphasische Effekte gezeigt werden (Erkan et al. 2007). Es wäre andererseits auch denkbar, dass die einzelnen OSF-2-Isoformen, die bisher kaum Gegenstand detaillierter Untersuchungen waren, unterschiedliche Funktionen besitzen und so zumindest anteilig zur Diversität der Ergebnisse beitragen (Kim et al. 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, welche von einer Gewebe, dem Zelltyp und der Zelllinie unabhängigen OSF-2-Isoform-Expression zeugen, unterstützen diese These aber zumindest in Kopf-Hals-Tumoren zunächst nicht. Allerdings wurden hier auch keine funktionellen Untersuchungen der Spleißvarianten durchgeführt.

4.6 Die Rolle von OSF-2 in der Signaltransduktion

OSF-2 ist nachgewiesenerweise in der Lage mit $\alpha_v\beta_3$ und/oder $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen (Gillan et al. 2002; Bao et al. 2004; Shao et al. 2004; Yan & Shao 2006) bzw. mit $\alpha_6\beta_4$ -Integrinen (Baril et al. 2007) zu interagieren. Integrine sind Transmembranproteine mit vielfältigen Funktionen. Sie besitzen keinerlei enzymatische Aktivität und übertragen Signale aus der direkten Umgebung der Zelle durch Interaktion mit Signal- und Adapterproteinen (Zaidel-Bar et al. 2007; Legate et al. 2009). Signaltransduktion ist jedoch bekanntlich keine lineare Abfolge sukzessiver Ereignisse sondern ein interagierendes Netzwerk (s. Abbildung 4.1). So können Integrine verschiedene Signaltransduktionskaskaden aktivieren bzw. im Umkehrschluß auch die durch Integrine aktivierbaren Signaltransduktionswege durch andere Signale aktiviert werden (Legate et al. 2009). Darüberhinaus konnten Wechselwirkungen zwischen Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren (GFR) nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.1) (Guo & Giancotti 2004). Dies konnte beispielhaft anhand einer OSF-2-vermittelten Interaktion zwischen $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen und dem EGF-Rezeptor gezeigt werden (Yan & Shao 2006).

Die Integrin-vermittelte Zelladhäsion hat die Rekrutierung verschiedener Adapter- und Signalproteine an fokale Adhäsionsstellen zur Folge (Miyamoto et al. 1995; Zamir & Geiger 2001). Darunter fällt u.a. die Phosphorylierung verschiedener Proteintyrosinkinasen, wie die fokale Adhäsionskinase FAK sowie die Src-Kinase (Giancotti & Ruoslahti 1999). Der FAK-Src-Komplex aktiviert daraufhin hauptsächlich den RAS/MEK/ERK-Signalweg (Legate et al. 2009). Allerdings konnte für OSF-2 bisher am Beispiel des Pankreaskarzinom gezeigt werden, dass der OSF-2-Rezeptor $\alpha_6\beta_4$ -Integrin nach OSF-2-Ligandenbindung nicht zur Aktivierung des RAS/MEK/ERK-Signalwegs führt (Baril et al. 2007). Neben der Aktivierung des RAS/MEK/ERK-Signalweges kann die Phosphorylierung von FAK auch zur Rekrutierung der PI3-Kinase und nachfolgender Aktivierung von Akt führen. Die OSF-2-vermittelte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges konnte von mehreren Gruppen gezeigt werden (Bao et al. 2004; Baril et al. 2007; Erkan et al. 2007). Hierbei wurden allerdings auch biphasische Effekte beschrieben. So konnten Erkan und Kollegen zeigen, dass niedrige Mengen OSF-2 (100 ng/ml) die Akt-Phosphorylierung vermindern, während höhere Konzentrationen rOSF-2 (1 μ g/ml) die Phosphorylierung erhöhen (Erkan et al. 2007).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abbildung 4.1: Überblick über die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden durch Integreine und/oder Wachstumsfaktorrezeptoren nach Guo (Guo & Giancotti 2004). Integrin- und Wachstumsfaktorrezeptor-abhängige Signale können zu verschiedenen Zeitpunkten integriert werden, was einen optimalen Effekt auf das zelluläre Überleben, Migration, Invasion und Proliferation hat.

Über die OSF-2-vermittelte Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden in Kopf-Hals-Tumoren ist derzeit noch nichts bekannt. In dieser Arbeit konnte mittels Western-Blot-Analysen (s. Abbildung 3.30) und Immunfluoreszenzfärbung (s. Abbildung 3.28 und 3.29) eine Aktivierung des Akt/PKB-Signaltransduktionsweges durch rOSF-2 nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten von anderen Arbeitsgruppen an Tumorentitäten wie Darmkrebs (Bao et al. 2004) oder Bauchspeicheldrüsenkrebs (Baril et al. 2007) erzielt werden. Auf Ebene der PI3-Kinase konnte gezeigt werden, dass HNSCC-Zellen die mit rOSF-2 in 1% FCS-haltigem Medium inkubiert wurden, besser überlebten bzw. stärker proliferierten, als zusätzlich mit PI3-Kinase-Inhibitor behandelte Zellen (s. Abbildung 3.27). Daher ist davon auszugehen, dass das Überleben bzw. die Proliferation der Zellen hier über eine Aktivierung der PI3-Kinase bzw. die Aktivierung des Akt-Signalweges vermittelt wurde. Neben der Aktivierung von Akt/PKB war auch eine Aktivierung von p44/42 nach Inkubation mit FCS-haltigem Medium, Insulin und konditioniertem Medium nachweisbar. Nach Inkubation mit rOSF-2 konnte hingegen keinerlei Phosphorylierung von p44/42 beobachtet werden. Baril und Kollegen konnten bei ähnlichen Versuchen in Bauchspeicheldrüsenkrebszellen zeigen, dass OSF-2 den Akt/PKB-, nicht aber den RAS/MEK/ERK-Signalweg aktiviert. Hier wurde allerdings nur rekombinantes Protein verwendet (Baril et al. 2007). Da der RAS/MEK/ERK-Signalweg über Wachstumsfaktorrezeptoren aktiviert werden kann (s. Abbildung 4.1) war die Phosphorylierung von p44/42 durch FCS-haltiges

Medium sowie Insulin zu erwarten. Die Aktivierung der PI3-Kinase stellt einen der ersten Schritte in der durch Insulin ausgelösten Signaltransduktion dar und spielt sowohl in der Aktivierung des Akt/PKB- als auch des RAS/MEK/ERK-Signalweges eine wichtige Rolle (Shepherd et al. 1996). Konditioniertes Medium enthält neben sekretiertem OSF-2 verschiedene Metabolite, Wachstumsfaktoren und Proteine der Extrazellulärmatrix (Freshney 2005.). Die Phosphorylierung von p44/42 durch konditioniertes Medium könnte also sowohl OSF-2-vermittelt sein, als auch von einer oder mehrerer anderer Komponenten des konditionierten Mediums abhängen.

Der Akt/PKB-Signalweg ist ein vielversprechender Angriffspunkt für neue Krebsmedikamente, da Akt zum einen von fast allen onkogenen Wachstumsfaktoren, angiogenen Faktoren und Cytokinen aktiviert wird (Cheng et al. 2005). Zum anderen sind viele Komponenten des Akt/PKB-Signaltransduktionswegs in Tumoren dereguliert (Altomare & Testa 2005). In verschiedenen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass eine Überexpression und/oder Aktivierung von Akt die Resistenz des Tumors gegenüber Chemotherapeutika erhöht (Cheng et al. 2002; Arlt et al. 2003; Knuefermann et al. 2003). Derzeit gibt es verschiedenste therapeutische Ansätze, die einzelne Komponenten des Akt/PKB-Signalsweges, Akt selbst, aber auch "upstream"-Regulatoren und "downstream"-Effektoren der Akt/PKB-Signaltransduktion zum Ziel haben. Da sich die Aktivierung von Akt/PKB hauptsächlich auf überexprimierte Wachstumsfaktoren oder Rezeptortyrosinkinasen zurückführen lässt (Cheng et al. 2005), könnte OSF-2 hier als Zielstruktur für neue Krebsmedikamente von Bedeutung sein.

4.7 OSF-2-Expression in Tumorzellen und TAFs

Tumore bestehen nicht nur aus neoplastischen Tumor-, sondern auch aus nicht-neoplastischen Stromazellen, zu denen Fibroblasten, Tumor-assoziierte Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten und inflammatorische Zellen gehören (De Wever & Mareel 2003). Tumor-assoziierte Fibroblasten stellen den größten zellulären Anteil des Tumorstromas dar, können innerhalb des Tumorgewebes anhand ihrer Expression von α -smooth-muscle Aktin identifiziert werden (De Wever & Mareel 2003; Bhowmick et al. 2004; Desmouliere et al. 2004; Orimo & Weinberg 2006), und spielen eine wichtige Rolle in der Krebsprogression und Metastasierung (De Wever & Mareel 2003; Bhowmick et al. 2004; Desmouliere et al. 2004; Orimo & Weinberg 2006). Sie stimulieren die Tumorgenese, Angiogenese und Invasierung (Choi et al. 2011) über Sekretion von Wachstumsfaktoren, Proteasen, Chemokinen und angiogenen Faktoren (Li et al. 2007).

Da derzeit noch kontrovers diskutiert wird, ob OSF-2 von Tumorzellen oder Tumor-assoziierten Fibroblasten gebildet wird, wurden in dieser Arbeit primäre Zellen aus humanen Kopf-Hals-Tumoren isoliert und anschließend unter Anwendung unterschiedlicher Methoden Tumorzellen und Tumor-assoziierte Fibroblasten separiert. Da die Größe der aus dem OP erhaltenen Tumorfragmente und damit die Menge der Tumorzellen häufig gering war und während der Isolation viele Zellen verloren gingen, stellte sich die Methode der Antikörper-basierten magnetischen Zellseparation für die Isolation humaner Tumorzellen meist als ungeeignet dar. Für die Isolation muriner Tumorzellen bzw. muriner Tumor-assoziiertes

Fibroblasten konnte sie, aufgrund der größeren zur Verfügung stehenden Tumormenge, hingegen erfolgreich eingesetzt werden. Eine weitere Schwierigkeit bei der Kultivierung der primären Tumorzellen stellte die mangelnde Reinheit der Separation in Kombination mit der unterschiedlichen Proliferationsrate der Zellen dar. Obwohl eine Tumorkultur nach der Zellseparation häufig nur durch wenige Fibroblasten verunreinigt wurde, wurden die Tumorzellen meist innerhalb kurzer Zeit von diesen Fibroblasten überwachsen. Die in Kapitel 3.8 beschriebene erfolgreiche Etablierung der humanen Kopf-Hals-Tumorzelllinie lässt sich weitestgehend auf die hohe Proliferationsrate dieser Tumorzellen zurückführen. Zusätzlich wurde die Separation der Tumor-assoziierten Fibroblasten mittels differentieller Trypsinierung durch die sehr starke Adhäsion der Tumorzellen an die Gewebekulturflasche erleichtert. So konnten die Zellen sehr lange trypsinieren werden, ohne dass sich Tumorzellen von der Kulturflasche lösten. Die Tumor-assoziierten Fibroblasten benötigten im Gegenzug eine sehr kurze Trypsinierungszeit, so dass die Zellen auf diesem Weg relativ einfach in eine separate Kulturflasche überführt werden konnten. In im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Microarray-Analysen, konnte sowohl in Tumorzellen als auch in Tumor-assoziierten Fibroblasten eine OSF-2-Expression nachgewiesen werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Tumor-assoziierte Fibroblasten etwa 20-mal mehr OSF-2 exprimieren als Tumorzellen. Diese Ergebnisse wurden mittels RT-PCR und quantitativer Real Time-PCR validiert, wobei die OSF-2-Expression in Tumorzellen auch auf Proteinebene gezeigt werden konnte (s. Kapitel 3.8.9-11).

4.8 Charakterisierung einer humanen Tumorzelllinie

Zelllinien stellen als *in vitro*-Modelle wichtige Hilfsmittel bei zell- und molekularbiologischen Untersuchungen dar. Sie sind unbegrenzt teilungsfähig, stehen dem Anwender jederzeit nahezu unverändert zur Verfügung, und ermöglichen daher zeitlich ausgedehnte Studien sowie experimentelle Serien. Dennoch stellen Zelllinien artifizielle Systeme dar. Sie sind u.a. unabhängiger von Wachstumsfaktoren und weisen häufig eine veränderte Morphologie im Vergleich zu Primärzellen des jeweiligen Zelltyps auf. Primärzellen bilden hingegen eine Brücke zwischen der artifiziellen *in vitro*-Situation und *in vivo*-Tierversuchen, da sie den Bedingungen im Organismus viel näher kommen als Zelllinien. Auch junge Tumorzelllinien spiegeln die Bedingungen im Organismus recht gut wider und enthalten häufig Mischpopulationen verschiedenster Zellen. Die Charakterisierung der Primärzellen erfolgte hauptsächlich über Immunfluoreszenzfärbungen, wobei die hohe Proliferationsrate der isolierten Tumorzellen, die zusätzliche Durchführung funktioneller Assays erlaubte. Nach etwa 20 Tagen Kultivierung und differenzieller Trypsinierung konnte die vormals noch heterogene Primärkultur schließlich als reine Tumorkultur charakterisiert werden. Um die Menge der in der Kultur verbliebenen Fibroblasten zu überprüfen, wurden regelmäßig Färbungen gegen den mesenchymalen Marker Vimentin durchgeführt. Nach 20 Tagen Kultivierung und differentieller Trypsinierung waren keine Vimentin-positiven Zellen mehr detektierbar (s. Abbildung 3.35). Die verbliebenen Tumorzellen waren sowohl für das hauptsächlich in den Epithelien vorkommende transmembrane

Glykoprotein E-Cadherin, als auch für das als Standard-Tumormarker geltende Membranprotein EpCAM (Nubel et al. 2009) positiv (s. Abbildung 3.36).

Um die Transfektionseffizienz der primären Tumorzellen zu testen, wurde ein EpCAM-GFP-Plasmid unter Verwendung von LipofectamineTM 2000 in die Zellen transfiziert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen mit hoher Effizienz transfizieren ließen, wobei die Lokalisation von EpCAM-GFP und endogenem EpCAM-Protein identisch war (s. Abbildung 3.37).

Im Wundheilungsassay zeigten die isolierten Tumorzellen gegenüber den beiden Kopf-Hals-Tumorzelllinien HNCCUM-02T und Fadu eine deutlich verringerte Migrationsgeschwindigkeit (s. Abbildung 3.38). Da die Stärke der Adhäsion mit der Migrationsgeschwindigkeit invers korreliert (Lauffenburger & Horwitz 1996; Palecek et al. 1997; Potter et al. 1998), könnte dies auf die sehr starke Adhäsionsfähigkeit der StauMa-Zellen zurückzuführen sein. Die Migrationsgeschwindigkeit einer Zelle hängt in erster Linie von der Anzahl und Größe ihrer fokalen Kontakte ab. Zellen mit hoher Integrinexpression sind daher in der Lage, mehr als 100 fokale Kontakte auszubilden (Friedl & Wolf 2003). Limitierender Faktor für die Migrationsgeschwindigkeit einer Zelle ist letztlich die Geschwindigkeit der einzelnen Adhäsions- und Ablösungsereignisse (Friedl & Wolf 2003).

Bei dem Sphäroidmodell handelt es sich um ein dreidimensionales, multizelluläres Gebilde mit ähnlichem histologischen Aufbau wie ein solider *in vivo*-Tumor. Hierbei unterscheidet sich die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff, Kohlendioxid und Ernährungsfaktoren in Abhängigkeit von ihrer Position im Sphäroid. Sphäroidmodelle werden u.a. bei Studien zu Zell-Zell-Interaktionen, Tumormetabolismus und Nährstoffgradienten (Kunz-Schughart et al. 2004) eingesetzt.

Maligne Zellen zeigen generell eine größere Tendenz Sphäroide zu bilden als nicht-maligne Zellen (Rak et al. 1995), wobei das Wachstum in Weichagar häufig als Kriterium für Malignität verwendet wird (Ly et al. 2010). Die in dieser Arbeit getesteten Tumorzelllinien zeigten jedoch keinerlei Unterschiede in der Fähigkeit der Sphäroidbildung (s. Abbildung 3.39). Um weitere Aussagen, beispielsweise über Unterschiede zellulären Überlebens im Innern der Sphäroide, und damit unter ungünstigen Wachstumsbedingungen, treffen zu können, wären fortführende Versuche, z.B. immunhistochemische Färbungen von Sphäroidschnitten notwendig.

Neben der Fähigkeit zur Invasion und Migration benötigen Tumorzellen eine hohe Stressresistenz gegenüber den im Tumorgewebe vorherrschenden ungünstigen Wachstumsbedingungen. Um die Fähigkeit der StauMa-Zellen bei Nährstoffmangel zu überleben, zu testen, wurden diese über einen Zeitraum von 6 Tagen in serumfreiem Medium inkubiert und die Zellzahl an Tag 1 und 6 bestimmt. StauMa-Zellen verkrafteten die Inkubation in serumfreiem Medium deutlich besser, als die Kopf-Hals-Vergleichstumorzelllinie (Fadu). Die Zellzahl der StauMa-Zellen war nach 6-tägiger Inkubation in serumfreiem Medium um das 10-fache größer als die Zellzahl der Vergleichszelllinie. Dies könnte u.a. auf eine starke Aktivierung des Akt/PKB-Signalweges, einem der wichtigsten Signalwege zellulären Überlebens (Song et al. 2005), hindeuten. In vielen Tumoren sind Komponenten des Akt/PKB-Signalweges dereguliert

(Vivanco & Sawyers 2002; Altomare & Testa 2005), wobei diese mit einer erhöhten Aggressivität und entsprechender Medikamenten- bzw. Therapieresistenz des Tumors in Verbindung gebracht wird (Garcia et al. 2009; Bartlett 2010);(Mitsiades et al. 2004; Garcia et al. 2009). Auch Proteine, die die Akt-Aktivität regulieren, z.B. PTEN (Li et al. 1997) oder PHLPP (Gao et al. 2005) sind in Tumoren häufig mutiert. Etwa 10 - 20% der Kopf-Hals-Tumore zeigen beispielsweise inaktivierende Mutationen oder Deletionen von PTEN (Leemans et al. 2011), oder aktivierende, somatische Mutationen der katalytischen PI3K-Untereinheit p110 α , (Kozaki et al. 2006; Qiu et al. 2006). Amplifikationen des Chromosoms 3q26, dem Lokus der katalytischen PI3K-Untereinheit p110 α , werden in Kopf-Hals-Tumoren häufig beobachtet (Negrini et al. 2010)). Sowohl aktivierende Mutationen innerhalb der PI3K, als auch inaktivierende Mutationen von PTEN führen zu einer verstärkten Akt/PKB-Aktivität, was wiederum die Migration und Invasion von Zellen zu fördern vermag (Leemans et al. 2011).

In der an der Universität Duisberg-Essen in Kooperation mit PD Dr. Gödecke von Frau Prof. Shirley Knauer durchgeführten FISH-Analyse der StauMa-Zellen konnte eine Vielzahl chromosomaler Veränderungen festgestellt werden. Fast alle Chromosomen waren von Amplifikationen, Deletionen und/oder Translokationen betroffen (s. Abbildung 3.41). In Kopf-Hals-Tumoren konnte bereits gezeigt werden, dass die Zahl der genomischen Aberrationen im Verlauf der Progression von der Hyperplasie bis zum invasiven Karzinom kontinuierlich steigt. Chromosomale Deletionen oder Amplifikationen betreffen hierbei meist kritische Komponenten von Signalwegen, die das Zellwachstum, die Motilität oder Stroma-Interaktionen regulieren (Califano et al. 1996). Da die StauMa-Zellen aus einem fortgeschrittenen Stirnhöhlenkarzinom isoliert wurden, war die große Anzahl an Amplifikationen, Deletionen und Translokationen zu erwarten. Es konnten jedoch aufgrund der geringen Zahl an Einzelanalysen bislang keine Hinweise auf die chronologische Entstehung der Aberrationen gewonnen werden. Die chromosomale Analyse einer signifikanten Anzahl an Einzelzell-Chromosomensätzen ist derzeit in Vorbereitung.

4.9 Xenograft-Versuche der humanen Tumorzelllinie

Im Anschluß an die Charakterisierung *in vitro* wurde die Tumorigenität der humanen Tumorzellen *in vivo* untersucht. Xenograftversuche stellen hierbei eine nützliche und weit verbreitete Möglichkeit dar, die Tumorigenität von Zellen bzw. die Effizienz von therapeutisch wirksamen Verbindungen *in vivo* zu testen (Shaw et al. 2004). Die isolierten Tumorzellen waren dazu in der Lage, nach subkutaner Injektion in immun-inkompetente Nacktmäuse, Tumore zu bilden. Das Tumorstadium war hierbei abhängig von der Zahl der injizierten Tumorzellen (s. Abbildung 3.47 und 3.52).

Die Tumorstammzelltheorie besagt, dass ein Tumor hierarchisch aufgebaut ist und nur ein kleiner Teil der Tumorzellpopulation dazu in der Lage ist, Tumorstadium zu initiieren und aufrechtzuerhalten (Prince & Ailles 2008). Diese Zellen teilen sich asymmetrisch, wobei

Tochterzellen mit und ohne Stammzeleigenschaften entstehen (McDonald et al. 2009). Tumorstammzellen solider Tumore wurden zunächst aus Brustkrebs (Al-Hajj et al. 2003), später auch aus anderen soliden Tumoren wie Darmkrebs (O'Brien et al. 2007), Prostatakrebs (Collins et al. 2005) und Bauchspeicheldrüsenkrebs (Li et al. 2007) isoliert. Sie exprimieren spezifische Oberflächenmarker (Clarke & Fuller 2006), und die aus ihnen entstehenden Tumore enthalten die gleiche Population tumorigener und nicht-tumorigener Zellen wie der Originaltumor (Wicha et al. 2006). Desweiteren können Tumorstammzellen über mehrere Generationen seriell transplantiert werden, was auf ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung hinweist (Pardal et al. 2003; Clarke & Fuller 2006; Wicha et al. 2006; Dalerba et al. 2007).

Zu den Tumorstammzellmarkern gehören CD44, CD24, CD133, die Expression der Aldehyddehydrogenase und die Fähigkeit des aktiven Transports von Hoechst 33342 aus der Zelle (Keysar & Jimeno 2010). Bisher wurden bereits aus verschiedenen Tumorentitäten wie Lunge (Chen et al. 2008), Bauchspeicheldrüse (Hermann et al. 2007), Leber (Ma et al. 2008), Prostata (Miki et al. 2007) und Kopf-Hals (Zhang et al. 2010) CD133-fraktionierte Tumorstammzellen isoliert. Der Gruppe um Okamoto war es möglich, mit Hilfe der magnetischen Zellseparation CD44⁺-Tumorstammzellen aus einer Kopf-Hals-Tumorzelllinie zu isolieren (Okamoto et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden CD133-fraktionierte Tumorzellen für Transplantationsexperimente verwendet. Nach Separation und subkutaner Injektion CD133⁺- und CD133⁻-Tumorzellen, zeigte sich, dass CD133⁺-Tumorzellen ein stärkeres Tumorwachstum induzieren als CD133⁻-Tumorzellen (s. Abbildung 3.52). Dies kann als ersten Hinweis auf das Vorhandensein von Tumorstammzellen in der Fraktion der CD133⁺-Zellen gewertet werden. Während des Xenograft-Versuchs konnte das Tumorwachstum des CD133⁺-Tumors bereits 10 Tage vor dem Tumorwachstum des CD133⁻-Tumors beobachtet werden. Dementsprechend hatte der CD133⁺-Tumor bei Tötung des Versuchstieres ein Volumen von über 90 mm³, während der CD133⁻-Tumor nur ein Volumen von etwa 13 mm³ erreichte. Ricci-Vitiani und Kollegen konnten mittels Xenograftversuchen zeigen, dass 3000 CD133⁺ Kolonkarzinomzellen nach Injektion ein stärkeres Tumorwachstum induzierten, als 10⁶ Zellen der Gesamtzellpopulation (Ricci-Vitiani et al. 2007). Nach Injektion von 10⁵ CD133⁻-Tumorzellen fand im Rahmen dieser Studie kein Tumorwachstum statt (O'Brien et al. 2007; Ricci-Vitiani et al. 2007). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigen diese Studien. Die Injektion von CD133⁺-Kopf-Hals-Tumorzellen initiierte eine stärkere Tumorbildung als die Injektion der gleichen Zahl CD133⁻-Tumorzellen. Hierbei konnte die vermehrte Anzahl CD133⁺-Tumorzellen auch in immunhistochemischen Färbungen der paraffinierten Maustumore gezeigt werden (s. Abbildung 3.53). Die Injektion von 10³ bzw. 10⁴ CD133⁺-Zellen löste allerdings kein Tumorwachstum aus. Geht man davon aus, dass die von O'Brien und Kollegen kalkulierte Tumorstammzellhäufigkeit von einer Zelle in 5,7 x 10⁴ unfraktionierten Darmkrebszellen bzw. einer Zelle in 262 CD133⁺-Darmkrebszellen für die aus dem Kopf-Hals-Tumor isolierten Tumorzellen ebenfalls zutrifft, so wären etwa 4 bzw. 40 Tumorstammzellen in die Nacktmäuse injiziert worden. Da die Fraktionierung der Tumorzellen mittels magnetischer Separation

höchstwahrscheinlich nur eine Anreicherung der CD133⁺-Zellen ergab, und diese Zellen vor ihrer Injektion expandiert werden mussten, lag die Anzahl der injizierten Tumorstammzellen wahrscheinlich deutlich niedriger. Es ist also möglich, dass das ausbleibende Tumorwachstum darauf zurückzuführen ist, dass die injizierten Zellen zu wenig Tumorstammzellen enthielten um ein Tumorwachstum zu initiieren. Da zu den Tumorstammzeleigenschaften der isolierten Tumorzellen keine weiteren Versuche durchgeführt wurden, kann über die genaue Anzahl der in den isolierten Tumorzellen enthaltenen Tumorstammzellen nur spekuliert werden. Dies müsste in nachfolgenden Analysen im Detail untersucht werden.

4.10 Vermittlung der Zelladhäsion durch Implantat-Beschichtung mit rOSF-2

Die Beschichtung von Implantatmaterial mit rekombinanten Proteinen, die die Adhäsion körpereigener Zellen erhöhen und damit die Integration des Implantats in das Zielgewebe erleichtern, gewinnt in der regenerativen Medizin zunehmend an Bedeutung (Jenissen 2003; Liu et al. 2005; Schliephake et al. 2005) . So wird derzeit beispielsweise durch Beschichtung von Metallimplantaten mit Calciumphosphaten oder osteogenen Wachstumsfaktoren (z.B. Bone Morphogenic Proteins, BMPs) eine Funktionalisierung des Implantats erreicht, die zu einem verbesserten Einwachsverhalten in das umgebende Gewebe führt.

Um zu überprüfen, ob rOSF-2 einen Einfluß auf die Adhäsion von Fibroblasten an Metallplättchen hat, wurden diese mit rOSF-2 beschichtet und die Zelladhäsion im Vergleich zu unbeschichteten Plättchen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass OSF-2 die Zelladhäsion von Fibroblasten vermittelt (s. Abbildung 3.56). Aufgrund seiner adhäsiven Eigenschaften könnte OSF-2 daher, durch Verbesserung der Biokompatibilität sowie -funktionalität von Implantaten, in der regenerativen Medizin Verwendung finden. Hierbei könnte OSF-2 sowohl die Adhäsion, als auch die Migration und das Überleben körpereigener Zellen (s. Kapitel 3.4.2 und 3.4.3) im Zielgewebe erhöhen und damit die Implantateinheilung verbessern. Besonders im Hinblick auf diese Verwendungsmöglichkeit müssen die durch OSF-2-vermittelten Funktionen genauestens analysiert werden, um eventuelle tumorigene Eigenschaften des Proteins ausschließen zu können.

OSF-2 wird in vielen Tumorarten überexprimiert, wobei die funktionelle Bedeutung innerhalb der einzelnen Entitäten derzeit noch sehr kontrovers diskutiert wird. Informationen über die Funktion weitestgehend uncharakterisierter Proteine sind für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten und verbesserter Behandlungsmethoden einzelner Patienten jedoch von großer Bedeutung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Aufschluß über die Expression, Lokalisation und Funktion von OSF-2 in humanen Kopf-Hals-Tumoren und liefern Ansatzpunkte für die Entwicklung alternativer Therapiestrategien ihrer Behandlung.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das in Kopf-Hals-Tumoren überexprimierte, hinsichtlich seiner Funktion allerdings kontrovers diskutierte, Protein OSF-2 molekularbiologisch, biochemisch und funktionell charakterisiert.

Die endogene OSF-2-Expression wurde in verschiedenen Zelllinien, humanem Tumor-, Metastasen- und Normalgewebe, sowie in primären Tumorzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten untersucht. Darüber hinaus konnte eine zytoplasmatisch-granuläre Lokalisation des aus Primärmaterial klonierten OSF-2-Proteins in transient transfizierten Tumorzelllinien gezeigt werden. Die durch das N-terminale Sekretionssignal verursachte Proteinsekretion bzw. die Inhibition der Proteinsekretion durch Deletion des Sekretionssignals, konnte sowohl morphologisch als auch biochemisch durch transiente Transfektion und Western-Blot-Analyse von Zelllysaten und dem jeweiligen Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass OSF-2 zwar in humanen Kopf-Hals-Tumorzellen exprimiert wird, in Tumor-assoziierten Fibroblasten jedoch eine bis zu 20-fach stärkere OSF-2-Expression vorliegt. Auch in immunhistochemischen Färbungen humanen Kopf-Hals-Tumorgewebes konnte OSF-2 sowohl in Tumorzellen als auch innerhalb des Tumorstromas nachgewiesen werden. Obwohl die OSF-2-Expression in der Literatur zumeist nur für einen Zelltyp postuliert wird, konnte gezeigt werden, dass in Kopf-Hals-Tumoren sowohl Tumorzellen als auch Tumor-assoziierte Fibroblasten OSF-2 exprimieren. Ähnliche Ergebnisse konnten bisher nur für das metastatische Melanom nachgewiesen werden.

Bisher wurden fünf humane Isoformen für OSF-2 postuliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl an OSF-2-Isoformen nachgewiesen, wobei auch bisher unbekannte Isoformen identifiziert werden konnten. Die als Wildtyp postulierte Isoform konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Unterschiede in der Isoform-Expression von Tumorzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten waren mittels einer OSF-2-Isoformanalyse nicht ersichtlich. Auch innerhalb verschiedener Zelllinien oder im Vergleich humanen Tumor-, Metastasen-, und Normalgewebes konnten keine Isoformsignaturen identifiziert werden. Da sich die einzelnen Isoformen ausschließlich durch C-terminale "in-frame"-Deletionen unterscheiden, kann von einer Entstehung durch alternatives Spleißen ausgegangen werden. Eine potentielle funktionelle Zuordnung einzelner Isoformen bleibt somit abzuwarten.

In funktionellen Assays hatte OSF-2 zwar keinen Einfluß auf die Proliferation von Kopf-Hals-Tumorzellen, stellte sich jedoch als wichtig für die Zellmigration und das Überleben der Zellen unter ungünstigen Wachstumsbedingungen heraus. Diese Ergebnisse konnten anhand von *in vivo*-Untersuchungen bestätigt werden. Das verbesserte Überleben der Zellen lässt sich wahrscheinlich durch die Aktivierung des "Survival"-Pathways Akt/PKB über die PI3-Kinase erklären, die in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Der Akt/PKB-Signalweg ist ein vielversprechender Angriffspunkt für neue Krebsmedikamente. Derzeit gibt es verschiedenste therapeutische Ansätze, die einzelne Komponenten des Akt/PKB-Signalsweges, Akt selbst, aber auch "upstream"-Regulatoren und "downstream"-Effektoren der Akt/PKB-Signaltransduktion zum

Ziel haben. Da sich die Aktivierung von Akt/PKB hauptsächlich auf überexprimierte Wachstumsfaktoren oder Rezeptortyrosinkinasen zurückführen lässt, könnte OSF-2 hier möglicherweise als Zielstruktur für neue Krebsmedikamente von Bedeutung sein.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen humanen Tumorgewebes war es möglich eine neue Tumorzelllinie des frontalen Sinus zu etablieren und charakterisieren. Die experimentelle Verwendung von Primärzellen und jungen Tumorzelllinien ist in der Tumorbiologie von enormer Bedeutung, da diese die komplexen Bedingungen innerhalb eines Tumors besser wiedergeben als Zelllinien und somit eine Brücke zwischen der artifiziellen *in vitro*-Situation und *in vivo*-Tierversuchen bilden. Die Tumorzelllinie wurde deshalb über ihre OSF-2-Expression hinaus molekularbiologisch und funktionell analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es sich um HPV-negative, morphologisch äußerst heterogene Zellen handelt, die eine große Zahl an Chromosomenaberrationen aufweisen. Darüber hinaus zeigten die Zellen eine starke Adhäsion an das jeweilige Substrat und nur geringe Migrationsgeschwindigkeiten. Sie konnten ungünstige Lebensbedingungen wie Nährstoffmangel besser überleben als die im Vergleich untersuchte Kopf-Hals-Tumorzelllinie und waren dazu in der Lage nach subkutaner Injektion Tumorwachstum in Nacktmäusen zu initiieren. Aus der Tumorzellpopulation isolierte CD133⁺-Zellen erhöhten die Tumoringenese in Nacktmäusen erheblich, was auf das Vorhandensein von Tumorstammzellen innerhalb der CD133⁺- Zellfraktion hindeutet.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass OSF-2 eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Zelladhäsion spielt. Diese ist jedoch nicht nur in der Tumorbiologie von großer Bedeutung. Auch die Beschichtung von Implantaten mit rekombinanten Proteinen, die die Adhäsion körpereigener Zellen und damit die Integration in das jeweilige Zielgewebe erleichtern, gewinnt in der regenerativen Medizin zunehmend an Bedeutung. Aufgrund seiner adhäsiven Eigenschaften sollte OSF-2 daher auch im Hinblick auf dessen Verwendungsmöglichkeit in der regenerativen Medizin untersucht werden. Hier könnte OSF-2 die Biokompatibilität sowie die Biofunktionalität von Implantaten verbessern. Besonders im Hinblick auf diese Verwendungsmöglichkeit müssen die durch OSF-2-vermittelten Funktionen genauestens analysiert werden, um eventuelle tumorigene Eigenschaften des Proteins ausschließen zu können.

6 Literaturverzeichnis

- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-8.
- Al-Sarraf, M. (2002). "Treatment of locally advanced head and neck cancer: historical and critical review." Cancer Control **9**(5): 387-99.
- Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, et al. (2000). "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling." Nature **403**(6769): 503-11.
- Altomare, D. A. and J. R. Testa (2005). "Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer." Oncogene **24**(50): 7455-64.
- Andersen, P. E., J. P. Shah, et al. (1994). "The role of comprehensive neck dissection with preservation of the spinal accessory nerve in the clinically positive neck." Am J Surg **168**(5): 499-502.
- Arlt, A., A. Gehrz, et al. (2003). "Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death." Oncogene **22**(21): 3243-51.
- Arthur, W. T., N. K. Noren, et al. (2002). "Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion." Biol Res **35**(2): 239-46.
- Baish, J. W. and R. K. Jain (2000). "Fractals and cancer." Cancer Res **60**(14): 3683-8.
- Bao, S., G. Ouyang, et al. (2004). "Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway." Cancer Cell **5**(4): 329-39.
- Barcellos-Hoff, M. H. and S. A. Ravani (2000). "Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells." Cancer Res **60**(5): 1254-60.
- Baril, P., R. Gangeswaran, et al. (2007). "Periostin promotes invasiveness and resistance of pancreatic cancer cells to hypoxia-induced cell death: role of the beta4 integrin and the PI3k pathway." Oncogene **26**(14): 2082-94.
- Belbin, T. J., B. Singh, et al. (2002). "Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays." Cancer Res **62**(4): 1184-90.
- Bellacosa, A., C. C. Kumar, et al. (2005). "Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting." Adv Cancer Res **94**: 29-86.
- Bennett, J. H., S. Moffatt, et al. (2001). "Cell adhesion molecules in human osteoblasts: structure and function." Histol Histopathol **16**(2): 603-11.
- Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nat Rev Cancer **3**(6): 401-10.
- Bhattacharjee, A., W. G. Richards, et al. (2001). "Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13790-5.
- Bhowmick, N. A. and H. L. Moses (2005). "Tumor-stroma interactions." Curr Opin Genet Dev **15**(1): 97-101.
- Bhowmick, N. A., E. G. Neilson, et al. (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression." Nature **432**(7015): 332-7.
- Bonnet, N., K. N. Standley, et al. (2009). "The matricellular protein periostin is required for sost inhibition and the anabolic response to mechanical loading and physical activity." J Biol Chem **284**(51): 35939-50.
- Boscolo-Rizzo, P., F. Maronato, et al. (2008). "Long-term quality of life after total laryngectomy and postoperative radiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy for laryngeal preservation." Laryngoscope **118**(2): 300-6.
- Bouck, N., V. Stellmach, et al. (1996). "How tumors become angiogenic." Adv Cancer Res **69**: 135-74.
- Bozzuto, G., P. Ruggieri, et al. (2010). "Molecular aspects of tumor cell migration and invasion." Ann Ist Super Sanita **46**(1): 66-80.
- Braakhuis, B. J., R. H. Brakenhoff, et al. (2005). "Second field tumors: a new opportunity for cancer prevention?" Oncologist **10**(7): 493-500.
- Brodland, D. G. and J. A. Zitelli (1992). "Mechanisms of metastasis." J Am Acad Dermatol **27**(1): 1-8.
- Brooks, P. C., A. M. Montgomery, et al. (1994). "Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels." Cell **79**(7): 1157-64.
- Brown, B., K. Lindberg, et al. (2006). "The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix." Tissue Eng **12**(3): 519-26.
- Buckley, C. D., G. E. Rainger, et al. (1998). "Cell adhesion: more than just glue (review)." Mol Membr Biol **15**(4): 167-76.
- Burgering, B. M. and R. H. Medema (2003). "Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty." J Leukoc Biol **73**(6): 689-701.

- Burkert, J., N. A. Wright, et al. (2006). "Stem cells and cancer: an intimate relationship." *J Pathol* **209**(3): 287-97.
- Butcher, J. T., R. A. Norris, et al. (2007). "Periostin promotes atrioventricular mesenchyme matrix invasion and remodeling mediated by integrin signaling through Rho/PI 3-kinase." *Dev Biol* **302**(1): 256-66.
- C. Brochhausen, M. L., R. Zehbe, B. Watzer, S. Grad, A. Meurer and C. J. Kirkpatrick, Ed. (2009). *Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle zur Anwendung im „Tissue Engineering“*. Der Orthopäde, Springer Medizin Verlag
- Cahill, D. P., K. W. Kinzler, et al. (1999). "Genetic instability and darwinian selection in tumours." *Trends Cell Biol* **9**(12): M57-60.
- Calderwood, D. A. and M. H. Ginsberg (2003). "Talin forges the links between integrins and actin." *Nat Cell Biol* **5**(8): 694-7.
- Calderwood, D. A., S. J. Shattil, et al. (2000). "Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling." *J Biol Chem* **275**(30): 22607-10.
- Califano, J., P. van der Riet, et al. (1996). "Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization." *Cancer Res* **56**(11): 2488-92.
- Callebaut, I., V. Mignotte, et al. (2003). "EMI domains are widespread and reveal the probable orthologs of the *Caenorhabditis elegans* CED-1 protein." *Biochem Biophys Res Commun* **300**(3): 619-23.
- Carmeliet, P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine." *Nature* **438**(7070): 932-6.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." *Nature* **407**(6801): 249-57.
- Chang, H. Y., J. B. Sneddon, et al. (2004). "Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds." *PLoS Biol* **2**(2): E7.
- Chang, Y., T. C. Lee, et al. (2005). "Differential expression of osteoblast-specific factor 2 and polymeric immunoglobulin receptor genes in nasopharyngeal carcinoma." *Head Neck* **27**(10): 873-82.
- Chen, Y. C., H. S. Hsu, et al. (2008). "Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells." *PLoS One* **3**(7): e2637.
- Cheng, J. Q., X. Jiang, et al. (2002). "Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway." *Drug Resist Updat* **5**(3-4): 131-46.
- Cheng, J. Q., C. W. Lindsley, et al. (2005). "The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery." *Oncogene* **24**(50): 7482-92.
- Choi, K. U., J. S. Yun, et al. (2011). "Lysophosphatidic acid-induced expression of periostin in stromal cells: Prognostic relevance of periostin expression in epithelial ovarian cancer." *Int J Cancer*.
- Chung, C. H., J. S. Parker, et al. (2006). "Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma." *Cancer Res* **66**(16): 8210-8.
- Chung, C. H., J. S. Parker, et al. (2004). "Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression." *Cancer Cell* **5**(5): 489-500.
- Clarke, M. F. and M. Fuller (2006). "Stem cells and cancer: two faces of eve." *Cell* **124**(6): 1111-5.
- Collins, A. T., P. A. Berry, et al. (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." *Cancer Res* **65**(23): 10946-51.
- Cooper, G. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." *Nature* **420**(6917): 860-7.
- Cui, W., D. J. Fowlis, et al. (1996). "TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice." *Cell* **86**(4): 531-42.
- Dalerba, P., R. W. Cho, et al. (2007). "Cancer stem cells: models and concepts." *Annu Rev Med* **58**: 267-84.
- De Wever, O. and M. Mareel (2003). "Role of tissue stroma in cancer cell invasion." *J Pathol* **200**(4): 429-47.
- Degani, S., F. Balzac, et al. (2002). "The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading." *J Cell Biol* **156**(2): 377-87.
- Deryugina, E. I., M. A. Bourdon, et al. (1998). "Remodeling of collagen matrix by human tumor cells requires activation and cell surface association of matrix metalloproteinase-2." *Cancer Res* **58**(16): 3743-50.
- Desmouliere, A., C. Guyot, et al. (2004). "The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior." *Int J Dev Biol* **48**(5-6): 509-17.
- Dhanasekaran, S. M., T. R. Barrette, et al. (2001). "Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer." *Nature* **412**(6849): 822-6.

- Doliana, R., S. Bot, et al. (2000). "EMI, a novel cysteine-rich domain of EMILINs and other extracellular proteins, interacts with the gC1q domains and participates in multimerization." FEBS Lett **484**(2): 164-8.
- Durvasula, R. V. and S. J. Shankland (2005). "Mechanical strain increases SPARC levels in podocytes: implications for glomerulosclerosis." Am J Physiol Renal Physiol **289**(3): F577-84.
- Dvorak, H. F. (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." N Engl J Med **315**(26): 1650-9.
- Dvorak, H. F., L. F. Brown, et al. (1995). "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis." Am J Pathol **146**(5): 1029-39.
- El-Naggar, A. K., H. W. Kim, et al. (2002). "Differential expression profiling of head and neck squamous carcinoma: significance in their phenotypic and biological classification." Oncogene **21**(53): 8206-19.
- Elkins, T., M. Hortsch, et al. (1990). "Drosophila fasciclin I is a novel homophilic adhesion molecule that along with fasciclin III can mediate cell sorting." J Cell Biol **110**(5): 1825-32.
- Erkan, M., J. Kleeff, et al. (2007). "Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity." Gastroenterology **132**(4): 1447-64.
- Eto, K., W. Puzon-McLaughlin, et al. (2000). "RGD-independent binding of integrin alpha9beta1 to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction." J Biol Chem **275**(45): 34922-30.
- Evanko, D. (2006). "Training GFP to fold." Nat Methods **3**(2): 76.
- Finak, G., N. Bertos, et al. (2008). "Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer." Nat Med **14**(5): 518-27.
- Fluge, O., O. Bruland, et al. (2006). "Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas." Thyroid **16**(2): 161-75.
- Folkman, J., E. Merler, et al. (1971). "Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis." J Exp Med **133**(2): 275-88.
- Forastiere, A., W. Koch, et al. (2001). "Head and neck cancer." N Engl J Med **345**(26): 1890-900.
- Freshney, R. (2005.). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.
- Friedl, P. and K. Wolf (2003). "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms." Nat Rev Cancer **3**(5): 362-74.
- Fukumura, D., R. Xavier, et al. (1998). "Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells." Cell **94**(6): 715-25.
- Fukushima, N., Y. Kikuchi, et al. (2008). "Periostin deposition in the stroma of invasive and intraductal neoplasms of the pancreas." Mod Pathol **21**(8): 1044-53.
- Gao, T., F. Furnari, et al. (2005). "PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth." Mol Cell **18**(1): 13-24.
- Garber, M. E., O. G. Troyanskaya, et al. (2001). "Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13784-9.
- Garcia, M. G., L. D. Alaniz, et al. (2009). "PI3K/Akt inhibition modulates multidrug resistance and activates NF-kappaB in murine lymphoma cell lines." Leuk Res **33**(2): 288-96.
- Gastl, G., G. Spizzo, et al. (2000). "Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival." Lancet **356**(9246): 1981-2.
- Geho, D. H., R. W. Bandle, et al. (2005). "Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration." Physiology (Bethesda) **20**: 194-200.
- Giaccia, A. J. (1996). "Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest." Semin Radiat Oncol **6**(1): 46-58.
- Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." Science **285**(5430): 1028-32.
- Gillan, L., D. Matei, et al. (2002). "Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility." Cancer Res **62**(18): 5358-64.
- Gillison, M. L., W. M. Koch, et al. (2000). "Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers." J Natl Cancer Inst **92**(9): 709-20.
- Gillison, M. L. and K. V. Shah (2001). "Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers." Curr Opin Oncol **13**(3): 183-8.
- Gimbrone, M. A., Jr., S. B. Leapman, et al. (1972). "Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization." J Exp Med **136**(2): 261-76.
- Gonzalez, H. E., M. Gujrati, et al. (2003). "Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **129**(7): 754-9.
- Grigoriadis, A., A. Mackay, et al. (2006). "Establishment of the epithelial-specific transcriptome of normal and malignant human breast cells based on MPSS and array expression data." Breast Cancer Res **8**(5): R56.

- Gumbiner, B. M. (1996). "Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis." *Cell* **84**(3): 345-57.
- Guo, W. and F. G. Giancotti (2004). "Integrin signalling during tumour progression." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10): 816-26.
- Haddad, R. I. and D. M. Shin (2008). "Recent advances in head and neck cancer." *N Engl J Med* **359**(11): 1143-54.
- Hanahan, D. and J. Folkman (2000). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* **86**(3): 353-64.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hashizume, H., P. Baluk, et al. (2000). "Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness." *Am J Pathol* **156**(4): 1363-80.
- Hayward, S. W., Y. Wang, et al. (2001). "Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line." *Cancer Res* **61**(22): 8135-42.
- Hazan, R. B., G. R. Phillips, et al. (2000). "Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis." *J Cell Biol* **148**(4): 779-90.
- Hecht, S. S. (2003). "Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer." *Nat Rev Cancer* **3**(10): 733-44.
- Helmlinger, G., F. Yuan, et al. (1997). "Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation." *Nat Med* **3**(2): 177-82.
- Hengst, S. G. u. L. (2010). Zellzyklus *Die Onkologie*, SpringerLink: 162-180.
- Herlyn, M., Z. Steplewski, et al. (1979). "Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(3): 1438-42.
- Hermann, P. C., S. L. Huber, et al. (2007). "Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer." *Cell Stem Cell* **1**(3): 313-23.
- Hermesen, M., M. A. Guervos, et al. (2001). "New chromosomal regions with high-level amplifications in squamous cell carcinomas of the larynx and pharynx, identified by comparative genomic hybridization." *J Pathol* **194**(2): 177-82.
- Hobbs, S. K., W. L. Monsky, et al. (1998). "Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(8): 4607-12.
- Hoersch, S. and M. A. Andrade-Navarro (2010). "Periostin shows increased evolutionary plasticity in its alternatively spliced region." *BMC Evol Biol* **10**: 30.
- Hofmann, U. B., J. R. Westphal, et al. (2000). "Matrix metalloproteinases in human melanoma." *J Invest Dermatol* **115**(3): 337-44.
- Hood, J. D. and D. A. Cheresh (2002). "Role of integrins in cell invasion and migration." *Nat Rev Cancer* **2**(2): 91-100.
- Horiuchi, K., N. Amizuka, et al. (1999). "Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta." *J Bone Miner Res* **14**(7): 1239-49.
- Hu, S., M. Sonnenfeld, et al. (1998). "Midline Fasciclin: a Drosophila Fasciclin-I-related membrane protein localized to the CNS midline cells and trachea." *J Neurobiol* **35**(1): 77-93.
- Huang, E., S. H. Cheng, et al. (2003). "Gene expression predictors of breast cancer outcomes." *Lancet* **361**(9369): 1590-6.
- Humphries, M. J. and P. Newham (1998). "The structure of cell-adhesion molecules." *Trends Cell Biol* **8**(2): 78-83.
- Hwang, D., I. Alevizos, et al. (2003). "Genomic dissection for characterization of cancerous oral epithelium tissues using transcription profiling." *Oral Oncol* **39**(3): 259-68.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* **110**(6): 673-87.
- Ismail, R. S., R. L. Baldwin, et al. (2000). "Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells." *Cancer Res* **60**(23): 6744-9.
- Jackson-Boeters, L., W. Wen, et al. (2009). "Periostin localizes to cells in normal skin, but is associated with the extracellular matrix during wound repair." *J Cell Commun Signal* **3**(2): 125-33.
- Jain, R. K. (1988). "Determinants of tumor blood flow: a review." *Cancer Res* **48**(10): 2641-58.
- Janda, E., K. Lehmann, et al. (2002). "Ras and TGF[β] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways." *J Cell Biol* **156**(2): 299-313.
- Jenissen, H. P. (2003). Immobilizing mediator molecules via anchor molecules on metallic implant materials containing oxide layer. M. GmbH. Germany. **US 6635269 B1**.
- Jin, C., Y. Jin, et al. (2006). "Cytogenetic abnormalities in 106 oral squamous cell carcinomas." *Cancer Genet Cytogenet* **164**(1): 44-53.
- Juliano, R. L. and S. Haskill (1993). "Signal transduction from the extracellular matrix." *J Cell Biol* **120**(3): 577-85.

- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." *J Clin Invest* **119**(6): 1420-8.
- Kamangar, F., G. M. Dores, et al. (2006). "Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world." *J Clin Oncol* **24**(14): 2137-50.
- Kanno, A., K. Satoh, et al. (2008). "Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells." *Int J Cancer* **122**(12): 2707-18.
- Kharaishvili, G., M. Cizkova, et al. (2011). "Collagen triple helix repeat containing 1 protein, periostin and versican in primary and metastatic breast cancer: an immunohistochemical study." *J Clin Pathol*.
- Kiemer, A. K., K. Takeuchi, et al. (2001). "Identification of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor progression." *Oncogene* **20**(46): 6679-88.
- Kikuchi, Y., T. G. Kashima, et al. (2008). "Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon." *J Histochem Cytochem* **56**(8): 753-64.
- Kim, C. J., N. Yoshioka, et al. (2005). "Periostin is down-regulated in high grade human bladder cancers and suppresses in vitro cell invasiveness and in vivo metastasis of cancer cells." *Int J Cancer* **117**(1): 51-8.
- Kim, J. E., S. J. Kim, et al. (2000). "Identification of motifs for cell adhesion within the repeated domains of transforming growth factor-beta-induced gene, betaig-h3." *J Biol Chem* **275**(40): 30907-15.
- Knuefermann, C., Y. Lu, et al. (2003). "HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells." *Oncogene* **22**(21): 3205-12.
- Koblinski, J. E., M. Ahram, et al. (2000). "Unraveling the role of proteases in cancer." *Clin Chim Acta* **291**(2): 113-35.
- Kozaki, K., I. Imoto, et al. (2006). "PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma." *Cancer Sci* **97**(12): 1351-8.
- Kruzynska-Frejtag, A., M. Machnicki, et al. (2001). "Periostin (an osteoblast-specific factor) is expressed within the embryonic mouse heart during valve formation." *Mech Dev* **103**(1-2): 183-8.
- Kruzynska-Frejtag, A., J. Wang, et al. (2004). "Periostin is expressed within the developing teeth at the sites of epithelial-mesenchymal interaction." *Dev Dyn* **229**(4): 857-68.
- Kudo, H., N. Amizuka, et al. (2004). "Zebrafish periostin is required for the adhesion of muscle fiber bundles to the myoseptum and for the differentiation of muscle fibers." *Dev Biol* **267**(2): 473-87.
- Kudo, Y., I. Ogawa, et al. (2006). "Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer." *Cancer Res* **66**(14): 6928-35.
- Kudo, Y., B. S. Siriwardena, et al. (2007). "Periostin: novel diagnostic and therapeutic target for cancer." *Histol Histopathol* **22**(10): 1167-74.
- Kunz-Schughart, L. A., J. P. Freyer, et al. (2004). "The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model." *J Biomol Screen* **9**(4): 273-85.
- Kuperwasser, C., T. Chavarria, et al. (2004). "Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(14): 4966-71.
- Kupferman, M. E., M. E. Fini, et al. (2000). "Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression." *Am J Pathol* **157**(6): 1777-83.
- Kzhyshkowska, J., A. Gratchev, et al. (2004). "Stabilin-1 localizes to endosomes and the trans-Golgi network in human macrophages and interacts with GGA adaptors." *J Leukoc Biol* **76**(6): 1151-61.
- Lakka, S. S., C. S. Gondi, et al. (2004). "Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis." *Oncogene* **23**(27): 4681-9.
- Landgraf, P., P. Wahle, et al. (2008). "The survival-promoting peptide Y-P30 enhances binding of pleiotrophin to syndecan-2 and -3 and supports its neuritogenic activity." *J Biol Chem* **283**(36): 25036-45.
- Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." *Cell* **84**(3): 359-69.
- Leemans, C. R., B. J. Braakhuis, et al. (2011). "The molecular biology of head and neck cancer." *Nat Rev Cancer* **11**(1): 9-22.
- Leemans, C. R., R. Tiwari, et al. (1993). "Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma." *Cancer* **71**(2): 452-6.

- Leethanakul, C., V. Patel, et al. (2000). "Gene expression profiles in squamous cell carcinomas of the oral cavity: use of laser capture microdissection for the construction and analysis of stage-specific cDNA libraries." *Oral Oncol* **36**(5): 474-83.
- Legate, K. R., S. A. Wickstrom, et al. (2009). "Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling." *Genes Dev* **23**(4): 397-418.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1997). "Genetic instability in colorectal cancers." *Nature* **386**(6625): 623-7.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1998). "Genetic instabilities in human cancers." *Nature* **396**(6712): 643-9.
- Li, C., D. G. Heidt, et al. (2007). "Identification of pancreatic cancer stem cells." *Cancer Res* **67**(3): 1030-7.
- Li, G., R. Jin, et al. (2009). "Periostin mediates vascular smooth muscle cell migration through the integrins α 5 β 3 and α 5 β 1 and focal adhesion kinase (FAK) pathway." *Atherosclerosis*.
- Li, G., S. Oparil, et al. (2006). "Phosphatidylinositol-3-kinase signaling mediates vascular smooth muscle cell expression of periostin in vivo and in vitro." *Atherosclerosis* **188**(2): 292-300.
- Li, H., X. Fan, et al. (2007). "Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer." *J Cell Biochem* **101**(4): 805-15.
- Li, J., C. Yen, et al. (1997). "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer." *Science* **275**(5308): 1943-7.
- Li, P., S. Oparil, et al. (2004). "Hypoxia-responsive growth factors upregulate periostin and osteopontin expression via distinct signaling pathways in rat pulmonary arterial smooth muscle cells." *J Appl Physiol* **97**(4): 1550-8; discussion 1549.
- Lindner, V., Q. Wang, et al. (2005). "Vascular injury induces expression of periostin: implications for vascular cell differentiation and migration." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(1): 77-83.
- Liotta, L. A. and E. C. Kohn (2001). "The microenvironment of the tumour-host interface." *Nature* **411**(6835): 375-9.
- Litvin, J., A. H. Selim, et al. (2004). "Expression and function of periostin-isoforms in bone." *J Cell Biochem* **92**(5): 1044-61.
- Litvin, J., S. Zhu, et al. (2005). "Periostin family of proteins: therapeutic targets for heart disease." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **287**(2): 1205-12.
- Liu, Y., K. de Groot, et al. (2005). "BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model." *Bone* **36**(5): 745-57.
- Lodish, H. F., Ed. (2001). *Molekulare Zellbiologie*.
- Lonka-Nevalaita, L., M. Lume, et al. (2010). "Characterization of the intracellular localization, processing, and secretion of two glial cell line-derived neurotrophic factor splice isoforms." *J Neurosci* **30**(34): 11403-13.
- Ly, T. K., J. Wang, et al. (2010). "Activation of the Ran GTPase is subject to growth factor regulation and can give rise to cellular transformation." *J Biol Chem* **285**(8): 5815-26.
- Ma, S., K. W. Chan, et al. (2008). "Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations." *Mol Cancer Res* **6**(7): 1146-53.
- MacDonald, T. J., K. M. Brown, et al. (2001). "Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease." *Nat Genet* **29**(2): 143-52.
- Maekawa, K., H. Sato, et al. (2002). "Inhibition of cervical lymph node metastasis by marimastat (BB-2516) in an orthotopic oral squamous cell carcinoma implantation model." *Clin Exp Metastasis* **19**(6): 513-8.
- Maeshima, Y., P. C. Colorado, et al. (2000). "Two RGD-independent α 5 β 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties." *J Biol Chem* **275**(31): 23745-50.
- Maetzel, D., S. Denzel, et al. (2009). "Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM." *Nat Cell Biol* **11**(2): 162-71.
- Mantovani, A. (2009). "Cancer: Inflaming metastasis." *Nature* **457**(7225): 36-7.
- Maruhashi, T., I. Kii, et al. (2010). "Interaction between periostin and BMP-1 promotes proteolytic activation of lysyl oxidase." *J Biol Chem*.
- Marur, S. and A. A. Forastiere (2008). "Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment." *Mayo Clin Proc* **83**(4): 489-501.
- Maschler, S., G. Wirl, et al. (2005). "Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization." *Oncogene* **24**(12): 2032-41.
- Meurman, J. H. (2010). "Infectious and dietary risk factors of oral cancer." *Oral Oncol* **46**(6): 411-3.
- Miki, J., B. Furusato, et al. (2007). "Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens." *Cancer Res* **67**(7): 3153-61.

- Mitra, S. K., D. A. Hanson, et al. (2005). "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(1): 56-68.
- Miyamoto, S., H. Teramoto, et al. (1995). "Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules." *J Cell Biol* **131**(3): 791-805.
- Morikawa, S., P. Baluk, et al. (2002). "Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors." *Am J Pathol* **160**(3): 985-1000.
- Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (2004). "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(11): 839-49.
- Mueller, M. M., T. Werbowski, et al. (2003). "Soluble factors involved in glioma invasion." *Acta Neurochir (Wien)* **145**(11): 999-1008.
- Munz, M., P. A. Baeuerle, et al. (2009). "The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling." *Cancer Res* **69**(14): 5627-9.
- Nagrath, S., L. V. Sequist, et al. (2007). "Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology." *Nature* **450**(7173): 1235-9.
- Nishida, N., H. Yano, et al. (2006). "Angiogenesis in cancer." *Vasc Health Risk Manag* **2**(3): 213-9.
- Norris, R. A., B. Damon, et al. (2007). "Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues." *J Cell Biochem* **101**(3): 695-711.
- Nubel, T., J. Preobraschenski, et al. (2009). "Claudin-7 regulates EpCAM-mediated functions in tumor progression." *Mol Cancer Res* **7**(3): 285-99.
- O'Brien, C. A., A. Pollett, et al. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." *Nature* **445**(7123): 106-10.
- Olumi, A. F., G. D. Grossfeld, et al. (1999). "Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium." *Cancer Res* **59**(19): 5002-11.
- Orecchia, P., R. Conte, et al. (2011). "Identification of a novel cell binding site of periostin involved in tumour growth." *Eur J Cancer*.
- Orimo, A. and R. A. Weinberg (2006). "Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type." *Cell Cycle* **5**(15): 1597-601.
- Osborne, A. R., T. A. Rapoport, et al. (2005). "Protein translocation by the Sec61/SecY channel." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 529-50.
- Oshima, A., H. Tanabe, et al. (2002). "A novel mechanism for the regulation of osteoblast differentiation: transcription of periostin, a member of the fasciclin I family, is regulated by the bHLH transcription factor, twist." *J Cell Biochem* **86**(4): 792-804.
- Paget, S. (1989). "The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889." *Cancer Metastasis Rev* **8**(2): 98-101.
- Pai, S. I. and W. H. Westra (2009). "Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment." *Annu Rev Pathol* **4**: 49-70.
- Palecek, S. P., J. C. Loftus, et al. (1997). "Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness." *Nature* **385**(6616): 537-40.
- Pardal, R., M. F. Clarke, et al. (2003). "Applying the principles of stem-cell biology to cancer." *Nat Rev Cancer* **3**(12): 895-902.
- Parsonage, G., A. D. Filer, et al. (2005). "A stromal address code defined by fibroblasts." *Trends Immunol* **26**(3): 150-6.
- Patriarca, C., R. M. Macchi, et al. (2011). "Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: A short review." *Cancer Treat Rev*.
- Potter, D. A., J. S. Tirnauer, et al. (1998). "Calpain regulates actin remodeling during cell spreading." *J Cell Biol* **141**(3): 647-62.
- Proia, N. K., G. M. Paszkiewicz, et al. (2006). "Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer--a review." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**(6): 1061-77.
- Puglisi, F., C. Puppini, et al. (2008). "Expression of periostin in human breast cancer." *J Clin Pathol* **61**(4): 494-8.
- Puppini, C., D. Fabbro, et al. (2008). "High periostin expression correlates with aggressiveness in papillary thyroid carcinomas." *J Endocrinol* **197**(2): 401-8.
- Putz, E., K. Witter, et al. (1999). "Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases." *Cancer Res* **59**(1): 241-8.
- Qiu, W., F. Schonleben, et al. (2006). "PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma." *Clin Cancer Res* **12**(5): 1441-6.
- Quaresima, B., F. Romeo, et al. (2008). "BRCA1 5083del19 mutant allele selectively up-regulates periostin expression in vitro and in vivo." *Clin Cancer Res* **14**(21): 6797-803.

- Rak, J., Y. Mitsuhashi, et al. (1995). "Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth conditions: suppression by mutant c-H-ras oncogene expression." *J Cell Biol* **131**(6 Pt 1): 1587-98.
- Renan, M. J. (1993). "How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data." *Mol Carcinog* **7**(3): 139-46.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." *Nature* **445**(7123): 111-5.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, et al. (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." *Science* **302**(5651): 1704-9.
- Riener, M. O., F. R. Fritzsche, et al. (2009). "Expression of the extracellular matrix protein periostin in liver tumours and bile duct carcinomas." *Histopathology* **56**(5): 600-6.
- Rios, H., S. V. Koushik, et al. (2005). "periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype." *Mol Cell Biol* **25**(24): 11131-44.
- Robert-Koch-Institut (2010). "Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes." *Deutsche Nationalbibliografie*.
- Robertson, N. G., S. A. Hamaker, et al. (2003). "Subcellular localisation, secretion, and post-translational processing of normal cochlin, and of mutants causing the sensorineural deafness and vestibular disorder, DFNA9." *J Med Genet* **40**(7): 479-86.
- Rodemann, H. P. and G. A. Muller (1991). "Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis." *Am J Kidney Dis* **17**(6): 684-6.
- Rosenthal, E. L., K. Hotary, et al. (1999). "Role of membrane type 1-matrix metalloproteinase and gelatinase A in head and neck squamous cell carcinoma invasion in vitro." *Otolaryngol Head Neck Surg* **121**(4): 337-43.
- Ruan, K., S. Bao, et al. (2009). "The multifaceted role of periostin in tumorigenesis." *Cell Mol Life Sci* **66**(14): 2219-30.
- Rudolph-Owen, L. A., R. Chan, et al. (1998). "The matrix metalloproteinase matrilysin influences early-stage mammary tumorigenesis." *Cancer Res* **58**(23): 5500-6.
- Sacchetti, A. and S. Alberti (1999). "Protein tags enhance GFP folding in eukaryotic cells." *Nat Biotechnol* **17**(11): 1046.
- Sameni, M., K. Moin, et al. (2000). "Imaging proteolysis by living human breast cancer cells." *Neoplasia* **2**(6): 496-504.
- Samuels, Y., L. A. Diaz, Jr., et al. (2005). "Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells." *Cancer Cell* **7**(6): 561-73.
- Sasaki, H., M. Dai, et al. (2001). "Serum level of the periostin, a homologue of an insect cell adhesion molecule, as a prognostic marker in nonsmall cell lung carcinomas." *Cancer* **92**(4): 843-8.
- Sasaki, H., M. Dai, et al. (2001). "Serum level of the periostin, a homologue of an insect cell adhesion molecule, in thymoma patients." *Cancer Lett* **172**(1): 37-42.
- Sasaki, H., K. M. Lo, et al. (2001). "Expression of Periostin, homologous with an insect cell adhesion molecule, as a prognostic marker in non-small cell lung cancers." *Jpn J Cancer Res* **92**(8): 869-73.
- Sasaki, H., Y. Sato, et al. (2002). "Expression of the periostin mRNA level in neuroblastoma." *J Pediatr Surg* **37**(9): 1293-7.
- Sasaki, H., C. Y. Yu, et al. (2003). "Elevated serum periostin levels in patients with bone metastases from breast but not lung cancer." *Breast Cancer Res Treat* **77**(3): 245-52.
- Savagner, P. (2001). "Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition." *Bioessays* **23**(10): 912-23.
- Scatena, M. and C. Giachelli (2002). "The alpha(v)beta3 integrin, NF-kappaB, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Potential role in angiogenesis." *Trends Cardiovasc Med* **12**(2): 83-8.
- Schlecht, N. F., R. D. Burk, et al. (2007). "Gene expression profiles in HPV-infected head and neck cancer." *J Pathol* **213**(3): 283-93.
- Schliephake, H., A. Aref, et al. (2005). "Effect of immobilized bone morphogenic protein 2 coating of titanium implants on peri-implant bone formation." *Clin Oral Implants Res* **16**(5): 563-9.
- Schramm, A., I. Opitz, et al. (2009). "Prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition in malignant pleural mesothelioma." *Eur J Cardiothorac Surg*.
- Schwartz, M. A. (2001). "Integrin signaling revisited." *Trends Cell Biol* **11**(12): 466-70.
- Schwartz, M. A. and S. J. Shattil (2000). "Signaling networks linking integrins and rho family GTPases." *Trends Biochem Sci* **25**(8): 388-91.

- Sechler, J. L., A. M. Cumiskey, et al. (2000). "A novel RGD-independent fibronectin assembly pathway initiated by alpha4beta1 integrin binding to the alternatively spliced V region." *J Cell Sci* **113** (Pt 8): 1491-8.
- Sessions, D. G., G. J. Spector, et al. (2002). "Analysis of treatment results for oral tongue cancer." *Laryngoscope* **112**(4): 616-25.
- Shao, R., S. Bao, et al. (2004). "Acquired expression of periostin by human breast cancers promotes tumor angiogenesis through up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression." *Mol Cell Biol* **24**(9): 3992-4003.
- Shaw, T. J., M. K. Senterman, et al. (2004). "Characterization of intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer." *Mol Ther* **10**(6): 1032-42.
- Shepherd, P. R., B. T. Nave, et al. (1996). "The role of phosphoinositide 3-kinase in insulin signalling." *J Mol Endocrinol* **17**(3): 175-84.
- Shimazaki, M., K. Nakamura, et al. (2008). "Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction." *J Exp Med* **205**(2): 295-303.
- Sieuwerts, A. M., J. Kraan, et al. (2009). "Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells." *J Natl Cancer Inst* **101**(1): 61-6.
- Singer, C. F., D. Gschwantler-Kaulich, et al. (2008). "Differential gene expression profile in breast cancer-derived stromal fibroblasts." *Breast Cancer Res Treat* **110**(2): 273-81.
- Siriwardena, B. S., Y. Kudo, et al. (2006). "Periostin is frequently overexpressed and enhances invasion and angiogenesis in oral cancer." *Br J Cancer* **95**(10): 1396-403.
- Skonier, J., M. Neubauer, et al. (1992). "cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta." *DNA Cell Biol* **11**(7): 511-22.
- Smeets, S. J., R. H. Brakenhoff, et al. (2009). "Genetic classification of oral and oropharyngeal carcinomas identifies subgroups with a different prognosis." *Cell Oncol* **31**(4): 291-300.
- Smith, R. B., J. C. Sniezek, et al. (2007). "Utilization of free tissue transfer in head and neck surgery." *Otolaryngol Head Neck Surg* **137**(2): 182-91.
- Snow, G. B., N. De Vries, et al. (1987). "Second primary cancers in the lung in head and neck cancer patients: a challenge." *Eur J Cancer Clin Oncol* **23**(6): 883-6.
- Soltermann, A., V. Tischler, et al. (2008). "Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* **14**(22): 7430-7.
- Song, G., G. Ouyang, et al. (2005). "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." *J Cell Mol Med* **9**(1): 59-71.
- Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10869-74.
- Speight, P. M. and A. W. Barrett (2002). "Salivary gland tumours." *Oral Dis* **8**(5): 229-40.
- Spizzo, G., P. Went, et al. (2004). "High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **86**(3): 207-13.
- Statistisches Bundesamt. (2011, abgerufen am 07.06.2011). "Todesursachen." from <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell,templateId=renderPrint.psml>.
- Stetler-Stevenson, W. G., S. Aznavoorian, et al. (1993). "Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis." *Annu Rev Cell Biol* **9**: 541-73.
- Stetler-Stevenson, W. G. and A. E. Yu (2001). "Proteases in invasion: matrix metalloproteinases." *Semin Cancer Biol* **11**(2): 143-52.
- Stupack, D. G. and D. A. Cheresh (2002). "Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival." *J Cell Sci* **115**(Pt 19): 3729-38.
- Sturgis, E. M. and R. H. Miller (1995). "Second primary malignancies in the head and neck cancer patient." *Ann Otol Rhinol Laryngol* **104**(12): 946-54.
- Sugiura, T., H. Takamatsu, et al. (1995). "Expression and characterization of murine osteoblast-specific factor 2 (OSF-2) in a baculovirus expression system." *Protein Expr Purif* **6**(3): 305-11.
- Syrjanen, S. (2005). "Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer." *J Clin Virol* **32** Suppl 1: S59-66.
- Tai, I. T., M. Dai, et al. (2005). "Periostin induction in tumor cell line explants and inhibition of in vitro cell growth by anti-periostin antibodies." *Carcinogenesis* **26**(5): 908-15.
- Takanami, I., T. Abiko, et al. (2008). "Expression of periostin in patients with non-small cell lung cancer: correlation with angiogenesis and lymphangiogenesis." *Int J Biol Markers* **23**(3): 182-6.
- Takayama, G., K. Arima, et al. (2006). "Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals." *J Allergy Clin Immunol* **118**(1): 98-104.

- Takeshita, S., R. Kikuno, et al. (1993). "Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I." Biochem J **294** (Pt 1): 271-8.
- Tilman, G., M. Mattiussi, et al. (2007). "Human periostin gene expression in normal tissues, tumors and melanoma: evidences for periostin production by both stromal and melanoma cells." Mol Cancer **6**: 80.
- Tischler, V., F. R. Fritzsche, et al. (2010). "Periostin is up-regulated in high grade and high stage prostate cancer." BMC Cancer **10**: 273.
- Tlsty, T. D. and L. M. Coussens (2006). "Tumor stroma and regulation of cancer development." Annu Rev Pathol **1**: 119-50.
- Toker, A. and M. Yoeli-Lerner (2006). "Akt signaling and cancer: surviving but not moving on." Cancer Res **66**(8): 3963-6.
- Tomasek, J. J., G. Gabbiani, et al. (2002). "Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(5): 349-63.
- Trzpis, M., P. M. McLaughlin, et al. (2007). "Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule." Am J Pathol **171**(2): 386-95.
- Utispan, K., P. Thuwajit, et al. (2010). "Gene expression profiling of cholangiocarcinoma-derived fibroblast reveals alterations related to tumor progression and indicates periostin as a poor prognostic marker." Mol Cancer **9**: 13.
- van 't Veer, L. J., H. Dai, et al. (2002). "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer." Nature **415**(6871): 530-6.
- van de Vijver, M. J., Y. D. He, et al. (2002). "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer." N Engl J Med **347**(25): 1999-2009.
- Vergeer, M. R., P. A. Doornaert, et al. (2009). "Intensity-modulated radiotherapy reduces radiation-induced morbidity and improves health-related quality of life: results of a nonrandomized prospective study using a standardized follow-up program." Int J Radiat Oncol Biol Phys **74**(1): 1-8.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." Nat Rev Cancer **2**(7): 489-501.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1993). "The multistep nature of cancer." Trends Genet **9**(4): 138-41.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, et al. (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." J Pathol **189**(1): 12-9.
- Wang, D., S. Oparil, et al. (2003). "Effects of pressure overload on extracellular matrix expression in the heart of the atrial natriuretic peptide-null mouse." Hypertension **42**(1): 88-95.
- Wang, Y., J. G. Klijn, et al. (2005). "Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer." Lancet **365**(9460): 671-9.
- Wang, Z., R. J. Collighan, et al. (2010). "RGD-independent cell adhesion via a tissue transglutaminase-fibronectin matrix promotes fibronectin fibril deposition and requires syndecan-4/2 and $\alpha 5 \beta 1$ integrin co-signaling." J Biol Chem **285**(51): 40212-29.
- Weiss, L. and P. M. Ward (1983). "Cell detachment and metastasis." Cancer Metastasis Rev **2**(2): 111-27.
- Went, P. T., A. Lugli, et al. (2004). "Frequent EpCam protein expression in human carcinomas." Hum Pathol **35**(1): 122-8.
- Wicha, M. S., S. Liu, et al. (2006). "Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift." Cancer Res **66**(4): 1883-90; discussion 1895-6.
- Wilde, J., M. Yokozeki, et al. (2003). "The divergent expression of periostin mRNA in the periodontal ligament during experimental tooth movement." Cell Tissue Res **312**(3): 345-51.
- Woodgett, J. R. (2005). "Recent advances in the protein kinase B signaling pathway." Curr Opin Cell Biol **17**(2): 150-7.
- Woolgar, J. A. and A. Triantafyllou (2009). "Pitfalls and procedures in the histopathological diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and a review of the role of pathology in prognosis." Oral Oncol **45**(4-5): 361-85.
- Wyllie, A. H. (1997). "Apoptosis and carcinogenesis." Eur J Cell Biol **73**(3): 189-97.
- Xouri, G. and S. Christian (2009). "Origin and function of tumor stroma fibroblasts." Semin Cell Dev Biol **21**(1): 40-6.
- Yan, W. and R. Shao (2006). "Transduction of a mesenchyme-specific gene periostin into 293T cells induces cell invasive activity through epithelial-mesenchymal transformation." J Biol Chem **281**(28): 19700-8.
- Yoshioka, N., S. Fujii, et al. (2002). "Suppression of anchorage-independent growth of human cancer cell lines by the TRIF52/periostin/OSF-2 gene." Exp Cell Res **279**(1): 91-9.
- Zaidel-Bar, R., S. Itzkovitz, et al. (2007). "Functional atlas of the integrin adhesome." Nat Cell Biol **9**(8): 858-67.

- Zamir, E. and B. Geiger (2001). "Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions." J Cell Sci **114**(Pt 20): 3583-90.
- Zhu, M., M. S. Fejzo, et al. (2010). "Periostin promotes ovarian cancer angiogenesis and metastasis." Gynecol Oncol **119**(2): 337-44.
- Zigrino, P., S. Loffek, et al. (2005). "Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion." Biochimie **87**(3-4): 321-8.
- Zinn, K., L. McAllister, et al. (1988). "Sequence analysis and neuronal expression of fasciclin I in grasshopper and Drosophila." Cell **53**(4): 577-87.
- zur Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nat Rev Cancer **2**(5): 342-50.

7 Anhang

7.1 Sequenzen

7.1.1 OSF-2-fl-Sequenz

Die OSF-2-fl-Sequenz wurde aus humanen Kopf-Hals-Tumorgewebe isoliert und zur Klonierung der in dieser Arbeit verwendeten OSF-2-Plasmide verwendet.

```

1 AGAGACTCAA GATGATTCCC TTTTACCCTA TGTTTTCTCT ACTATTGCTG CTTATTGTGA ACCCTATAAA
71 CGCCAACAAT CATTATGACA AGATCTTGGC TCATAGTCGT ATCAGGGGTC GGGACCAAGG CCCAAATGTC
141 TGTGCCCTTC AACAGATTTT GGGCACCAAA AAGAAATACT TCAGCACTTG TAAGAAGCTG TATAAAAAGT
211 CCATCTGTGG ACAGAAAACG ACTGTGTTAT ATGAATGTTG CCCTGGTTAT ATGAGAATGG AAGGAATGAA
281 AGGCTGCCCA GCAGTTTTGC CCATTGACCA TGTTTATGGC ACTCTGGGCA TCGTGGGAGC CACCACAACG
351 CAGCGCTATT CTGACGCCTC AAAACTGAGG GAGGAGATCG AGGGAAAGGG ATCCTTCACT TACTTTGCAC
421 CGAGTAATGA GGCTTGGGAC AACTTGGATT CTGATATCCG TAGAGGTTTG GAGAGCAACG TGAATGTTGA
491 ATTACTGAAT GCTTTACATA GTCACATGAT TAATAAGAGA ATGTTGACCA AGGACTTAAA AAATGGCATG
561 ATTATTCCCT CAATGTATAA CAATTTGGGG CTTTTTCTTA ACCATTATCC TAATGGGGTT GTCACTGTGA
631 ATTGTGCTCG AATCATCCAT GGAACCCAGA TTGCAACAAA TGGTGTGTC CATGTCATTG ACCGTGTGCT
701 TACACAAATT GGTACCTCAA TTCAAGACTT CATTGAAGCA GAAGATGACC TTTTATCTTT TAGAGCAGCT
771 GCCATCACAT CGGACATATT GGAGGCCCTT GGAAGAGACG GTCACTTCAC ACTCTTTGCT CCCACCAATG
841 AGGCTTTTTGA GAAACTTCCA CGAGGTGTCC TAGAAAAGGAT CATGGGAGAC AAAGTGGCTT CCGAAGCTCT
911 TATGAAGTAC CACATCTTAA ATACTCTCCA GTGTTCTGAG TCTATTATGG GAGGAGCAGT CTTTGAGACG
981 CTGGAAGGAA ATACAATTGA GATAGGATGT GACGGTGACA GTATAACAGT AAATGGAATC AAAATGGTGA
1051 ACAAAAAGGA TATTGTGACA AATAATGGTG TGATCCATTT GATTGATCAG GTCCTAATTC CTGATTCTGC
1121 CAAACAAGTT ATTGAGCTGG CTGGAAAACA GCAAACCACC TTCACGGATC TTGTGGCCCA ATTAGGCTTG
1191 GCATCTGTCT TGAGGCCAGA TGGAGAATAC ACTTTGCTGG CACCTGTGAA TAATGCATTT TCTGATGATA
1261 CTCTCAGCAT GGATCAGCGC CTCCTTAAAT TAATTCTGCA GAATCACATA TTGAAAGTAA AAGTTGGCCT
1331 TAATGAGCTT TACAACGGGC AAATACTGGA AACCATCGGA GGCAAACAGC TCAGAGTCTT CGTATATCGT
1401 ACAGCTGTCT GCATTGAAAA TTCATGCATG GAGAAAGGGA GTAAGCAAGG GAGAAACGGT GCGATTACCA
1471 TATTCCGCGA GATCATCAAG CCAGCAGAGA AATCCCTCCA TGAAAAGTTA AAACAAGATA AGCGCTTTAG
1541 CACCTTCCTC AGCCTACTTG AAGCTGCAGA CTTGAAAGAG CTCCTGACAC AACCTGGAGA CTGGACATTA
1611 TTTGTGCCAA CCAATGATGC TTTTAAGGGA ATGACTAGTG AAGAAAAAGA AATTCTGATA CGGGACAAAA
1681 ATGCTCTTCA AAACATCATT CTTTATCACC TGACACCAGG AGTTTTCTAT GGAAAAGGAT TTGAACCTGG
1751 TGTTACTAAC ATTTTAAAGA CCACACAAGG AAGCAAAATC TTTCTGAAAG AAGTAAATGA TACACTTCTG
1821 GTGAATGAAT TGAAATCAAA AGAATCTGAC ATCATGACAA CAAATGGTGT AATTCATGTT GTAGATAAAC
1891 TCCTCTATCC AGCAGACACA CCTGTTGGAA ATGATCAACT GCTGGAAATA CTTAATAAAT TAATCAAATA
1961 CATCCAAATT AAGTTTGTTC GTGGTAGCAC CTTCAAAGAA ATCCCCGTGA CTGTCTATAG ACCCACACTA
2031 ACAAAGTCA AAATTGAAGG TGAACCTGAA TTCAGACTGA TTAAAGAAGG TGAAACAATA ACTGAAGTGA
2101 TCCATGGAGA GCCAATTATT AAAAAATACA CCAAATCAT TGATGGAGTG CCTGTGGAAA TAACTGAAAA
2171 AGAGACACGA GAAGAACGAA TCATTACAGG TCCTGAAATA AAATACACTA GGATTTCTAC TGGAGGTGGA
2241 GAAACAGAAG AAACCTGAA GAAATTGTTA CAAGAAGAGG TCACCAAGGT CACCAAATTC ATTGAAGGTG
2311 GTGATGGTCA TTTATTTGAA GATGAAGAAA TTAAAAGACT GCTTCAGGGA GACACACCCG TGAGGAAGTT
2381 GCAAGCCAAC AAAAAAGTTC AAGGT

```

```

1 MIPFLPMFSL LLLLIVNPIN ANNHYDKILA HSRIRGRDQG PNVCALQQIL GTKKKYFSTC KNWYKKSICG
71 QKTTVLYECC PGYMRMEGMK GCPAVLPIDH VYGTGLGIVGA TTTQRYSDA SKLREEIEGKG SFTYFAPSNE
141 AWDNLDSDIR RGLASNPNVE LLNALHSHMI NKRMLTKDLK NGMIIPSMYN NLGLFINHYP NGVVTVNCAR
211 IIHGNQIATN GVVHVIDRVL TQIGTSIQDF IEAEDDLSSF RAAAITSDIL EALGRDGHFT LFAPTNEAFE
281 KLPRGVLERI mgDKVASEAL MKYHILNTLQ CSESIMGGAV FETLEGNTIE IGCDDGSITV NGIKMVNKKD
351 IVTNNGVIHL IDQVLIPDSA KQVIELAGKQ QTTFTDLVAQ LGLASALRPD GEYTLAPVN NAFSDDTSLM
421 DQRLKLLILQ NHILKVKVGL NELYNGQILE TIGGKQLRVF VYRTAVCIEN SCMEKGSKQG RINGAIHIFRE
491 IIKPAEKSLH EKLKQDKRFS TFLSLLEAAD LKELLTQPGD WTLFVPTNDA FKGMTSEEKE ILIRDKNALQ
561 NIILYHLTPG VFIKGFEPG VINILKTTQG SKIFLKEVND TLLVNELKSK ESDIMTNGV IHVVDKLLYP
631 ADTPVGNQDL LEILNKLIK YQIKFVRGST FKEIPVTVYR PTLTKVKIEG EPEFRLIKEG ETITEVIHGE
701 PIIKKYTKII DGVPVEITEK ETREERIITG PEIKYTRIST GGGETEETLK KLLQEEVTKV TKFIEGGDGH
771 LFEDEEIKRL LQGDTPVRKL QANKKVQG

```

7.1.2 Als OSF-2-wt publizierte Sequenz Q15063-1 (UniProtKB/Swiss-Prot)

```

1  AGACTCTCAG GTTGATGCAG TGTTCCCTCC CACAACCTCTG ACATGTATAT AAATTCTGAG
61  CTCTCCAAAG CCCACTGCCA GTTCTCTTCG GGGACTAACT GCAACGGAGA GACTCAAGAT
121 GATTCCCTTT TTACCCATGT TTTCTCTACT ATTGTGCTTT ATTGTTAACC CTATAAACCG
181 CAACAATCAT TATGACAAGA TCTTGGCTCA TAGTCGTATC AGGGGTCTGG ACCAAGGCC
241 AAATGTCTGT GCCCTTCAAC AGATTTTGGG CACCAAAAAG AAATACTTCA GCACTTGTAA
301 GAACTGGTAT AAAAAAGTCCA TCTGTGGACA GAAAACGACT GTGTTATATG AATGTTGCC
361 TGGTTATATG AGAATGGAAG GAATGAAAGG CTGCCAGCA GTTTTGCCCA TTGACCATGT
421 TTATGGCACT CTGGGCATCG TGGGAGCCAC CACAACGCAG CGCTATTCTG ACGCCTCAA
481 ACTGAGGGAG GAGATCGAGG GAAAGGGATC CTTCACTTAC TTTGCACCGA GTAATGAGGC
541 TTGGGACAAC TTGGATTCTG ATATCCGTAG AGGTTTGGAG AGCAACGTGA ATGTTGAATT
601 ACTGAATGCT TTACATAGTC ACATGATTAA TAAGAGAATG TTGACCAAGG ACTTAAAAAA
661 TGGCATGATT ATTCCTTCAA TGTATAACAA TTTGGGGCTT TTCATTAACC ATTATCCTAA
721 TGGGGTTGTC ACTGTTAATT GTGCTCGAAT CATCCATGGG AACCAGATTG CAACAAATGG
781 TGTGTGCCAT GTCATTGACC GTGTGCTTAC ACAAATTGGT ACCTCAATTC AAGACTTCAT
841 TGAAGCAGAA GATGACCTTT CATCTTTTGT AGCAGCTGCC ATCACATCGG ACATATTGGA
901 GGCCCTTGGG AGAGACGGTC ACTTCACACT CTTTGCTCCC ACCAATGAGG CTTTGTAGAA
961 ACTTCCACGA GGTGCTCTAG AAAGGATCAT GGGAGACAAA GTGGCTTCCG AAGCTCTTAT
1021 GAAGTACCAC ATCTTAAATA CTCTCCAGTG TTCTGAGTCT ATTATGGGAG GAGCAGTCTT
1081 TGAGACGCTG GAAGGAAATA CAATTGAGAT AGGATGTGAC GGTGACAGTA TAACAGTAAA
1141 TGGAAATCAA ATGGTGAACA AAAAGGATAT TGTGACAAAT AATGGTGTGA TCCATTTGAT
1201 TGATCAGGTC CTAATTCCTG ATTCTGCCAA ACAAGTTATT GAGCTGGCTG GAAAACAGCA
1261 AACCACCTTC ACGGATCTTG TGGCCCAATT AGGCTTGGCA TCTGCTCTGA GGCCAGATGG
1321 AGAATACACT TTGTGGCAC CTGTGAATAA TGCATTTTCT GATGATACTC TCAGCATGGA
1381 TCAGCGCCTC CTTAAATTAA TTCTGCAGAA TCACATATTG AAAGTAAAAG TTGGCCTTAA
1441 TGAGCTTTAC AACGGGCAA TACTGGA AACATCGGAGG AAACAGCTCA GAGTCTTCGT
1501 ATATCGTACA GCTGTCTGCA TTGAAAATTC ATGCATGGAG AAAGGGAGTA AGCAAGGGAG
1561 AAACGGTGCG ATTCACATAT TCCGCGAGAT CATCAAGCCA GCAGAGAAAT CCTCCATGA
1621 AAAGTAAAAA CAAGATAAGC GCTTTAGCAC CTTCTCAGC CTAATTGAAG CTGCAGACTT
1681 GAAAGAGCTC CTGACACAAC CTGGAGACTG GACATTATTT GTGCCAACCA ATGATGCTTT
1741 TAAGGGAATC ACTAGTGAAG AAAAAGAAAT TCTGATACGG GACAAAAATG CTCTTCAAAA
1801 CATACCTTCT TATCACCTGA CACCAGGAGT TTTCAATTGA AAAGGATTTG AACCTGGTGT
1861 TACTAACATT TTAAAGACCA CACAAGGAAG CAAAATCTTT CTGAAAGAAG TAAATGATAC
1921 ACTTCTGGTG AATGAATTGA AATCAAAAGA ATCTGACATC ATGACAACAA ATGGTGTAA
1981 TCATGTTGTA GATAAACTCC TCTATCCAGC AGACACACCT GTTGAAATG ATCAACTGCT
2041 GGAAATACTT AATAAATTA TCAAATACAT CCAAATTAAG TTTGTTCTGT GTAGCACCTT
2101 CAAAGAAATC CCCGTGACTG TCTATAAGCA AATTATTAAT AAATACACCA AAATCATGTA
2161 TGAAGTGCCT TGGAAATAA CTGAAAAAGA GACACGAGAA GAACGAATCA TTACAGTCTC
2221 TGAAATAAAA TACACTAGGA TTTCTACTGG AGGTGGAGAA ACAGAAGAAA CTCTGAAGAA
2281 ATTGTTACAA GAAGAGGTCA CCAAGGTCAC CAAATTCATT GAAGGTGGTG ATGGTCATTT
2341 ATTTGAAGAT GAAGAAATTA AAAGACTGCT TCAGGGAGAC ACACCCGTGA GGAAGTTGCA
2401 AGCCAACAAA AAAGTTC AAG GATCTAGAAG ACGATTAAGG GAAGGTCGTT CTCAGTGAAA
2461 ATCCAAAAAC CAGAAAAAAA TGTTTATACA ACCCTAAGTC AATAACCTGA CCTTAGAAAA
2521 TTGTGAGAGC CAAGTTGACT TCAGGAACCTG AAACATCAGC ACAAAGAAGC AATCATCAAA
2581 TAATTCTGAA CACAAATTTA ATATTTTTTT TTCTGAATGA GAAACATGAG GAAATTTGTG
2641 GAGTTAGCCT CCTGTGGTAA AGGAATTGAA GAAAATATAA CACCTTACAC CCTTTTTTCA
2701 CTTGACATTA AAAGTCTGG CTAACCTTGG AATCCATTAG AGAAAAATCC TTGTCACCAG
2761 ATTCATTACA ATTCAAATCG AAGAGTTGTG AACTGTTATC CCATTGAAAA GACCGAGCCT
2821 TGTATGTATG TTATGGATAC ATAAAATGCA CGCAAGCCAT TATCTCTCCA TGGGAAGCTA
2881 AGTTATAAAA ATAGGTGCTT GGTGTACAAA ACTTTTTTATA TCAAAGGCT TTGCACATTT
2941 CTATATGAGT GGGTTTACTG GTAAATTATG TTATTTTTTA CAACTAATTT TGTACTCTCA
3001 GAATGTTTGT CATATGCTTC TTGCAATGCA TATTTTTTAA TCTCAAACGT TTCAATAAAA
3061 CCATTTTTTCA GATATAAAGA GAATTACTTC AAATTGAGTA ATTCAGAAAA ACTCAAGATT
3121 TAAGTAAAAA AGTGGTTTGG ACTTGGGAAC AGGACTTTAT ACCTCTTTTA CTGTAACAAG
3181 TACTCATTAA AGGAAATTGA ATGAAATTA AAAAAAAAAA

```

```

1  MIPFLPMFSL LLLLIVNPIN ANNHYDKILA HSRIRGRDQG PNVCALQQIL GTKKKYFSTC
61  KNWYKKSICG QKTTVLYECC PGYMRMEGMK GCPAVLPIDH VYGLGIVGA TTTQRYSDAS
121 KLREEIEGKG SFTYFAPSNE AWDNLDSDIR RGLSNVNVE LLNALHSHMI NKRMLTKDLK
181 NGMIIPSMYN NLGLFINHYP NGVVTVNCAR I IHGNQIATN GVVHVIDRVL TQIGTSIQDF
241 IEAEDDLSSF RAAAITSDIL EALGRDGHFT LFAPTNEAFE KLPRGVLERI mgDKVASEAL
301 MKYHILNTLQ CSESIMGGAV FETLEGNTIE I GCDGDSITV NGIKMVNKKD IVTNNGVIHL
361 IDQVLIPDSA KQVIELAGKQ QTFTDLVAQ LGLASALRPD GEYTLAPVN NAFSDDTLMS
421 DQRLLKLILQ NHILKVKVLI NELYNGQILE TIGGKQLRVF VYRTAVCIEN SCMEKGSKQG
481 RNGAIHIFRE I IKPAEKSLH EKLKQDKRFS TFLSLLEAAD LKELLTQPGD WTLFVPTNDA
541 FKGMTSEEKE ILIRDKNALQ NIILYHLTPG VFIGKGFEPG VTNILKTTQG SKIFLKEVND
601 TLLVNELKSK ESDIMTTNGV IHVVDKLLYP ADTPVGNDQL LEILNKLIKY IQIKFVRGST
661 FKEIPVTVYT TKIITKVVEP KIKVIEGSLQ PIKTEGPTL TKVKIEGEPE FRLIKEGETI

```

721 TEVIHGEPPII KKYTKIIDGV PVEITEKETR EERIITGPEI KYTRISTGGG ETEETLKLL
 781 QEEVTKVTKF IEGGDGHLFE DEEIKRLLQG DTPVRKLQAN KKVQGSRRRL REGRSQ

7.1.3 OSF-2-Sekretionssignal

Nukleotidsequenzvergleich:

5`-ATGATTCCCTTTTACCCATGTTTCTCTACTATTGCTGCTTATTGTTAACCCATAAACGCC-3` (human)

5`-ATGGTTCCTCTCCTGCCCTTATATGCTCTGCTGCTGCTGTTCCCTGTGTGATATTAACCCGCAAATGCC-3` (murin)

Proteinsequenzvergleich:

MIPFLPMFSLLLLLLVNPINA (human)

MVPLLPLYALLLLFLCDINPANA (murin)

7.2 Originaldaten zur endogenen OSF-2-Expression in Zelllinien und Primärzellen mittels Real Time-PCR

Tabelle 7.1: Real Time-Daten zur endogenen OSF-2-Expression

Zelllinie	C _t -Werte OSF-2	C _t -Werte RNA-POLII	C _t OSF-2/C _t RNA-POLII
CRL-1624	>36	19,95	-
Carey24	>36	19,99	-
Fadu	>36	19,05	-
H357	32,03	19,92	1,61
Detroit 562	31,88	19,23	1,66
CCL-30	>36	19,10	-
MG63	32,9	20,00	1,65
SaOs	>36	21,39	-
hOB18	20,65	22,09	0,93
hOB19	24,84	19,14	1,30
Ht29	>36	22,01	-
Caco-2	>36	21,52	-
H441	>36	19,99	-
ISO-HAS	33,18	21,54	1,54
Pancl	>36	18,96	-
SU8686	30,03	18,68	1,61
VSMC	32,94	18,84	1,75
A431	>36	19,98	-
293T	>36	19,87	-
Primärzellen	C_t-Werte OSF-2	C_t-Werte RNA-POLII	C_t OSF-2/C_t RNA-POLII
Tumorzellen	26,17	20,90	1,2521531
TAF	19,18	21,44	0,89

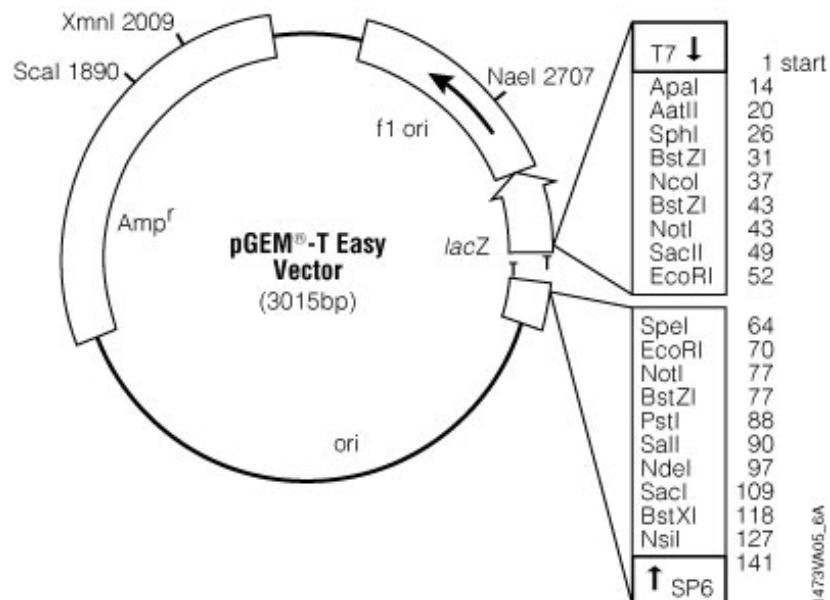
7.3 Originaldaten zur Auswirkung der OSF-2-Expression auf das Tumervolumen *in vivo*

Tabelle 7.2: Auswirkung der OSF-2-Expression auf das Tumervolumen *in vivo*

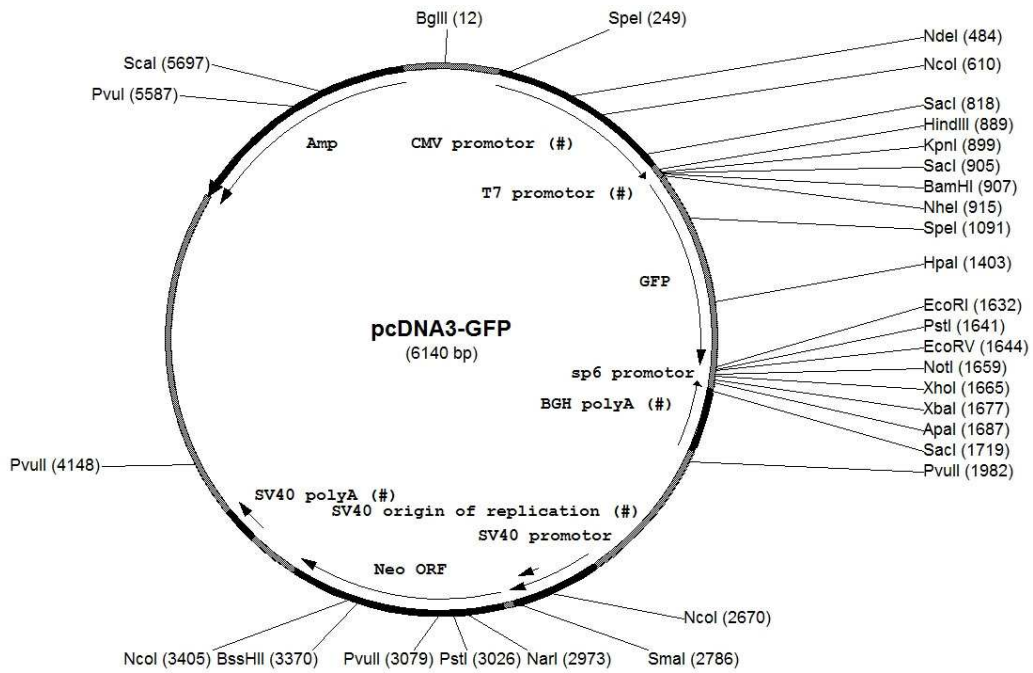
Injizierte Zellen	A431 OSF-2-GFP	A431 GFP	A431 OSF-2-ΔSek-GFP
Tumervolumen bei Tötung der Maus nach Versuche in cm ³	0,897	0,837	0,265
	1,415	0,452	0,968
	1,168	0,368	1,235
	0,654	0,68	0,575
	0,98	2,17	1,281
	0,791	0,575	2,893
	1,926	0,59	0,969
	1,799	1,186	0,618
	2,452	0,9	0,942
	1,172	2,144	0,794
	0,041	1,767	0,981
	1,039	0,022	1,268
Median	1,1035	0,7585	0,9685

7.4 Vektoren

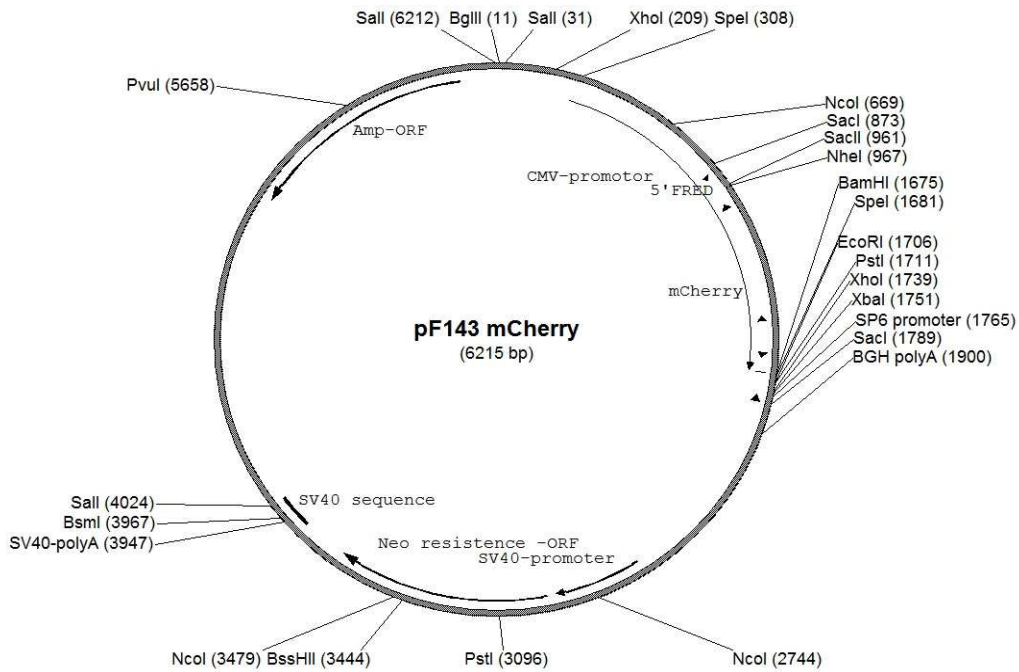
7.4.1 pGEM T easy (Promega, Mannheim)



7.4.2 pcDNA3 (+) (Invitrogen, Karlsruhe)



7.4.3 pF143-mCherry (ehemaliges Labor Prof. Stauber (Rosorius et al. 1999))



Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, den 10.11.2011

Andrea Schweitzer