

**Der Einfluss von Zigarettenrauchextrakt auf die  
Expression des *vascular endothelial growth  
factors* in Abhängigkeit von genomischen  
Varianten in Tumoren des respiratorischen  
Epithels**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie der

JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT

in Mainz

vorgelegt von Carmen Metzger

geboren am 25.08.1988 in Reutlingen

Mainz, 2016



Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2016













# Zusammenfassung

Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) wurde durch dessen Einfluss auf das Wachstum, Progression und Prognose in zahlreichen Krebsarten wie Lungenkrebs und Kopf-Hals-Karzinomen als ein wichtiger regulatorischer Faktor identifiziert. Beobachtungen weisen auf einen Zusammenhang der Wirksamkeit moderner Kombinationstherapien, bestehend aus einer angiogenen Therapie und Chemotherapie, mit Polymorphismen des VEGF-Gens hin. Obwohl eine klinische Relevanz postuliert wird, konnte bislang kein molekularer Mechanismus gefunden werden. Neben einem potenziellen Einfluss der Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs; engl.: *single nucleotide polymorphisms*) auf die Prognose und Therapie wird ein Einfluss des Rauchverhaltens der Patienten mit der Krankheitsentwicklung in Abhängigkeit der SNPs vermutet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in der Literatur postulierten potenziellen SNP-abhängigen Regulationsmechanismen auf molekularer Ebene untersucht. Durch die Lokalisation der SNPs in den regulatorischen Regionen werden für die Promotor-SNPs v.a. Mechanismen auf transkriptioneller Ebene sowie für SNPs in der 3'-UTR auf translationaler Ebene durch Stabilisierung der mRNA vermutet. Hierbei wurden die Tumorzelllinien A549 und HNSCCUM-02T mit Reporterkonstrukten, die Varianten des VEGF-Promotors sowie der 3'-UTR beinhalten, transfiziert. Im Folgenden wurde die Promotoraktivität sowie die mRNA-Stabilität in Abhängigkeit der SNPs mittels des Reportergens GFP analysiert.

Mittels Transkriptionsfaktor-Array wurden durch CSE-regulierte Transkriptionsfaktoren (TF) identifiziert. Für den mit der Tumorgenese assoziierten TF MZF1 konnte eine potenzielle Bindungsstelle am SNP +405 identifiziert werden. Die Bindungsspezifität des MZF1 in Abhängigkeit des SNPs +405 wurde mittels Co-ChIP analysiert.

Die Untersuchung der Promotoraktivität zeigte einen zelllinienabhängigen Einfluss der SNPs sowie verschiedener SNP-Haplotypen. Nach Inkubation der mit dem SNP -2578 A/C-Reporterkonstrukt transfizierten Tumorzelllinien mit CSE konnte kein signifikanter Unterschied der Promotoraktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gezeigt werden. Eine nicht signifikante erhöhte Promotoraktivität konnte nach CSE-Inkubation und Transfektion des SNPs -460 auf RNA und Proteinebene gezeigt werden. In der Zelllinie A549 konnte für den SNP +405 die niedrigste Expression beobachtet werden, während die Promotoraktivität nach Transfektion der Zelllinie HNSCCUM-02T die höchste Promotoraktivität aufweist.

Die Untersuchung des TF MZF1 hinsichtlich der SNP-abhängigen Bindungsspezifität zeigte ebenfalls einen zelllinienabhängigen Einfluss. In A549 wurde eine höhere

Bindungsspezifität für den SNP +405 G beobachtet, während kein Einfluss auf die VEGF-Expression gezeigt werden konnte. Nach Inkubation mit CSE wurde in der Zelllinie A549 für beide Genotypen eine erhöhte Bindungsspezifität beobachtet. Dabei ist die VEGF-Promotoraktivität nach MZF1-*knock down* und Inkubation mit CSE erhöht. Für die Zelllinie HNSCCUM-02T wurde in Gegenwart des SNP +405 G eine erniedrigte Bindungsspezifität gezeigt, während nach MZF1-*knock down* eine gesenkte Promotoraktivität beobachtet werden konnte. Nach Inkubation mit CSE konnte nach Transfektion der HNSCCUM-02T mit dem *wt* sowie dem SNP +405 eine erniedrigte, nach Transfektion des SNP +405 G eine erhöhte Bindungsspezifität gezeigt werden. Die CSE-abhängige VEGF-Expression resultiert nach Transfektion der HNSCCUM-02T mit SNP +405 G auf RNA-Ebene in einer erhöhten Promotoraktivität unabhängig eines MZF1-*knock downs*. Auf Proteinebene wurde diese Beobachtung nicht bestätigt.

Die mRNA-Stabilität in Abhängigkeit des 3'-UTR SNPs +936 T weist in A549 eine erhöhte Halbwertszeit (HWZ; +0,5 h) auf, während in HNSCCUM-02T keine SNP-Abhängigkeit beobachtet werden konnte. Auf Proteinebene hingegen wurde eine geringere Stabilität in Gegenwart des T-Allels beobachtet. Nach Inkubation mit CSE wurde für alle SNP-Genotypen in beiden Zelllinien eine kürzere HWZ beobachtet, wobei auf Proteinebene gegenläufige Tendenzen gezeigt wurden.

Zusammenfassend konnte für einzelne untersuchte SNPs sowie deren Haplotypen eine SNP- und CSE-abhängige Veränderung der Promotoraktivität in Abhängigkeit der Zelllinie beobachtet werden. Die Untersuchung der CSE-abhängigen Regulation auf transkriptioneller Ebene zeigte eine Hemmung zahlreicher TF in Gegenwart von CSE. Die Charakterisierung des TF MZF1 hinsichtlich eines Zusammenhangs mit VEGF, lässt einen möglichen Regulationsmechanismus vermuten. Die Hypothese eines veränderten Plasmaspiegels auf Grund veränderter mRNA-Stabilität in Abhängigkeit des 3'-UTR SNPs +936 C/T konnte in Rahmen dieser Arbeit bekräftigt werden, wobei in A549 für den SNP +936 T eine längere HWZ gezeigt werden konnte.

Diese Daten geben Hinweise auf einen SNP -460 C/T-abhängigen Mechanismus der VEGF-Regulation in Abhängigkeit exogener Faktoren wie Zigarettenrauch. Für die untersuchten SNPs -2578 A/C, +405 C/G und +936 C/T konnte kein Zusammenhang identifiziert werden.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Karzinome der Mundhöhle, des Rachens und der Lunge .....</i>	1
1.1.1	Das Mehrstufenmodell der Kanzerogenese .....	2
1.1.2	Die Angiogenese .....	4
1.2	<i>Der vascular endothelial growth factor (VEGF) .....</i>	6
1.2.1	Aufbau des VEGF A .....	7
1.2.2	Regulationsmechanismen des VEGF A-Gens .....	10
1.3	<i>Anti-VEGF-Therapie.....</i>	12
1.3.1	Wirkmechanismus von anti-VEGF-Therapien .....	12
1.3.2	Probleme der anti-VEGF-Therapie .....	14
1.4	<i>Einflussfaktoren der Tumorentstehung / -entwicklung.....</i>	14
1.4.1	Umwelteinfluss und Lebensstil .....	15
1.4.2	Genetische Variationen .....	17
1.5	<i>Epidemiologische Relevanz von VEGF-SNPs.....</i>	18
1.5.1	Der Promotor-SNP -2578 A/C (rs699947).....	19
1.5.2	Der Promotor-SNP -460 C/T (rs833061).....	20
1.5.3	Der Promotor-SNP +405 C/G (rs2010963).....	20
1.5.4	Der 3'-UTR-SNP +936 C/T (rs3025039).....	21
<b>2</b>	<b>Ziele der Arbeit.....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.1	<i>Material.....</i>	25
3.1.1	Geräte .....	25
3.1.2	Verbrauchsmaterial.....	26
3.1.3	Chemikalien .....	27
3.1.4	Zellkultur/Primärkultur.....	32
3.1.5	Plasmide und <i>E.coli</i> -Stämme.....	34
3.1.6	Software.....	37
3.2	<i>Methoden .....</i>	38
3.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	38
3.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	39
3.2.3	Zellbiologische Methoden .....	52
3.2.4	Proteinbiochemische Methoden .....	60
3.2.5	Statistische Auswertung .....	68
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>69</b>
4.1	<i>Untersuchung der VEGF-Expression.....</i>	69
4.1.1	SNP-abhängige VEGF-Promotoraktivität .....	69
4.1.2	Einfluss von CSE auf die SNP-abhängige VEGF-Promotoraktivität .....	71

---

4.1.3	Vergleich der Promotoraktivität der mit CSE inkubierten Zellen mit den unbehandelten Kontrollen in Abhängigkeit des Genotyps.....	72
4.1.4	SNP-abhängige VEGF-Expression und -Proteinkonzentration .....	76
4.1.5	Zytotoxizität von CSE .....	81
4.1.6	Regulation der VEGF-Promotoraktivität auf transkriptioneller Ebene .....	91
4.2	<i>Untersuchung der mRNA-Stabilität</i> .....	100
4.2.1	Untersuchung der CSE- und SNP-abhängigen mRNA-Stabilität .....	100
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>105</b>
5.1	<i>Einfluss von CSE auf die SNP-abhängige VEGF-Promotoraktivität</i> .....	105
5.1.1	SNP-abhängige VEGF-Promotoraktivität .....	105
5.1.2	Einfluss von CSE auf die SNP-abhängige VEGF A-Promotoraktivität .....	111
5.1.3	Einfluss von CSE auf Zellen des Atemtrakts .....	114
5.1.4	Einfluss von CSE auf die Migration/Invasion von Tumorzelllinien.....	116
5.1.5	CSE-abhängige Regulation der TF-Aktivität.....	118
5.1.6	Zusammenhang des Promotor-SNPs +405 und dem TF MZF1 .....	122
5.2	<i>SNP-abhängige Regulation der mRNA-Stabilität</i> .....	125
<b>6</b>	<b>Fazit und Ausblick</b> .....	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Referenzen</b> .....	<b>131</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Obere und untere Atemwege .....	1
Abbildung 2: Mehrstufenmodell der Kanzerogenese .....	3
Abbildung 3: Angiogenese.....	5
Abbildung 4: Bindungsspezifitäten der VEGF-Isoformen .....	7
Abbildung 5: Spleißvarianten des VEGF A-Gens.....	9
Abbildung 6: Posttranskriptionelle und translationale Regulation des VEGF A-Gens..	12
Abbildung 7: Therapeutische Ziele von anti-VEGF-Medikamenten.....	13
Abbildung 8: DNA-Adduktbildung mit B[a]P und tabakspezifische Nitrosamine .....	16
Abbildung 9: Lokalisation identifizierter VEGF-SNPs im Promotor und der 3'-UTR.....	19
Abbildung 10: Verwendete Reporterplasmide.....	34
Abbildung 11: Verwendete molekulare Standards. ....	41
Abbildung 12: Temperaturprofil VEGF A-Promotor-PCR .....	43
Abbildung 13: Temperaturprofil VEGF A-3'-UTR-PCR.....	44
Abbildung 14: Temperaturprofil CMV-Promotor-PCR .....	44
Abbildung 15: Prinzip des CRISPR/Cas-Systems.....	47
Abbildung 16: Verlauf der Etablierung von Zelllinien mit dem CRISPR/Cas-System...	47
Abbildung 17: Temperaturprofil des Annealingschritts .....	48
Abbildung 18: Temperaturprofil der SDM-PCR.....	50
Abbildung 19: Temperaturprofil der RT-PCR .....	50
Abbildung 20: Temperaturprofil der TaqMan-PCR.....	51
Abbildung 21: Transfektion der eukaryotischen Zellen mittels jetPRIME® Reagent ....	54
Abbildung 22: Gewinnung von CSE.....	56
Abbildung 23: Umsetzung des nicht-fluoreszierenden Resazurins in Resorufin.....	57
Abbildung 24: Invasionsassay .....	59
Abbildung 25: Durchführung des Scratch-Assays.....	60
Abbildung 26: Durchführung des GFP-ELISAs .....	62
Abbildung 27: Prinzip und Durchführung des Transkriptionsfaktor-Arrays .....	63
Abbildung 28: Plattenbelegung des Transkriptionsfaktor-Arrays.....	64
Abbildung 29: Durchführung des Co-ChIPs.....	66
Abbildung 30: Prinzip der Immunodetektion des Western Blots.....	68
Abbildung 31: Messung der SNP-abhängigen VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion mit VEGF-Promotor-SNP-Konstrukten.....	70
Abbildung 32: Messung der CSE- und SNP-abhängigen VEGF-Promotoraktivität.....	72
Abbildung 33: Messung des Einflusses von CSE auf die Promotoraktivität in Abhängigkeit des Genotyps .....	73

---

Abbildung 34: Messung der CSE-abhängigen Proteinkonzentration nach Transfektion der Zelllinien mit SNP-Promotorkonstrukten.....	75
Abbildung 35: Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären der Nasenschleimhautzellen .....	76
Abbildung 36: Messung der VEGF-Expression der primären Nasenschleimhautzellen nach Inkubation mit CSE.....	78
Abbildung 37: Messung der VEGF-Proteinkonzentration nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE .....	80
Abbildung 38: Messung der VEGF-Proteinkonzentration nach Inkubation der Zelllinien mit CSE.....	81
Abbildung 39: Messung der metabolischen Aktivität nach Inkubation der Zelllinien mit CSE .....	82
Abbildung 40: Messung der metabolischen Aktivität nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE .....	83
Abbildung 41: Messung der Vitalität nach Inkubation der Zelllinien mit CSE.....	84
Abbildung 42: Messung der Vitalität nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE .....	85
Abbildung 43: Messung der Lebendzellzahl nach Inkubation der Zelllinien mit CSE...	86
Abbildung 44: Messung der Lebendzellzahl nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE .....	87
Abbildung 45: Messung der Migration nach Inkubation der Zelllinien mit CSE.....	89
Abbildung 46: Messung der Invasion nach Inkubation der Zelllinien mit CSE .....	90
Abbildung 47: Bestätigung des TF-Arrays für MZF1 .....	93
Abbildung 48: Messung der SNP-abhängigen Bindungsspezifität von MZF1.....	95
Abbildung 49: Herabregulation des MZF1-TF durch siRNA .....	96
Abbildung 50: Messung der VEGF-Promotoraktivität nach MZF1- <i>knock down</i> .....	97
Abbildung 51: Messung der GFP-Proteinkonzentration nach MZF1- <i>knock down</i> und Inkubation mit CSE .....	99
Abbildung 52: Messung der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität (qRT-PCR) .....	101
Abbildung 53: Messung der GFP-Proteinkonzentration nach Transfektion und Inkubation mit CSE (GFP-ELISA).....	103
Abbildung 54: Messung der GFP-Proteinkonzentration nach Transfektion und Inkubation mit CSE (Western Blot).....	104

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Angiogeneseaktivatoren und -inhibitoren .....	4
Tabelle 2: Chemische Kanzerogene im Hauptstrom einer filterlosen Zigarette .....	16
Tabelle 3: Geräte.....	25
Tabelle 4: Verbrauchsmaterial.....	26
Tabelle 5: Chemikalien.....	27
Tabelle 6: Lösungen.....	29
Tabelle 7: Verwendete Kits.....	31
Tabelle 8: Verwendete Antikörper .....	32
Tabelle 9: Komplette Medien der Zellkulturen.....	32
Tabelle 10: Verwendete Zelllinien.....	33
Tabelle 11: Verwendete primäre Nasenschleimhautproben.....	33
Tabelle 12: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	34
Tabelle 13: Plasmide .....	35
Tabelle 14: Oligonukleotide .....	35
Tabelle 15: Verwendete Software.....	37
Tabelle 16: Ansatz der VEGF A-Promotor-PCR .....	43
Tabelle 17: Ansatz der 3'-UTR-PCR.....	44
Tabelle 18: Ansatz CMV-Promotor-PCR .....	44
Tabelle 19: Ansatz zur Ligation von DNA-Fragmenten in Reporterplasmide.....	45
Tabelle 20: Sequenzierungsprimer .....	46
Tabelle 21: Annealingansatz .....	48
Tabelle 22: Verdau des pCas-Guide-EF1a-GFP.....	48
Tabelle 23: Ligationsansatz.....	48
Tabelle 24: Transfektionsansatz.....	49
Tabelle 25: Ansatz der gezielten Mutagenese .....	50
Tabelle 26: Mastermix RT-PCR.....	50
Tabelle 27: Ansatz der qRT-PCR mittels TaqMan-Sonden.....	51
Tabelle 28: Eingesetzte Zellzahl und Volumina der Reaktionsansätze .....	53
Tabelle 29: Transfektionsansätze und –bedingungen.....	55
Tabelle 30: Messung der TF-Expression nach Inkubation mit CSE .....	92

## Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	3'-nicht-translatierte Region (engl.: <i>3'-untranslated region</i> )
5'-UTR	5'-nicht-translatierte Region (engl.: <i>5'-untranslated region</i> )
nAChR	Nikotinsäure-Acetylcholin-Rezeptor
Ang-2	Angiopeptin-2
AP	<i>activator protein</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AR	Androgenrezeptor
ARE	Adenin/Uracil-reiches Element
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein</i>
ASF	<i>alternative splicing factor</i>
bp	Basenpaar
Brn-3	<i>POU domain, class 4, transcription factor 1</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein, alpha</i>
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CAR	constitutive androstane Rezeptor
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
CBF	<i>CCAAT/enhancer binding protein, zeta</i>
CDP	<i>cut-like homeobox 1</i>
chron.	chronische
CIP	<i>calf intestinal alkine phosphatase</i>
CMV	<i>Cytomegalievirus</i>
Co-ChIP	Co-Chromatin-Immunopräzipitation
COUP-TF	<i>chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor</i>
COX	Cyclooxygenase
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRISPR	<i>clustered regulatory interspaced short palindrome repeats</i>
CSC	Zigarettenrauchkondensat (engl.: <i>cigarette smoke condensate</i> )
CSE	Zigarettenrauchextrakt (engl.: <i>cigarette smoke extract</i> )
cSNP	SNP in kodierender Region
C <sub>T</sub>	<i>cycle threshold</i>
CYP	Cytochrom P450
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E2F-1	<i>E2F transcriptionsfaktor 1</i>



---

ECL	<i>enhanced chemiluminescent substrate</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGR	<i>early growth response proteins</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELK	<i>ETS domain-containing protein Elk</i>
ER	Estrogenrezeptoren
ERE	<i>estrogen response elements</i>
EtOH	Ethanol
Ets	<i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1</i>
FAST-1 (FOXH1)	<i>forkhead box protein H1</i>
FCS	Fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i> )
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl.: <i>fibroblast growth factor</i> )
for	<i>forward</i>
FOXA1	<i>Forkhead box protein A1 (auch: hepatocyte nuclear factor 3-alpha (HNF-3A))</i>
FOXC1/D3/ G1/O1	<i>forkhead box protein C1/D3/G1/O1</i>
FREAC-2	<i>forkhead-related activator 2</i>
GAS/ISRE	<i>IFN-stimulated response element</i>
Gfi-1	<i>growth factor independent 1 transcription repressor</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gli-1	GLI Zink-Finger-Transkriptionsfaktor
gRNA	<i>guideRNA</i>
GR/PR	Glucocorticoidrezeptor/Progesteronrezeptor
HEN1 (NSCLC-1)	Basic Helix-Loop-Helix Protein 35
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor (engl.: <i>hepatocyte growth/scatter factor</i> )
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HNF	<i>hepatocyte nuclear factor</i>
hnRNP	heterogenes nucleares Ribionucleoprotein
HNSCC	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom (engl.: <i>head and neck squamous cell carcinoma</i> )
HOX4C/A-5	<i>HOX4C/A-5 homobox</i>
HPV	Humane Papillomviren
HRE	<i>hypoxia responsive element</i>

---

HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i> )
HSF	<i>heat shock factor</i>
HUVEC	humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (engl.: <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )
HWZ	Halbwertszeit
IL	Interleukin
IP	<i>interferon-gamma induced protein</i>
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle (engl.: <i>internal ribosomal entry site</i> )
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
KLF4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
MEF1/2	<i>myocyte enhancer factor 1/2</i>
Myb	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog
Myc/Max	<i>V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog/myc-associated factor X</i>
MyoD	<i>myogenic differentiation 1</i>
MZ	Millionen Zellen
MZF	<i>myeloid zinc finger</i>
NAC	N-Acetylcystein
NF-1	<i>nuclear factor 1</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-E2	<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Nkx2-5/3-2	<i>homeobox protein Nkx-2.5/3.2</i>
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNN	N-Nitrosornicotin
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NRF1	<i>nuclear respiratory factor 1</i>
Nrf2	<i>nuclear factor, erythroid 2-like 2</i>
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (engl.: <i>Non Small Cell Lung Cancer</i> )
Oct-1	<i>POU domain, class 2, transcription factor 1</i>
Oct-4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor
OD	optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster (engl.: <i>open reading frame</i> )

---

OSCC	Orales Plattenepithelkarzinom (engl.: <i>oral squamous cell carcinoma</i> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
Pax2/3/5/8	<i>pair box-2/3/5/8 protein</i>
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl.: <i>peripheral blood mononuclear cell</i> )
PBS	<i>Dulbecco's phosphat buffered saline</i>
Pbx1	<i>pre-B-cell leukemia transcription factor 1</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PECAM	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (engl.: <i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i> )
PFA	Paraformaldehyd
PHD	<i>prolyl hydroxylase domain</i>
Pit	<i>pituitary specific transcription factor 1</i>
PIT1	<i>POU class 1 homeobox 1</i>
PLAG1	<i>pleiomorphic adenoma gene 1</i>
PLGF	<i>placental growth factor</i>
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PRDM1	<i>PR domain zinc finger protein 1</i>
Prox1	<i>prospero homeobox protein 1</i>
P/S	Penicillin-Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> )
Rb	Retinoblastomprotein
rev	<i>reverse</i>
rez.	rezidivierende
RLU	<i>relative light unit</i>
RBP	RNA-Bindungsprotein
RNUX	<i>SL3-3 enhancer factor 1</i>
ROR (RZR)	<i>Retinoic acid receptor-related orphan</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i> )
rSNP	SNP in regulatorischer Region
RT	Raumtemperatur

---

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SATB1	<i>special AT-rich sequence binding protein 1</i>
SDM	Zielgerichtete Mutagenese (engl.: <i>site-directed mutagenesis</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SF-1	<i>Splicing factor 1</i>
SMUC	<i>snail-related transcription factor Smuc</i>
Snail	Zink-Finger-Protein Snail
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl.: <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOC	<i>super optimal broth with Catabolite repression</i>
SOX-18/2/9	<i>Sox protein 18/2/9</i>
Sp1	Sp1 Transkriptionsfaktor (eng.: <i>specifity protein 1</i> )
SRF	Serum-Response-Faktor
Srp49	<i>signal recognition particle 49</i>
SRY	<i>sex-determining region Y</i>
sSNP	SNP in für das Spleißen relevanter Region
Stat1/3/4/5/6	<i>signal transducer and activator of transcription 1/3/4/5/6</i>
T/E	Tris/EDTA
TAL1	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCF/LEF	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
TCF3	Transkriptionsfaktor 3
TEMED	Tetramethylethyendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TFE3	<i>transcription factor binding to IGHM</i>
TFIID	Transkriptionsfaktor IID
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (engl.: <i>transforming growth factor</i> )
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	<i>Thyroid hormone receptor</i>
U	Enzymeinheit

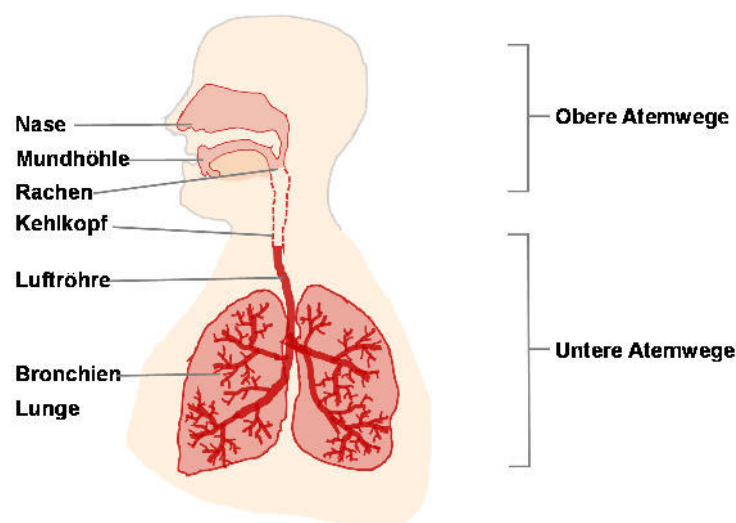
---

üN	über Nacht
USF-1	<i>upstream stimulatory factor 1</i>
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VE	<i>vascular endothelial</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
WT1	Wilms-Tumor-Transkriptionsfaktor 1
XBP-1	<i>X-box binding protein 1</i>
YY1	<i>Yin Yang 1 transcription factor</i>



# 1 Einleitung

Seit einigen Jahren sinkt die Krebsmortalität in Deutschland, wohingegen bei einigen Krebsarten wie beispielsweise Lungenkrebs bei Frauen steigende Sterberaten zu verzeichnen sind<sup>1,2</sup>. Im Zuge des demographischen Wandels wird bis 2030 ein stetiger Anstieg der Krebsneuerkrankungen erwartet, wobei für das Jahr 2012 in Deutschland 480.000 Neuerkrankungen geschätzt wurden. Die Krebslokalisation kann dabei als geschlechtsspezifisch angesehen werden<sup>1,2</sup>. Während die häufigsten Krebslokalisationen bei Männern die Prostata, die Lunge und der Darm darstellen, konnte bei Frauen vorwiegend Krebs der Brustdrüse und ebenfalls des Darms beobachtet werden<sup>1</sup>. Im Jahr 2012 erkrankten 47.000 Männer und 22.000 Frauen an Krebs der oberen (Kehlkopf, Mundhöhle und Rachen) bzw. unteren (Lunge) Atemwege (Abbildung 1)<sup>1</sup>. Mit diesen Krebserkrankungen der oberen und unteren Atemwege werden vor allem exogene Risikofaktoren (z. B. Alkoholabusus, Tabakkonsum und schlechte Mundhygiene) assoziiert<sup>1,2</sup>.



**Abbildung 1: Obere und untere Atemwege**

Krebserkrankungen der Lunge stellen bei Männern die häufigste, bei Frauen die zweithäufigste Krebstodesursache dar. An Karzinomen des oberen Atemtraktes (Erkrankungen der Mundhöhle, des Rachens und des Kehlkopfes) erkrankten im Jahr 2012 in Deutschland 9.300 Männer und 3.700 Frauen (verändert nach<sup>3</sup>).

## 1.1 Karzinome der Mundhöhle, des Rachens und der Lunge

Im Jahr 2012 erkrankten in Deutschland rund 53.000 Menschen an Lungenkrebs<sup>1</sup>. Lungenkrebs zählt zu der Krebserkrankung, die bei Männern die höchste, bei Frauen die zweithöchste Sterberate aufweist<sup>1</sup>. Grundlegend können zwei Arten von Lungenkrebs

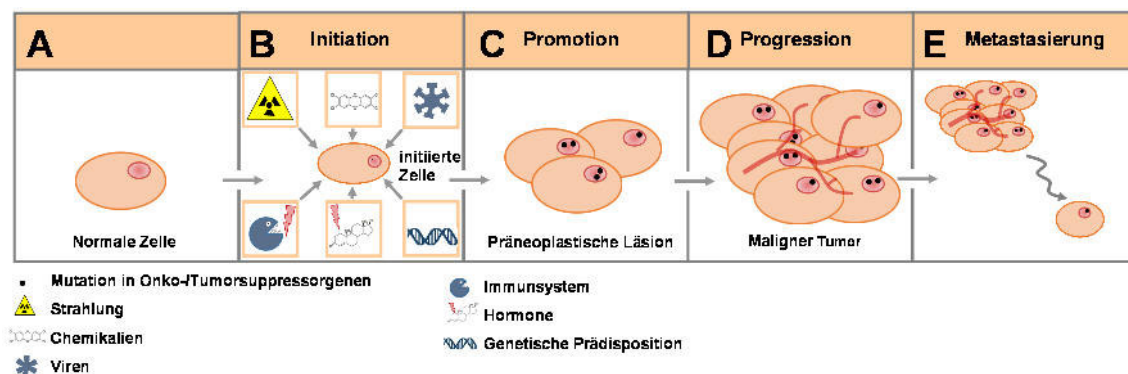
unterschieden werden, die sich nach deren Wachstumsgeschwindigkeit, Metastasierung sowie deren Prognose differenzieren: das kleinzellige sowie das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom. Das kleinzellige Bronchialkarzinom wächst schneller und neigt früher zur Metastasenbildung im Vergleich zu einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom. Letzteres kann weiter in drei verschiedene Erscheinungsformen unterteilt werden: Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom (häufigste Form bei Nichtrauchern) und großzellige Bronchialkarzinom<sup>2,4-6</sup>. Im Gegensatz zu Lungenkarzinomen treten Karzinome der Mundhöhle und des Rachens in Deutschland weniger häufig auf. Weltweit gesehen sind orale Karzinome jedoch v.a. in Schwellenländern ein großes Gesundheitsproblem<sup>2,7</sup>. Im Jahr 2012 konnten in Deutschland bei Männern 10.000, bei Frauen 5.900, Krebsneuerkrankungen der Mundhöhle und des Rachens geschätzt werden. Orale Karzinome stellen somit bei Männern die achthäufigste, bei Frauen die 16-häufigste Krebserkrankung dar<sup>1</sup>. Bei bösartigen Neubildungen des Kopf-Hals-Bereichs handelt es sich meist um Plattenepithelkarzinome und in nur ca. 5 % um Adenokarzinome. In Abhängigkeit der Lokalisation innerhalb der Erkrankungsgruppe ergeben sich unterschiedliche Überlebensprognosen. Hierbei können höhere 5-Jahres-Überlebensraten bei einer Erkrankung der Lippe oder der Speicheldrüsen beobachtet werden, wohingegen schlechtere 5-Jahres-Überlebensraten mit Erkrankungen des Rachens einhergehen<sup>1,2</sup>.

### 1.1.1 Das Mehrstufenmodell der Kanzerogenese

Bei der Kanzerogenese handelt es sich um einen mehrstufigen komplexen Entstehungsprozess von Tumoren bei dem Veränderungen auf molekularer und zellulärer Ebene beobachtet werden können<sup>4</sup>. Die Tumorentstehung ist dabei ein multifaktorieller Prozess der sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs sein kann<sup>5,8</sup>. Zu den exogenen Kanzerogenen zählen u.a. chemische Verbindungen (z. B. Nitrosamine, Benzo[a]pyren (B[a]P), Aflatoxine), physikalische Prozesse (z. B. Kälte, UV-Strahlung) oder biologische Noxen (z. B. Viren, Pilze, Bakterien)<sup>4</sup>. Als wichtige endogene Induktoren werden genetische Prädispositionen, eine gestörte Immunfunktion oder ein gestörter Hormonhaushalt beschrieben. In Folge von genetischen bzw. epigenetischen Veränderungen in mehreren für die Zellhomöostase verantwortlichen Genen kann es durch die genannten Faktoren zur Entstehung von Karzinomen kommen<sup>5</sup>. Im vereinfachten Konzept des Mehrstufenmodells kann die Kanzerogenese in drei Phasen unterteilt werden (Abbildung 2). Im ersten Schritt, der Initiation (Abbildung 2, A und B), erfolgt eine „kritische“ Mutation an Genen der Zellproliferation und/oder der Zelldifferenzierung. Durch die Veränderung einer normalen Zelle nimmt diese einen prämaligen Zustand an<sup>4</sup>. In der darauffolgenden Promotionsphase



(Abbildung 2, C) kann die Zelle durch chemische Tumorpromotoren oder Wachstumsstimuli einen selektiven Wachstumsvorteil erhalten, wodurch diese klonal amplifiziert wird. Es entstehen intermediäre Zellpopulationen, die zunehmend vom Phänotyp der Ausgangszelle abweichen. Durch die Vergrößerung der neoplastischen Zellklone kommt es in der Promotionsphase zur Entstehung gutartiger Tumoren, die durch deren hohe Stabilität des Karyotyps, deren langsames Wachstum und deren Beschränkung auf den Ort ihrer Entstehung charakterisiert sind<sup>4,5</sup>. In der abschließenden Progressionsphase (Abbildung 2, D) kann es durch weitere epigenetische und genetische Faktoren (z. B. weitere Mutationen, Aktivierung von Protoonkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen) zur Bildung von malignen Tumoren kommen. Die Zellen maligner Tumoren sind charakterisiert durch deren unkontrolliertes Wachstum, die Zerstörung von Nachbargewebe oder die Induktion von Bindegewebe, die Gefäßneubildung sowie der Fähigkeit zur Metastasierung (Abbildung 2, E)<sup>4,5,9</sup>. Tumorwachstum über eine bestimmte Größe hinaus, setzt eine Durchblutung des Tumors voraus, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten. Der Prozess der Gefäßneubildung aus bereits existierenden Gefäßen wird Angiogenese genannt und soll im Folgenden näher erläutert werden<sup>10-12</sup>.



**Abbildung 2: Mehrstufenmodell der Kanzerogenese**

Im vereinfachten Konzept der Kanzerogenese kann diese in drei unterschiedliche Phasen unterteilt werden. Im ersten Schritt der Initiation (B) kann durch eine kritische Mutation durch exogene Kanzerogene die normale Zelle (A) in einen initiierten Zustand versetzt werden (B). In der darauffolgenden Promotionsphase erhält die prä-maligne Zelle durch verschiedene Wachstumsstimuli und Tumorpromotoren einen selektiven Wachstumsvorteil (C). In der abschließenden Progression (D) können sich schließlich maligne Tumore ausbilden, die zur Metastasierung befähigt sind (E).

### 1.1.2 Die Angiogenese

Für das Tumorwachstum über eine bestimmte Größe hinaus sowie die Metastasierung von Tumoren ist die Neoangiogenese essentiell<sup>4,13</sup>. Bei der Gefäßbildung kann zwischen der Vaskulogenese und der Angiogenese unterschieden werden. Die Vaskulogenese bezeichnet dabei den Prozess der Gefäßneubildung durch Differenzierung der Endothelzellvorläufer (Angioblasten) in Endothelzellen, die schließlich das Gefäßnetz bilden. Die Angiogenese bezeichnet die Bildung neuer Gefäße aus bereits existierenden Blutgefäßen bzw. die Neuordnung bereits existierender Gefäße innerhalb des Gefäßnetzes<sup>14,15</sup>. Es handelt sich um einen komplexen, streng regulierten Prozess der durch zahlreiche proangiogene Faktoren bzw. Inhibitoren reguliert wird (Tabelle 1). Am Beispiel der Tumorangiogenese konnte gezeigt werden, dass die Vaskulogenese und die Angiogenese nicht immer streng voneinander abgegrenzt werden können<sup>15,16</sup>.

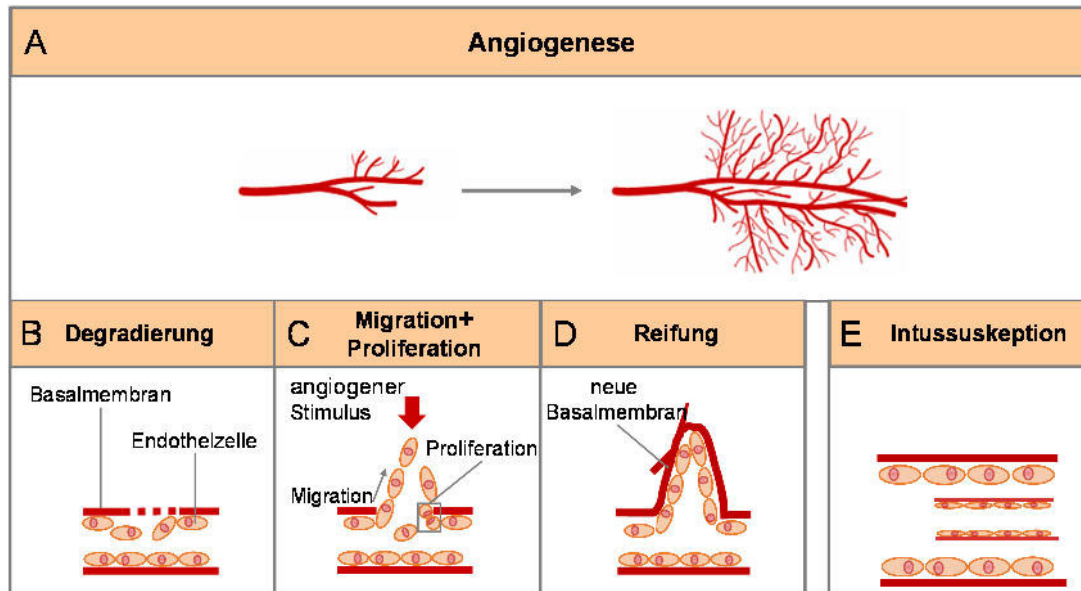
**Tabelle 1: Angiogeneseaktivatoren und -inhibitoren (verändert nach<sup>15</sup>)**

Aktivatoren	Inhibitoren
VEGF A, C	Neurophilin-1
VEGF-Rezeptoren	Angioeptin-2
Angioeptin-1/Tie-2-Rezeptor	Prothrombin kringle-2
TGF- $\beta$ 1 / TGF- $\beta$ -Rezeptoren	Interferon $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$
VE-Cadherin	Thrombospondin-1/-2
Ephrine	Angiostatin
FGF	Endostatin
Integrine $\alpha\beta$ 3/ $\alpha\beta$ 5/ $\alpha$ 5 $\beta$ 1	Vasostatin
PECAM	IP-10
HGF	IL-4/-12/-18
Matrixmetalloproteinasen	
Plasminogenaktivatoren	
NOS	
Cyclooxygenase-2	

Abkürzungen: FGF: Fibroblasten-Wachstumsfaktor; HGF: Hepatozyten-Wachstumsfaktor; IL: Interleukin; IP: *interferon-gamma induced protein*; NOS: Stickstoffmonoxid-Synthase; PECAM: Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül; TGF: Transformierender Wachstumsfaktor; VE: *vascular endothelial*.

Der Prozess der Angiogenese findet schrittweise in Abhängigkeit zahlreicher fester (z. B. Blei, Cadmium), gasförmiger (z. B. Hypoxie, Stickoxide, CO) wie auch flüssiger (z. B. Wachstumsfaktoren, Benzol) Signale statt<sup>4,17</sup>. Grundsätzlich können zwei verschiedene Mechanismen der Angiogenese unterschieden werden: die Sprossung von Endothelzellen (Abbildung 3, B-D) oder die Teilung des vorhandenen Gefäßlumens (Abbildung 3, E), die als Intussuskeption bezeichnet wird<sup>15,18</sup>. Die Bildung neuer Kapillaren aus bestehenden Blutgefäßen durch Sprossung der Endothelzellen wird als Antwort auf mehrere angiogene Stimuli initiiert. NO beispielsweise trägt zur erhöhten Expression des VEGF-Gens bei, wobei durch Reorganisation von Adhäsionsmolekülen (z. B. Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1) und VE-Cadherin)

die Gefäßpermeabilität erhöht wird. Hierdurch wird Angiopoietin-2 (Ang-2), ein Inhibitor der Tie-2-Signaltransduktion, zur Ablösung glatter Muskelzellen von Endothelzellen und Auflösung der extrazellulären Matrix und Migration der Endothelzellen angeregt (Abbildung 3, B).



**Abbildung 3: Angiogenese**

Die Angiogenese bezeichnet den streng regulierten Prozess der Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen bzw. der Reorganisation bestehender Gefäße. Der Prozess der Angiogenese (A) beginnt nach Initiation durch verschiedene angiogene Faktoren mit der Degradation der Basalmembran (B). Dieser Schritt ermöglicht die Migration und Proliferation der Endothelzellen in das Stroma (C). Im Anschluss kommt es zur Bildung eines soliden endothelialen Sprosses, der abschließend durch die Bildung von *tight junctions* und einer neuen Basalmembran zu einem intakten Gefäß heranreift (D). Eine Sonderform der Gefäßneubildung stellt die Intussuszeption dar. Hierbei kommt es zur Teilung eines bereits vorhandenen Gefäßlumens (E) (verändert nach<sup>15,18,19</sup>).

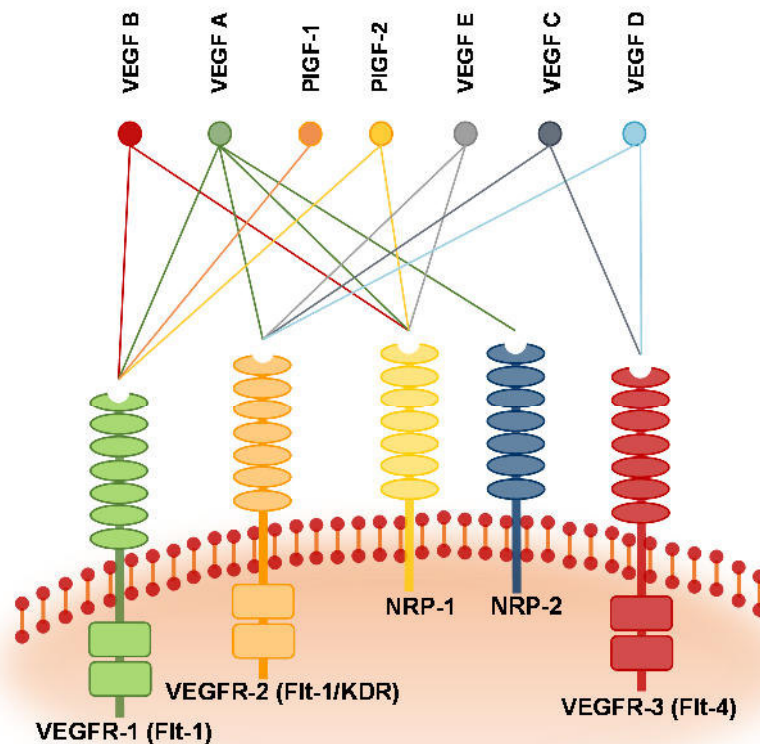
Durch die Auflösung der Matrix kommt es zur Produktion und Freisetzung von Proteasen (z. B. Matrixmetalloproteasen) die zur lokalen Degradation der extrazellulären Matrix beitragen und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren (z. B. VEGF, bFGF und IGF-1) ermöglichen. Nach der Auflösung der Basalmembran können sich Endothelzellen aus dem Verband lösen, in das umliegende Gewebe in Richtung des angiogenen Stimulus migrieren bzw. proliferieren und einen neuen Endothelspross bilden (Abbildung 3, C)<sup>18,20,21</sup>. In den weiteren Schritten der Angiogenese können andere angiogene Faktoren ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Der *Platelet-derived growth factor* (PDGF) rekrutiert Perizyten um wachsende Gefäßsprosse herum, wobei Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie die Proliferation von Endothelzellen stimulieren bzw. inhibieren<sup>22</sup>. Zur Ausreifung der entstandenen kapillaren Strukturen werden die Gefäße

mit periendothelialen Zellen (z. B. glatte Muskelzellen, Perizyten) stabilisiert und die Proliferation und Migration der Endothelzellen inhibiert, bevor es abschließend zur Ausbildung einer Basalmembran kommt (Abbildung 3, D)<sup>15,21</sup>. Bei der Ausbildung komplexer Gefäßnetzwerke durch Intussuskeption kommt es zur Spaltung einzelner mit Endothelzellen ausgekleideter Gefäße (Abbildung 3, E)<sup>15</sup>. Auch bei der Intussuskeption spielt der VEGF eine wichtige Rolle<sup>15</sup>. Eine gestörte Angiogenese resultiert in einem gesteigerten bzw. ungenügenden Kapillarwachstum und ist mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert. Die abnormale, gesteigerte vaskuläre Entwicklung wird häufig in pathologischen Zuständen wie der diabetischen Retinopathie, rheumatischen Arthritis oder solidem Tumorwachstum beobachtet<sup>14,15</sup>. Neben dem Tumorwachstum fördert die Angiogenese hierbei die Metastasierung der Tumore<sup>23,24</sup>.

## 1.2 Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF)

Der VEGF spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, Differenzierung des vaskulären Systems, Wundheilung und Reproduktion. Eine Schlüsselrolle des VEGF A in der Tumorbilogie wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht, wobei in verschiedenen Tumortypen erhöhte VEGF A-Plasmaspiegel beobachtet werden konnten<sup>10–12,25</sup>. Diese erhöhten Serumlevel können zudem mit einer größeren Tumorgroße, Lymphknotenmetastasierung und einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden, wodurch der VEGF als potenzielles Ziel in der Entwicklung von Antikrebstherapien dient<sup>10,16,23,26,27</sup>. Der VEGF ist ein dimerisches sowie Heparin-bindendes Glykoprotein das in vaskulären Endothelzellen als Mitogen fungiert und deren Zellteilung anregt<sup>10</sup>. Er wurde 1989 erstmals durch *Ferrara und Henzel* charakterisiert<sup>28</sup>. Die humane VEGF-Familie besteht aus sechs verschiedenen Mitgliedern: VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D und dem *placental growth factor* (PLGF) 1 und 2. Während die Typen A und B angiogene Eigenschaften besitzen, sind VEGF C und D an der Bildung von Lymphgefäßen beteiligt<sup>16,22,29</sup>. Die Faktoren der VEGF-Familie binden mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität an die Tyrosinkinase-Rezeptoren *vascular endothelial growth factor* Rezeptor (VEGFR)-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flt-1/KDR) und VEGFR-3 (Flt-4)<sup>16</sup>. Die Rezeptoren bestehen aus einer transmembranen Domäne, 7-Immunglobulin-ähnlichen Domänen und zwei intrazellulären Tyrosinkinase-Domänen<sup>16,22,29</sup>. Nach der Bindung des Liganden an die extrazellulären Domänen des Rezeptors kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung der intrazellulären Rezeptor-Tyrosinkinasen. Anschließend wird die Signalkaskade initiiert und das Wachstum, die Migration bzw. das Überleben von Endothelzellen reguliert<sup>16,22,29</sup>. Neben den VEGFR besitzen Neurophiline (NRP-1 und NRP-2) eine Affinität für unterschiedliche

VEGF-Isoformen und wirken hierbei als Korezeptoren. Für NRP-1 konnte eine Affinität der Isoformen VEGF A, B und E sowie PlGF-2 beobachtet werden. Als Ligand des NRP-2 konnte bislang nur der VEGF A beschrieben werden<sup>16,30</sup>. Der Schlüsselregulator der Angiogenese ist der VEGF A, dessen Funktion vor allem durch die Bindung an die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 vermittelt wird, welche hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert werden.



**Abbildung 4: Bindungsspezifitäten der VEGF-Isoformen**

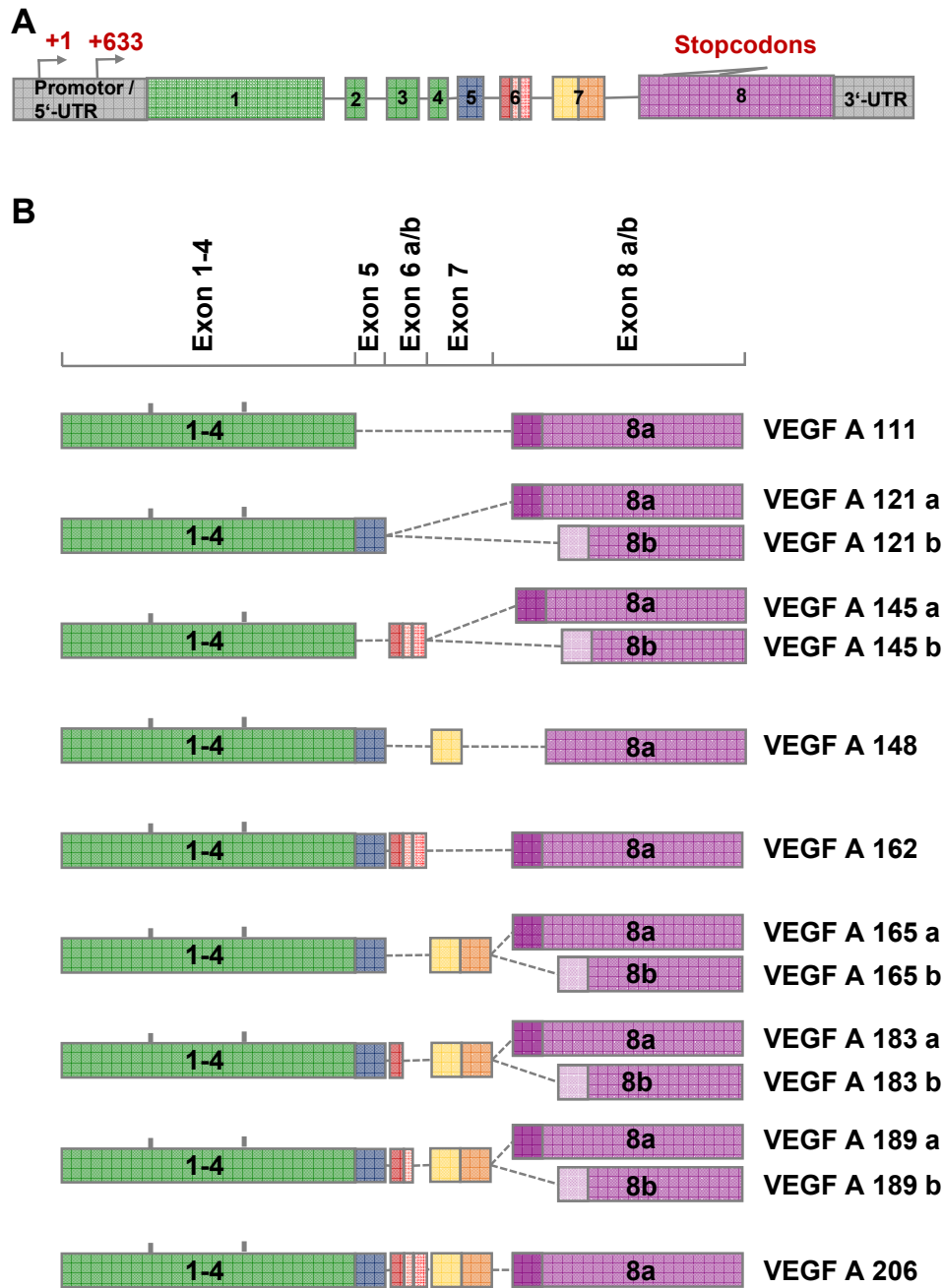
Die angiogenen Isoformen des VEGF (vorwiegend Isoformen A und B) binden mit hoher Affinität an die Rezeptoren VEGFR1 und NRP-1. Die Isoform A bindet zusätzlich an die Rezeptoren VEGFR-2 und NRP-2. An den VEGFR-2 binden weiter die Isoformen C-E, wobei die Isoformen C und D zusätzlich mit dem VEGFR-3 interagieren können. Die Isoform E bindet zusätzlich an den NRP-1. Die PlGF-1/2 sind mit dem Rezeptor VEGFR-1 und PlGF-2 zusätzlich mit dem NRP-1 assoziiert (verändert nach<sup>16,29</sup>).

### 1.2.1 Aufbau des VEGF A

Neben einer Rolle in der Angiogenese ist der VEGF A für zahlreiche physiologische Prozesse wie die Menstruation, Ovulation, Wundheilung und Wahrung des Blutdrucks essentiell<sup>16</sup>. Das humane VEGF-Gen befindet sich auf dem Chromosom 6p21.3, ist hochgradig polymorph und besteht aus acht Exons (Abbildung 5, A). Es handelt sich um ein dimerisches Glykoprotein, wobei durch alternatives Splicing und einer post-

translationalen Modifikation verschiedene Subtypen mit unterschiedlicher Aminosäureanzahl entstehen können (Abbildung 5, B)<sup>16,31–33</sup>. In den letzten Jahren konnte nachgewiesen werden, dass den unterschiedlichen VEGF-Subtypen unterschiedliche physiologische Aufgaben zuteilwerden. Der am häufigsten vorkommende und hauptsächlich für die Angiogenese verantwortliche Subtyp ist das VEGF A 165, der zugleich in zahlreichen humanen Tumoren überexprimiert wird. Weitere Hauptsubtypen sind VEGF A 121 und 189, wobei letzterer hauptsächlich membrangebunden vorliegt<sup>29</sup>. VEGF A 121 besitzt im Gegensatz zu 165 keine Heparin-Bindungsdomäne und unterstützt die Proliferation der Endothelzellen<sup>21</sup>. Die Spleißvarianten VEGF A 121 und 165 konnten mit einem vergrößerten Gefäßlumen in der Angiogenese in Verbindung gebracht werden, wohingegen das Lumen durch die Variante 189 verringert wird<sup>15</sup>. Darüber hinaus konnten die Subtypen VEGF A 145, 148, 183 und 206 charakterisiert werden, die sich wie auch die Hauptsubtypen 121, 165 und 189 durch ein alternatives Spleißen der Exons sechs und sieben entstehen<sup>34</sup>. Im Jahr 2002 konnten neben den bereits genannten Subtypen, die sogenannten b-Formen charakterisiert werden, die durch eine distale Spleißstelle des Exon 8 entstehen<sup>35</sup>. Die b-Subtypen unterscheiden sich von den a-Subtypen in den letzten sechs C-terminalen Aminosäureresten (a: CDKPRR; b: SLTRKD) und besitzen antiangiogene Eigenschaften<sup>21,34</sup>.

Vor der kodierenden Sequenz befindet sich die 5'-nicht-translatierte Region (5'-UTR), durch die mittels zweier alternativer Start-Codons die Transkription reguliert wird<sup>36,37</sup>. Der VEGF A verfügt über eine außerordentlich lange 5'-UTR (1038 bp) die neben zahlreichen Guanin und Cytosin-Basen, eine Vielzahl an Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren (TF) enthält<sup>36–38</sup>. Der 3'-Bereich des VEGF A-Gens enthält eine sogenannte 3'-nicht-translatierte Region (3'-UTR), die zahlreiche alternative Polyadenylierungssignale sowie Adenin/Uracil-reiche Elemente (ARE) enthält. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die ARE durch die Bindung von stabilisierenden und destabilisierenden Proteinen die mRNA-Stabilität beeinflussen<sup>39–41</sup>.



**Abbildung 5: Spleißvarianten des VEGF A-Gens**

Der VEGF besteht aus acht unterschiedlichen Exons. Durch ein alternatives Spleißen können verschiedene VEGF-Subtypen entstehen, die sich in deren biologischer Funktion unterscheiden. Alle bislang charakterisierten Subtypen bestehen aus den Exons 1-4 und 8. Der Subtyp 111 enthält neben den genannten Exons keine zusätzlichen Exons. Der Subtyp 121 enthält zusätzlich das Exon 5, wobei der Subtyp 148 zusätzlich das Exon 7 beinhaltet. Der Subtyp 145 wiederum besteht aus den Exons 1-4, 6 und 8, der Subtyp 162 verfügt zusätzlich über das Exon 5. Die in Tumoren am häufigsten auftretende Subtyp 165 ist aus den Exons 1-4, 7 und 8 aufgebaut, 183 zusätzlich aus Exon 6. In den Subtypen 189 und 206 sind alle Exons vertreten, wobei 189 nur über einen Teil des Exons 6 verfügt. Die Subtypen können nach deren angiogenen/nicht-angiogenen Eigenschaften anhand einer distalen Spleißstelle des Exon 8 unterschieden werden. Diese werden als a (angiogene Subtypen) und b (nicht-angiogene Subtypen) bezeichnet (verändert nach<sup>13</sup>).

## 1.2.2 Regulationsmechanismen des VEGF A-Gens

Die Regulation des VEGF-Gens ist hochkomplex und erfolgt sowohl auf transkriptioneller als auch translationaler Ebene. Die Regulation ist u.a. abhängig von anderen Wachstumsfaktoren, Lipopolysacchariden, Hormonen und Hypoxie<sup>27,36,37,42-44</sup>.

### 1.2.2.1 Transkriptionelle Ebene

Der G/C-reiche VEGF-Promotor (-88 bis -50 Basenpaare relativ zum Transkriptionsstart) enthält zahlreiche Bindungsstellen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren (TF). Es wurden potenzielle Bindungsstellen für die TF Sp1/3, AP1/2, EGR1, STAT3 und HIF1 identifiziert deren Funktionalität teilweise bestätigt werden konnte<sup>36,37,45</sup>. Eine Hochregulation der VEGF-Genexpression konnte bereits für die Faktoren der EGR Familie, des IGF 1, des HGF-Rezeptors, Tumornekrosefaktor (TNF), PDGF, AP1, Sp1 und HIF1 beschrieben werden<sup>46-48</sup>. Der sauerstoffabhängige TF HIF1 konnte als einer der wichtigsten TFs der VEGF-Genregulation identifiziert werden. HIF1 ist ein heterodimerisch aufgebauter Faktor, bestehend aus einer sauerstoffsensitiven Untereinheit  $\alpha$  und einer nicht-sauerstoffsensitiven Untereinheit  $\beta$ . Unter normoxischen Bedingungen hydroxyliert das *prolyl hydroxydase domain* Protein (PHD) die  $\alpha$ -Untereinheit des HIF1. Dessen hydroxylierte Form wiederum wird vom Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein erkannt, ubiquitiniert und anschließend Ubiquitinvermittelt degradiert. Unter hypoxischen Bedingungen dagegen ist das PHD inaktiv und inhibiert dadurch die Degradierung des HIF, wodurch dieser aktiv bleibt und die Expression zahlreicher Gene u.a. VEGF A initiiert<sup>16,49</sup>. Weiter konnte ein Regulationsmechanismus durch die SP-Proteinfamilie beschrieben werden. Vor allem SP1 spielt eine wichtige Rolle in der VEGF-Expression und der Tumorangio-genese<sup>47,50,51</sup>. Es konnte dabei beobachtet werden, dass das hohe Expressionslevel des SP1 mit erhöhten VEGF A-mRNA und Proteinkonzentrationen korreliert, die mit einer Wechselwirkung GC-reicher Elemente des VEGF-Promotors assoziiert sind. Neben SP1 konnte auch eine Rolle für SP3 und SP4 gezeigt werden<sup>51</sup>.

### 1.2.2.2 Posttranskriptionelle Ebene

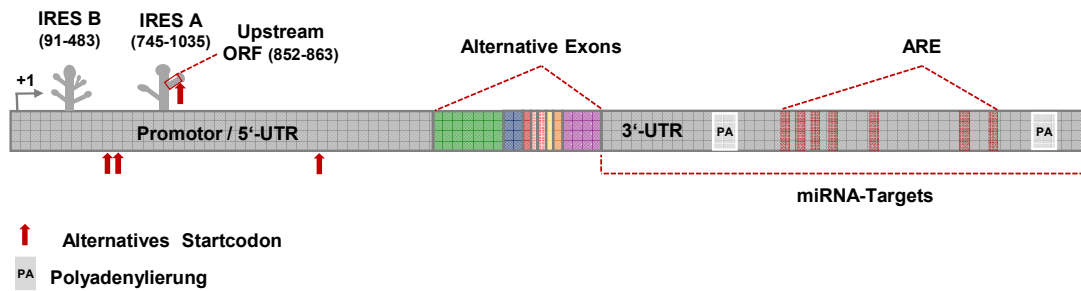
Die posttranskriptionelle Regulation spielt eine wichtige Rolle in der VEGF-Expression auf den Ebenen der mRNA-Stabilität oder einem alternativen Spleißen. Die VEGF A-mRNA ist mit einer Halbwertszeit von 1,6 h vergleichsweise instabil<sup>52</sup>, kann jedoch durch stabilisierende und destabilisierende Proteine und kurze nicht kodierende RNAs beeinflusst werden, die an die 3'-UTR des VEGF-Gens in sogenannten AU-reiche Regionen (ARE; *AU-rich elements*) binden<sup>53</sup>. Einige der bekanntesten ARE-



Bindungsproteine sind die Proteine der Hu Protein Familie (HuR, HuA, HuB, HuC und HuD), verschiedene Proteine der hnRNP Familie und der *ARE/Poly-(U) binding degradation factor* (AUF) <sup>17,54</sup>. Durch ein alternatives Spleißen können wie bereits erwähnt verschiedene Subtypen entstehen, die unterschiedliche Eigenschaften bezüglich deren extrazellulärer Lokalisation besitzen. Das alternative Spleißen ist durch verschiedene Spleißfaktoren wie ASF1 oder Srp49 reguliert<sup>33,55</sup>. Es konnte beobachtet werden, dass es in verschiedenen Krebsarten durch alternatives VEGF-Spleißen zur Deregulation der pro- bzw. antiangiogenen Subtypen kommen kann<sup>17</sup>.

### 1.2.2.3 Translationale Ebene

Nach der Transkription wird die transkribierte mRNA durch Bindung an verschiedene Bindeproteine oder regulatorische mRNAs wie zum Beispiel miRNAs an dessen Bestimmungsort transportiert. Im aktiven Zustand kann die mRNA durch Assoziation mit Polyribosomen translatiert werden. Im translational inaktiven Zustand dagegen wird die mRNA in sogenannten *P-Bodies* gelagert oder in den Exosomen abgebaut<sup>17</sup>. Die Kontrolle der Translation kann durch alternative Startcodons, interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES; engl.: *internal ribosome entry site*), offene Leserahmen (uORF), miRNA *targeting* und Riboswitch in der 3'-UTR erfolgen. Mi-RNAs sind eine Klasse kurzer (ca. 20 Nukleotide) nicht-kodierender RNAs, die an Sequenzen in der 3'-UTR spezifischer mRNAs binden können und dort hemmend auf die Translation wirken oder zum Abbau der mRNA führen<sup>17</sup>. Diese Klasse an RNA entsteht aus prä-miRNA die durch RNA-Polymerase II transkribiert und durch Exportin in das Cytoplasma eingeschleust werden<sup>17</sup>. Durch als Dicer bezeichnete Ribonuclease wird die prä-miRNA gespalten, wobei kurze doppelsträngige miRNAs entstehen<sup>17</sup>. Es konnte bereits beobachtet werden, dass VEGF die miRNA-Expression induziert, die wiederum an die VEGF-mRNA binden können und deren Translation beeinflussen<sup>17</sup>. Die miRNAs miR-20a/b, miR-106a/b, miR-16 und miR-15b binden an die 3'-UTR der VEGF-A mRNA und sind an der Koregulation einiger angiogener Faktoren beteiligt<sup>13</sup>. Weiter konnten in der CG-reichen 5'-UTR der VEGF A-mRNA zwei IRES identifiziert werden. Die IRES A konnte hierbei 300 Nukleotide *upstream* des AUG-Startcodons, die IRES B 16 Nukleotide *upstream* eines alternativen Startcodons identifiziert werden<sup>13,33</sup>. In Stresszuständen ermöglichen IRES in der 5'-UTR die alternative Initiation der Translation des VEGF-Gens<sup>43,56,57</sup>.



**Abbildung 6: Posttranskriptionelle und translationale Regulation des VEGF A-Gens**

Neben einer Regulation der Transkription konnten Regulationsmechanismen des VEGF A-Gens auf posttranskriptioneller sowie translationaler Ebene identifiziert werden. Der VEGF A-Promotor verfügt über zwei interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES) sowie alternative Startcodons zur alternativen Initiation der Translation. In der 3'-UTR konnten bislang zahlreiche Bindungsstellen stabilisierender sowie destabilisierender Proteine in den ARE beobachtet werden. Die Translation kann zudem durch die Bindung von miRNAs beeinflusst werden (verändert nach<sup>13</sup>).

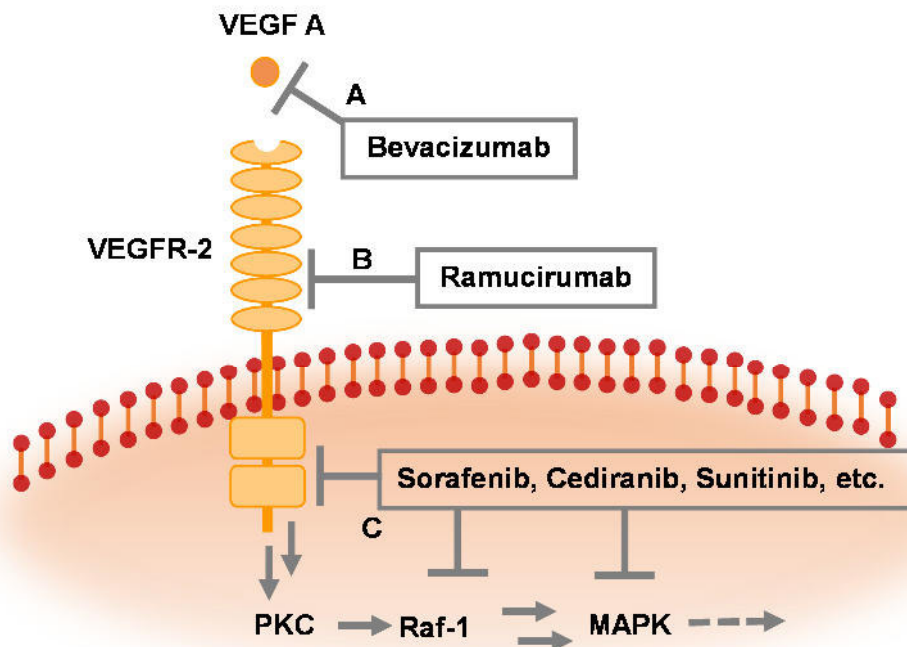
## 1.3 Anti-VEGF-Therapie

Wie erwähnt stellt die Tumorangiogenese einen essenziellen Prozess des Tumorwachstums dar. Das Ziel von herkömmlichen Therapien wie im Fall von Chemotherapien oder einer Radiotherapie ist die Tumorzelle selbst. Das Prinzip von antiangiogenen Therapien hingegen ist die Hemmung des Tumorwachstums durch die gehemmte Versorgung des Tumors<sup>23</sup>. Die Antiangiogenese-Therapie richtet sich dabei gegen das tumorassoziierte und proliferierende Gefäßendothel<sup>15,58</sup>. Eine erfolgreiche antiangiogene Therapie könnte die Behandlung von Tumoren weiterentwickeln. Im Fall von HNSCC beispielsweise konnte trotz zahlreicher Fortschritte in der Krebstherapie das Gesamtüberleben der Patienten nicht signifikant verbessert werden<sup>59</sup>. Auf Grund der Schlüsselrolle des VEGF A in der Tumorangiogenese wird im Folgenden auf die Anwendung und den wissenschaftlichen Stand von anti-VEGF-Therapien als Beispiel für die Antiangiogenese-Therapie eingegangen.

### 1.3.1 Wirkmechanismus von anti-VEGF-Therapien

In Tumoren wird VEGF A in zahlreichen Zellen (u.a. den Tumorzellen selbst), endothelialen Zellen und infiltrierenden myeloiden Zellen exprimiert<sup>16</sup>. Die eingesetzten Medikamente unterscheiden sich vor allem in deren Wirkmechanismus und Zielstrukturen. Man kann dabei zwischen Substanzen unterscheiden, die den VEGF-Liganden inhibieren, mit den VEGF-Rezeptoren interagieren oder mit der intrazellulären Signalkaskade wechselwirken<sup>16</sup>. Bevacizumab (Abbildung 7, A) und Ramucirumab (Abbildung 7, B) sind monoklonale Antikörper, die die Interaktion zwischen den Liganden

und den Rezeptoren inhibieren<sup>10,16</sup>. Sorafenib, Sunitinib und Cediranib hingegen sind Tyrosinkinaseinhibitoren die zum einen die VEGFR inhibieren jedoch zum anderen eine Affinität zu weiteren Tyrosinkinase-Rezeptoren zeigen (Abbildung 7, C). Dieses Fehlen der Spezifität kann mit vermehrten Nebenwirkungen einhergehen<sup>59</sup>.



**Abbildung 7: Therapeutische Ziele von anti-VEGF-Medikamenten**

Anti-VEGF Therapien können durch deren Ziel in drei Gruppen unterschieden werden. Bevacizumab (A) hemmt dabei direkt den Liganden (VEGF). Medikamente wie Ramucirumab interagieren mit dem VEGFR-2 (B) und Therapeutika wie Sorafenib und Cediranib beeinflussen die VEGF-downstream Signalkaskade (C) (verändert nach<sup>16</sup>).

### 1.3.1.1 Medikamente zur anti-VEGF-Therapie

Bevacizumab (Handelsname: Avastin<sup>®</sup>) hemmt die Bindung des löslichen VEGF A-Liganden an dessen Rezeptor, wodurch die VEGF A induzierte Angiogenese bzw. die Ausreifung neuer Kapillaren inhibiert wird. Bevacizumab wird hauptsächlich in Kombinationstherapien mit Chemotherapeutika eingesetzt und ist beispielsweise für fortgeschrittenen, inoperablen, metastasierenden oder rezidivierten Lungenkrebs und nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome außer Plattenepithelkarzinome in Kombination mit platinbasierter Chemotherapeutika zugelassen<sup>16,60</sup>. Bevacizumab befindet sich für die Behandlung von HNSCC in der klinischen Phase III ebenfalls in Kombination mit Chemotherapie<sup>59,61</sup>. Ramucirumab ist wie Bevacizumab ein monoklonaler Antikörper, der die Interaktion des VEGF-Liganden und dessen Rezeptor VEGFR-2 durch die

Blockierung der VEGF-Bindungsdomäne inhibiert. Ramucirumab zeigt Nebenwirkungen, die vergleichbar mit Bevacizumab sind<sup>16</sup>. Sorafenib stellt einen Tyrosinkinaseinhibitor dar, der seine antiangiogene Wirkung über die Hemmung intrazellulärer Signaltransduktion des VEGFR-2 vermittelt. Da Sorafenib die VEGF-vermittelte Angiogenese an mehreren Stellen hemmt, konnte in ersten Studien gezeigt werden, dass Sorafenib Signalwege beeinflusst, die nach einer Therapie mit Bevacizumab an den Resistenzen beteiligt sind<sup>16</sup>. Sorafenib ist zur Behandlung von Leberzellkarzinomen, Sunitinib zur Behandlung von Nierenkrebs und gastrointestinalen Stromatumoren zugelassen<sup>58</sup>. In HNSCC hingegen konnten in Phase II Studien nur geringe Erfolge der antiangiogenen Therapie nach Behandlung mit Sunitinib und Sorafenib verzeichnet werden<sup>61,62</sup>.

### 1.3.2 Nachteile der anti-VEGF-Therapie

Der Behandlungserfolg antiangiogener-VEGF-Therapien ist individuell unterschiedlich, sodass Biomarker zur Bestimmung von Patienten, die von anti-VEGF-Therapien profitieren können identifiziert werden müssen<sup>60,63</sup>. Zu den am häufigsten diskutierten Biomarkern gehören neben dem Her2-Rezeptorstatus, Hypertonie und die VEGF-Plasmakonzentration. Ein größerer Therapieerfolg konnte dabei bei erhöhten VEGF- und/oder VEGFR-2-Plasmaspiegeln beobachtet werden<sup>16</sup>. Neben dem individuellen Behandlungserfolg gehen anti-VEGF-Therapien oftmals mit verschiedenen Resistenzen einher. Die Folge einer Hochregulation alternativer Signalwege, Rekrutierung von Knochenmarkszellen mit pro-angiogenen Eigenschaften, dem erhöhten Schutz durch Perizyten kann eine aktivierte Invasion und Metastasierung sein<sup>58</sup>. Neben den individuellen Behandlungserfolgen stellen die während der Tumorangiogenese oftmals nicht ausreichend ausgereiften Gefäßnetzwerke ein weiteres Problem dar. Aus diesem Grund ist der Tumor durch eine heterogene Durchblutung gekennzeichnet, die eine effiziente Applikation von antineoplastischen Medikamenten erschwert<sup>15,16</sup>. Ein Ziel zukünftiger antiangiogener Therapien kann dabei mittels des Normalisierungsmodells beschrieben werden, wobei durch die antiangiogene Therapie die abnormalen Blutgefäße des Tumors normalisiert werden und es zu einer erhöhten Medikamentenversorgung des Tumors kommen kann<sup>59</sup>.

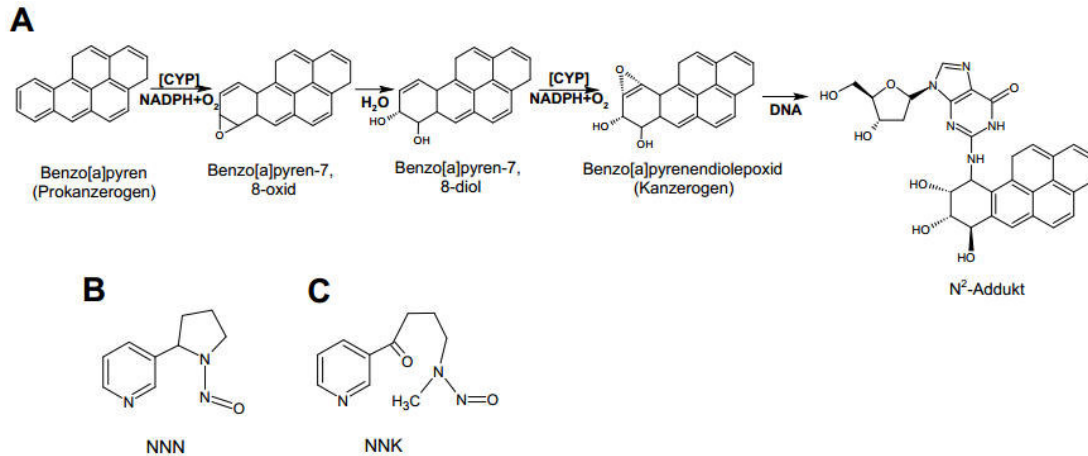
## 1.4 Einflussfaktoren der Tumorentstehung / -entwicklung

Im Rahmen epidemiologischer Beobachtungen konnten die intrinsischen Faktoren (z. B. Alter oder Geschlecht) sowie die extrinsischen Kanzerogene wie regelmäßiger Alkoholkonsum und Tabakkonsum als bedeutendste Einflussfaktoren einer

Lungenkrebserkrankung und der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren identifiziert werden<sup>7</sup>. In zahlreichen Studien konnten darüber hinaus Hinweise eines Zusammenhangs genetischer Veränderungen und der Kanzerogenese verschiedener Tumore beobachtet werden<sup>23,64–71</sup>.

#### 1.4.1 Umwelteinfluss und Lebensstil

Zigarettenrauch ist assoziiert mit zahlreichen Krankheiten, die mit der Gefäßneubildung einhergehen wie Krebs, kardiovaskuläre Krankheiten und Makuladegeneration<sup>72</sup>. Nach Schätzungen des Zentrums für Krebsregisterdaten konnten 2008 15 % der Krebserkrankungen mit dem Tabakkonsum der Patienten in Verbindung gebracht werden. Es konnte zudem beobachtet werden, dass der Anstieg der Erkrankungsrate von Frauen an Lungenkrebs eine Folge der veränderten Rauchgewohnheiten ist<sup>2</sup>. Auch in Kopf-Hals-Tumoren zählt Zigarettenrauch zu den wichtigsten Risikofaktoren einer Tumorentstehung<sup>7</sup>. Neben den 5000 bis 8000 im Zigarettenrauch identifizierten Verbindungen zählen mehr als 20 Verbindungen zu den von der Internationalen Agentur für Krebsforschung als kanzerogen (Gruppe 1) eingestufte Verbindungen<sup>7,73–75</sup>. Neben kanzerogenen Aldehyden wie Formaldehyd und Acetaldehyd sind im Hauptstrom einer Zigarette verschiedene Metalle, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und N-Nitrosamine, wie die tabakspezifischen Nitrosamine N-Nitrosornicotin (NNN; Abbildung 8, C) und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK; Abbildung 8, B), vertreten (Tabelle 2). Die meisten zytotoxischen Effekte (z. B. auf Lungen- und Immunzellen) konnten hierbei den chemischen Verbindungen der Gasphase zugeschrieben werden<sup>75,76</sup>. Sechs der im Zigarettenrauch identifizierten Verbindungen (u.a. B[a]P, NNK und NNN) bilden mit der DNA DNA-Addukte (Abbildung 8, A)<sup>72</sup>.



**Abbildung 8: DNA-Adduktbildung mit B[a]P und tabakspezifische Nitrosamine**

Im Zigarettenrauch konnten sechs Verbindungen identifiziert werden, die mit der DNA sogenannte DNA-Addukte bilden können (z. B. B[a]P) (A). B[a]P wird hierbei zunächst CYP-abhängig von einem Präkanzerogen zu B[a]P-endioloxyd, dem eigentlichen Kanzerogen aktiviert. Im Anschluss können reversible Addukte mit der DNA gebildet werden. In Tabakrauch konnten tabakspezifische Nitrosamine identifiziert werden, die aus deren Vorläufer Nikotin entstehen können. In der Abbildung sind exemplarisch die Strukturformeln der am häufigsten vorkommenden tabakspezifischen Nitrosamine NNN (B) und NNK (C) dargestellt (verändert nach<sup>77</sup>).

Zu den hydrophilen Verbindungen des Zigarettenrauchs zählen neben Nikotin, eine der aktivsten und „süchtigmachende“ Komponente, Metalle, verschiedene Oxidanzien und freie Radikale<sup>72,78</sup>.

**Tabelle 2: Chemische Kanzerogene im Hauptstrom einer filterlosen Zigarette (verändert nach<sup>7</sup>)**

Chemische Kanzerogene	Gehalt in Zigarettenrauch
<b>Aldehyde</b>	
Formaldehyd	70-100 µg
Acetaldehyd	500-1400 µg
<b>N-Nitrosamine</b>	
N-Nitrosodimethylamin	2-1000 ng
N-Nitrosodiethylmamin	bis 2,8 ng
N-Nitrosopyrrolidin	3-110 ng
N'-Nitrosornicotin (NNN)	45-58000 ng/g
4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK)	bis 10 µg/Zigarette
<b>Metalle</b>	
Nickel	bis 600 ng
Cadmium	7-350 ng
Arsen	40-120 µg
<b>Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe</b>	
Benzo[a]pyren	20-40 ng
Benzo[a]anthracen	20-70 ng
Benzo[b]fluoranthene	4-22 ng
Dibenzo[a,l]pyren	1,7-3,2 ng
Dibenzo[a,h]anthracen	4 ng

Nikotin wurde hinsichtlich dessen Einflusses auf die Angiogenese und VEGF-Expression bereits umfassend untersucht. Hierbei verbessert Nikotin in verschiedenen Tiermodellen, hauptsächlich über den Nikotinsäure-Acetylcholin-Rezeptor (nAChR) vermittelt, die Angiogenese und steigert die VEGF-Expression<sup>72,79</sup>. Zu den weiteren Einflussfaktoren der Tumorentstehung durch den Lebensstil konnten Übergewicht oder ernährungsbedingte Faktoren wie ein geringer Verzehr von Obst und Gemüse, Alkoholmissbrauch oder auch ein hoher Verzehr von rohem Fleisch beschrieben werden<sup>10,80</sup>. Des Weiteren konnte ein multiplikativer Effekt bei Alkoholabusus und zusätzlichem Tabakkonsum beobachtet werden<sup>81</sup>. Ein Mechanismus ist vermutlich die veränderte orale Mikroflora durch das Rauchen, die nach der Aufnahme von Alkohol eine gesteigerte Acetaldehydproduktion mit sich bringt<sup>81,82</sup>. In den letzten Jahrzehnten konnten zudem chronische Infektionen für einige Krebsarten als Risikofaktoren identifiziert werden<sup>2</sup>. Das humane Papillomavirus (HPV) konnte mit der Krebsentstehung im oberen Aerodigestivtrakt assoziiert werden. Insbesondere der Subtyp HPV16 integriert dabei das Virusgenom in das Genom der Wirtszelle, sodass die Onkogene E6 und E7 von der Wirtszelle synthetisiert werden. E6 und E7 wiederum führen zur Inaktivierung der Tumorsuppressorgene Retinoblastomprotein (Rb) und p53 in deren Folge u.a. die Apoptose gehemmt wird<sup>5</sup>. Neben den vermeidbaren Risikofaktoren durch Umwelteinflüsse oder dem Lebensstil können auch genetische Veränderungen das Risiko einer Krebsentstehung verändern<sup>2</sup>.

#### 1.4.2 Genetische Variationen

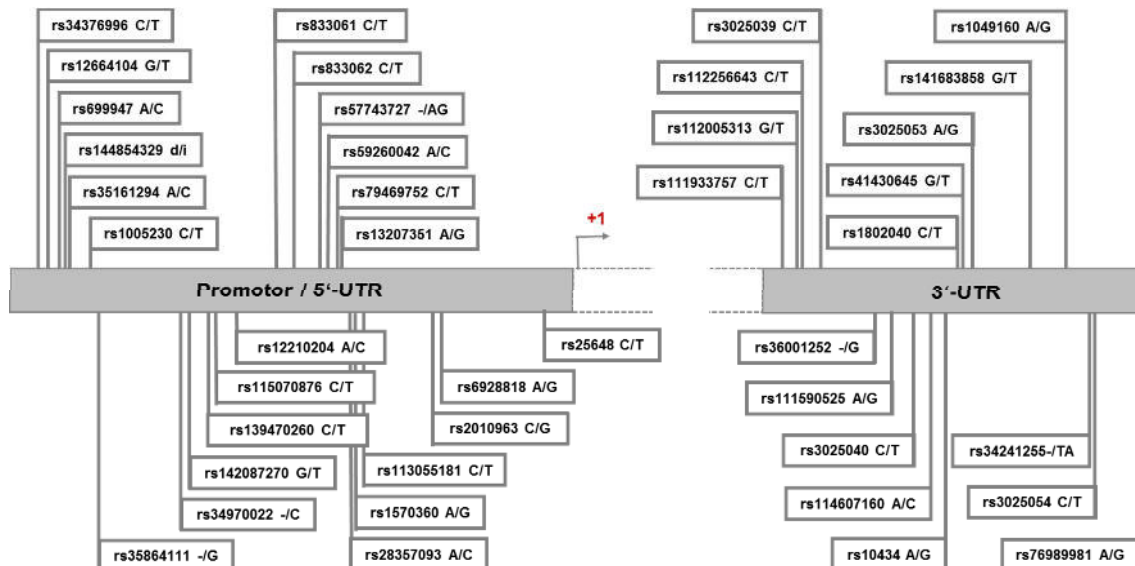
Genetische Variationen können einen signifikanten Einfluss auf die individuelle Variabilität bezüglich der Anfälligkeit und Schwere von Krankheiten haben<sup>83,84</sup>. Sogenannte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP; engl.: *single nucleotide polymorphism*) kommen bei mindestens 1 % der Bevölkerung vor und machen ca. 90 % der Genvariationen im menschlichen Genom aus. Die Mehrzahl der beobachteten SNPs beeinflussen die Zellfunktion nicht, wobei einige in der Literatur mit Erkrankungen korrelierend beschrieben werden konnten<sup>23,64–71</sup>. Epidemiologische Studien zeigen zudem, dass spezifische SNPs die Prognose sowie die Resistenz gegenüber Therapien beeinflussen, wodurch das Verständnis des Regulationsmechanismus wertvoll für die medizinische Forschung und Diagnostik wichtig wäre<sup>23</sup>. SNPs können abhängig von deren Lokalisation in der DNA-Sequenz in drei verschiedene Untergruppen unterteilt werden. In die sogenannten cSNPs in kodierenden Regionen, rSNPs in regulatorischen Regionen und sSNPs in für das Spleißen relevanten Regionen<sup>23,85</sup>. In „*large scale studies*“ wurden krankheitsrelevante SNPs vor allem in nicht-kodierenden genomischen

Regionen beobachtet. Diese Beobachtung lässt einen Effekt auf die Genfunktion über einen Mechanismus auf transkriptioneller und translationaler Ebene vermuten<sup>86-89</sup>.

## 1.5 Epidemiologische Relevanz von VEGF-SNPs

Bislang wurden im VEGF-Gen zahlreiche SNPs beschrieben, die vor allem im VEGF-Promotor und der 3'-UTR identifiziert werden konnten. In Abbildung 9 ist die Lokalisation der im VEGF-Promotor und der 3'-UTR beschriebenen SNPs dargestellt. Für 24 der im VEGF-Promotor identifizierten Polymorphismen konnte bereits ein Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten beschrieben werden. In der 3'-UTR wurden bereits 17 der identifizierten SNPs hinsichtlich eines Zusammenhangs untersucht (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Datum: 28.12.2015). Epidemiologische Daten zeigen einen Zusammenhang zwischen zahlreichen VEGF-SNPs und einer Vielzahl humaner Krebsarten. Neben einem potenziellen Zusammenhang mit der Krebsentstehung fokussiert sich die medizinische Forschung zudem auf die Untersuchung des Einflusses der charakterisierten SNPs auf die Krebstherapie, da ein therapeutischer Erfolg möglicherweise ebenfalls im Zusammenhang mit den VEGF A-Promotor-SNPs steht<sup>90</sup>. Für spezifische SNPs des VEGF-Gens konnten hierbei unterschiedliche Behandlungserfolge einer Bevacizumab-Therapie beobachtet werden<sup>91</sup>.





**Abbildung 9: Lokalisation identifizierter VEGF-SNPs im Promotor und der 3'-UTR**

Die Mehrzahl der bereits identifizierten VEGF-SNPs befindet sich in den regulatorischen Regionen des Gens. So konnten im VEGF-Promotor 24 SNPs identifiziert werden von denen 8 bereits mit Krankheiten assoziiert beschrieben werden konnten. In der 3'-UTR, die hauptsächlich für die mRNA-Stabilisierung verantwortlich ist, wurden 17 unterschiedliche SNPs gefunden (verändert nach<sup>23</sup>).

### 1.5.1 Der Promotor-SNP -2578 A/C (rs699947)

Eine gesteigerte Transkription bzw. eine erhöhte VEGF-Plasmakonzentration kann mit fortgeschrittenen Tumorstadien, einem kürzeren Gesamtüberleben und der Prognose von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC; engl.: *Non Small Cell Lung Cancer*) in Verbindung gebracht werden<sup>23</sup>. Der SNP -2578 A/C ist im VEGF-Promotor lokalisiert. Neben einer Assoziation mit unterschiedlichen Krebsarten konnte für den -2578 CC Genotyp eine geringere VEGF-Expression in NSCLC im Vergleich zum AC Genotyp beobachtet werden<sup>68</sup>. Zudem konnten in Lungenkrebs-Patienten geringere Gefäßdichten bei Trägern des -2578 CC-Genotyps im Vergleich zu Patienten mit dem Genotyp CA gezeigt werden<sup>68</sup>. Eine Meta-Analyse mit 1596 Lungenkrebspatienten und 1857 gesunden Kontrollen weist insbesondere unter Rauchern auf ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko hin<sup>92</sup>. Im Rahmen einer Kohortenstudie wurde der -2578 AC-Genotyp allein und in Kombination mit anderen relevanten SNPs mit oralen Plattenepithelkarzinomen assoziiert<sup>67</sup>. Weitergehend konnte in einer Studie von Supic *et al.* (2012) gezeigt werden, dass der Genotyp CA vermehrt in OSCC-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet wird<sup>14</sup>. Zunächst wurde ein potenzieller Regulationsmechanismus über eine Bindungsstelle des HIF1 $\alpha$ :ARNT-Dimers in Gegenwart des C-Allels beschrieben, da diese Bindungsstelle durch das

Vorhandensein eines A-Allels nicht existiert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der TF HIF-1 $\alpha$  unter hypoxischen Bedingungen das VEGF-Gen über das *Hypoxia responsive element* (HRE) reguliert und eine essentielle SNP-abhängige Regulation unter diesen Bedingungen ausschließt<sup>37,90</sup>. Weiter konnte beobachtet werden, dass Personen mit einem A-Allel an der Position -2578 zusätzlich über weitere 18 bp in der VEGF-Gen-Sequenz verfügen, die zusätzlich eine potenzielle Rolle in dessen Regulation spielen könnte<sup>93</sup>.

### 1.5.2 Der Promotor-SNP -460 C/T (rs833061)

Für NSCLC-Patienten mit den Genotypen -460 TT und CT wurde eine erhöhte Gefäßdichte im Vergleich zum Genotyp CC beobachtet<sup>94</sup>. Der -460 CT Genotyp wurde zudem vermehrt in OSCC Patienten identifiziert<sup>66</sup>. Zusätzlich konnte in Studien von Borase *et al.* (2014) sowie Ku *et al.* (2005) beobachtet werden, dass das -460 T-Allel häufiger in der OSCC-Patientengruppe identifiziert wird<sup>83,95</sup>. In einer Studie von Schneider *et al.* (2008) wurde gezeigt, dass rauchende Patienten mit einem -460 CC Genotyp ein erhöhtes Risiko haben an einem Ösophaguskarzinom zu erkranken<sup>91,96</sup>. Nicht-Raucher mit diesen Genotypen haben hingegen ein geringeres Risiko an dieser Krebsart zu erkranken als Nicht-Raucher eines anderen Genotyps<sup>96</sup>. Analog hierzu konnte eine erhöhte OSCC Inzidenz in Rauchern mit einem CT Genotyp beobachtet werden<sup>97</sup>.

### 1.5.3 Der Promotor-SNP +405 C/G (rs2010963)

Eine erhöhte VEGF-Produktion konnte in LPS-stimulierten mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl.: *peripheral blood mononuclear cell*; PBMC) gesunder Probanden für den Genotyp +405 GG beobachtet werden<sup>42</sup>. In NSCLC wird der Genotyp GC mit der höchsten VEGF-Expression in Verbindung gebracht<sup>68</sup>. In NSCLC-Patienten wurde für den Genotyp GG eine geringere Gefäßdichte im Vergleich zum Genotyp CC beobachtet<sup>68</sup>. In Männern scheint das +405 G-Allel ein erhöhtes Risiko mit sich zu bringen, an einem Adenokarzinom der Lunge zu erkranken<sup>23</sup>. Der Promotor-SNP +405 G/C zeigt in OSCC Patienten mit fortgeschrittener Krankheit ein signifikant schlechteres Überleben für den homozygoten Genotyp GG (HR=5.7) auf<sup>97</sup>. In einer Studie zur Untersuchung potenzieller Bindungsstellen konnte für das +405 C-Allel potenzielle Bindungsstellen für die TF *ETS domain-containing protein Elk-4* (ELK4), *interferon regulatory factor 2* (IRF2)<sup>99</sup> sowie GABP $\alpha$  und IF 1/2 identifiziert werden<sup>87</sup>. Das G-Allel hingegen verfügt über Bindungsstellen des SP1<sup>87</sup> sowie *PR domain zinc finger protein 1* (PRDM1), *Hepatocyte nuclear factor 4 gamma* (HNF4 $\gamma$ ) und *nuclear respiratory factor 1* (NRF1)<sup>99</sup>. Diese identifizierten potenziellen Bindungsstellen konnten in den

betreffenden Regionen bislang nicht mit dem VEGF-Gen assoziiert beschrieben werden. Des Weiteren wird ein möglicher regulatorischer Zusammenhang einer weiteren, durch das G-Allel geschaffenen, Bindungsstelle des TF *Myeloid zinc finger* (MZF1) postuliert<sup>42</sup>.

#### 1.5.4 Der 3'-UTR-SNP +936 C/T (rs3025039)

In gesunden Personen mit dem 3'-UTR-SNP +936 T-Allel wurde ein signifikant erniedrigtes VEGF-Plasmalevel beobachtet<sup>85,100</sup>. Weiter konnte in Lungenkrebs dieser SNP mit dem Auftreten von Lungenadenokarzinomen und einer gesteigerten Tumorgroße assoziiert werden<sup>92,101</sup>. Analog zu den Lungenkrebsstudien wurde das +936 T-Allel im Vergleich zu gesunden Kontrolle häufiger in OSCC-Patienten identifiziert<sup>67,102</sup>. Zudem konnte eine Meta-Analyse diese Ergebnisse bestätigen und ein erhöhtes Risiko an dieser Krebsart zu erkranken zeigen<sup>103</sup>. Der CC Genotyp hingegen kann mit fortgeschrittenen OSCC-Erkrankungen assoziiert werden, wobei bei Vorhandensein des C-Allels eine vaskuläre Invasion des OSCC beobachtet werden konnte<sup>85,104,105</sup>. Als ein potenzieller Mechanismus der SNP +936 Regulation wird ein Zusammenhang mit dem Verlust der AP4 Bindungsstelle in Gegenwart des T-Allels vermutet<sup>104,106</sup>.



## 2 Ziele der Arbeit

In der Literatur konnte eine Korrelation der VEGF A-Expression und spezifischer VEGF-Polymorphismen gezeigt werden, wobei deren funktioneller Zusammenhang bislang nicht bekannt ist. Des Weiteren konnte in einigen Studien ein Zusammenhang der VEGF A-SNPs und dem Rauchverhalten der Patienten beobachtet werden. Die Charakterisierung der Mechanismen der individuellen SNP-abhängigen VEGF A-Regulation sowie deren Zusammenhang mit exogenen Faktoren könnten sowohl für die Therapie als auch für die Prognosestellung essentiell sein.

Der Zusammenhang der VEGF A-Regulation mit dem jeweiligen Genotyp sowie der Noxe Zigarettenrauch sollte zunächst an primärer Nasenschleimhaut untersucht werden. Zur molekularen Untersuchung des Regulationsmechanismus und des Zusammenhangs der genetischen Variationen und dem Tabakrauch wurden Zelllinien des oberen sowie unteren Atemtrakts verwendet. Als Modell des oberen Atemtrakts wurde die Zungengrundkarzinomzelllinie HNSCCUM-02T, als Modell des unteren Atemtrakts die Lungenkarzinomzelllinie A549 untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

- Haben der VEGF-Genotyp sowie die Noxe Zigarettenrauch einen Einfluss auf die VEGF A-Expression primärer Nasenschleimhaut?
- Ist die VEGF A –Promotoraktivität abhängig von krankheitsassoziierten SNPs und der Noxe Zigarettenrauch?
- Haben die krankheitsassoziierten SNPs und die Noxe Zigarettenrauch einen Einfluss auf die VEGF A-mRNA-Stabilität?
- Welche potenziellen Regulationsmechanismen können auf transkriptioneller und translationaler Ebene beobachtet werden?



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

**Tabelle 3: Geräte**

Geräte	Hersteller
Autoklav 5050 ELV	Tuttauwer, Breda (Niederlande)
Biofreezer: HERAfreeze™	Kendro Laboratory Products, Hanau
Biometra® Tpersonal 48 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
BLAUBRAND®-Zählkammer (Neubauer)	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Blotter: Trans-Blot® Turbo™ Blotting System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Brutschrank Zellkultur: Heracell 150i CO <sub>2</sub> Incubators	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Bakterien: INE500	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
CoolCell® Gefrierbehälter	CryoShop, München
Einmalküvetten (1,5 ml)	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Eismaschine AF100	Scotsman, Mailand (Italien)
Fluoreszenzmikroskop: Eclipse TE2000-U	Nikon GmbH, Düsseldorf
Fluoroskan Ascent™ Mircoplate Fluorometer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham (USA)
Gefrierschränke Liebherr GP 1466 Premium Bosch Economic computer control	Liebherr Holding GmbH, Biberach Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München
Geldokumentation Multi Genius	Syngene, Cambridge (England)
Gelkammer (PAGE): Minigel-Twin G42	Biometra GmbH, Göttingen
Horizontalschüttler CERTOMAT® S-II KS 260 basic	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen IKS®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Kühlschränke Bosch cooler Liebherr Profi Line	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München Liebherr Holding GmbH, Biberach
Lichtmikroskop: invers TMS (5x/10x/20x/40x) Leitz 307-148.002	Nikon GmbH, Düsseldorf Leitz Messtechnik GmbH, Wetzlar
Luminoskan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
MACS® MultiStand	Milenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Magnetrührer: IKA MAG® REO	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Mikrowellenherd M730	Philips Deutschland GmbH, Hamburg
Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Multiskan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Nano Drop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
pH-Meter: Hydrus 300	Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough (England)
Pipetten (1 ml, 200 µl, 10 µl, 2,5 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettus®	Hischmann Laborgeräte, Eberstadt
Sonifizierer Sonoplus mini20/HD 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Sonorex Super RK 510H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin

Spannungsgeräte Model 1000/500 Constant Voltage Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spülmaschine Professional G7883CD	Miele, Gütersloh
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Sterilbank HeraSafe Safty cabinets	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Stickstofftank	CRYO-400, Chart Ind., Burnsville (USA)
Thermomixer Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifugen Fisherbrand Mini-Zentrifuge	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Transferpette® 8	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
UV/Visible Spektrophotometer: Ultrospec 3100 pro	Biochrom Ltd, Cambridge (England)
Vakuum Zentrifuge DNA plus	Heto-Holten A/S, Allerød (Dänemark)
Vortex Top-Mix 11118 Fisherbrand® VV3	Fisher Scientific GmbH, Schwerte VWR International, Radnor (USA)
Vortex Mixer CLASSIC	VELP®Scientifica, Usmate (Italien)
Waagen Kern Waage ABT 120-5DM Kern PCB 8000-1 Präzisionswaage Kern PCB 250-3	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Wasserbäder Bakterien: 2019 Multiheat Thermo- static Circulator Zellkultur: AQUATRON®	LKB Bromma, Stockholm (Schweden) INFORS HT, Bottmingen (Schweiz)
Zentrifugen Biofuge fresco Multifuge 1L-R Universal 16 R	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 4: Verbrauchsmaterial**

Verbrauchsmaterial	Hersteller
µDish <sup>35 mm</sup> Culture Insert	ibidi GmbH, München
µMACS Protein G MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Advanced TC Dish, steril, 60 x 15 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
BD Falcon™ Zellschaber	BD Bioscience, Bedford (England)
Cell culture dishes cellstar® 96-well Platte, schwarz, 15 mm REF 655090 µCLEAR	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmal-Wägeschalen	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Handschuhe Sempercare® premium	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.H., Wien (Österreich)
Sempercare® nitrile skin <sup>2</sup>	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.H., Wien (Österreich)
Kryoröhrchen, Cryo. S™	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikrozentrifugenröhrchen (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg



Parafilm „M“™ Laboratory Film	Pechiney, Chicago (USA)
PCR-Platten: Micro-Amp®Fast optical 96-well Reaction Plate	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Petrischalen:	
CELLSTAR® Cell Culture Dishes (145 mm, 94 mm, 35 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipetten: CELLSTAR® 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Polypropylen Röhrchen mit Zwei-Positionen Belüftungsstopfen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Quali-PCR-Tube-Streifen	G. Kisker, Steinfurt Sarstedt, Nümbrecht
Star-Tub Reagenzienreservoir	STARLAB GmbH, Hamburg
Sterilfilter Millex (0,22 µm)	Millipore Corporation, Billerica (USA)
<i>well</i> -Platten	
96-well:	
- 96-well Advanced TC™ Microplates (black, µClear®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- ELISA: Costar® 96-well EIA/RIA Plate	Corning Inc., Corning (USA)
24-well:	
- CELLSTAR® 24-well Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Falcon® 24-well Multiwell Plates	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
6-well:	
- CELLSTAR® 6-well Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Nuclon™ Delta Surface	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Zellkulturflaschen:	
CELLSTAR® Filter Cap Cell Culture Flasks (175 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 25 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellsieb (Primärkultur):	
EASYstrainer™ (70 µm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, Falcon cellstar® (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

### 3.1.3 Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
10x PCR Puffer	Life Technologies, Carlsbad (USA)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
2-Propanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
2x Quick Ligase Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Accutase® Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid (AA/Bis)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose	STARLAB GmbH, Hamburg
AlamarBlue® Cell Viability Reagent	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eiching
Alk. Phosphatase (CIP)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Annealing Buffer	OriGene Technologies, Inc., Rockville (USA)

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Chelex® 100 Resin	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CNT Prime Airway	CELLnTEC Advanced Cell System AG, Bern (Schweiz)
Cut Smart™ Buffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
D(+)-Glucose	Merck KgaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dispase II	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Dithiotheritol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DNA Marker 1kb/100bp	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
DNA-Polymerasen	
AmpliTaq® DNA-Polymerase	Life Technologies, Carlsbad (USA)
PfuUltra HF DNA Polymerase	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Dulbecco's phosphat buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (99 %; EtOH)	AppliChem, Inc., St. Louis (USA)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Formaldehyd (37 %)	Merck KgaA, Darmstadt
Gel Loading Dye (6x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung	Merck KgaA, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Igepal® CA-630	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Marlboro Gold	Philip Morris International Inc., Nex York, (USA)
May-Grünwald-Lösung	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
MgCl <sub>2</sub> (25 mM; RT-PCR)	Qiagen N.V., Venlo (Niederlande)
Milchpulver	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transcriptase 5x Puffer	Promega Corporation, Madison (USA)
Natriumacetat	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Nucleotide: dATP, dGTP, dTTP und dCTP (100 mM)	Promega Corporation, Madison (USA)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
pCas-Guide-EF1a-GFP	OriGene Technologies, Inc., Rockville (USA)
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Proteaseinhibitor-Cocktail (Tablette)	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz (Schweiz)
Proteinase K	Qiagen N.V., Venlo (Niederlande)
Puffer A (5x)	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Puffer E (5x)	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Puromycin	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Quick T4 Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Random Primers	Promega Corporation, Madison (USA)
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega Corporation, Madison (USA)

Restriktionsenzyme	
BamHI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
BsmB	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
DpnI	Promega Corporation, Madison (USA)
NotI	Promega Corporation, Madison (USA)
PmeI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
EcoRI	Promega Corporation, Madison (USA)
Reverse Transcription 10x Buffer	Applied Biosystems, Waltham (USA)
Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Salzsäure rauchend (37 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Schwefelsäure (95-97 %)	Merck KGaA, Darmstadt
SOB-Medium	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Sterillium classic pure	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Substrat reagent pack (ELISA)	R&D Systems Inc., Minneapolis (USA)
terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIS PUFFERAN®	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Tris/EDTA (T/E; 1M Tris/0,1M EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin/EDTA (T/E)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tween® 20	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
UltraPure H <sub>2</sub> O	Cayman Chemical Company, Ann Arbor (USA)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Tabelle 6: Lösungen

Mikrobiologische Methoden	
CaCl <sub>2</sub> -Lösung (100 mM)	11,09 g CaCl <sub>2</sub> ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
LB-Medium	25 g LB-Medium ad 1000 ml H <sub>2</sub> O; pH 7,0; autoklavieren
LB-Agar	25 g LB-Medium ad 1000 ml H <sub>2</sub> O; pH 7,0 15 g Agar-Agar autoklavieren
Ampicillin-Stocklösung	100 mg/ml Ampicillin in UltraPure H <sub>2</sub> O
SOB-Medium	26,64 g SOB-Medium ad 1000 ml H <sub>2</sub> O; pH 7,0; autoklavieren
SOC-Medium	180,16 mg Glucose ad 50 ml SOB-Medium
Molekularbiologische Methoden	
dNTP-Mix (10 mM each)	100 µl dATP (100 mM) 100 µl dGTP (100 mM) 100 µl dCTP (100 mM) 100 µl dTTP (100 mM) Ad 1 ml PCR-H <sub>2</sub> O
1 % Agarosegel	0,7 g Agarose 70 ml 1xTAE-Puffer 10 µl Ethidiumbromidlösung
TAE Stocklösung (50x)	242 g TRIS ad 750 ml H <sub>2</sub> O; 57,1 ml Essigsäure 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) ad 1000 ml H <sub>2</sub> O

EDTA-Lösung (0,5 M)	93,05 g EDTA-Dinatriumsalz ad 500 ml H <sub>2</sub> O; pH 8,0
TAE Stocklösung (1x)	20 ml TAE Stocklösung (50x) ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Zellbiologische Methoden</b>	
Dispase II-Lösung	80 mg Dispase II ad 10 ml PBS; Sterilfiltrieren
VEGF-ELISA Waschpuffer	500 ml PBS 0,25 ml Tween®20
VEGF-ELISA Stop-Lösung	2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
VEGF-ELISA Substrat-Lösung	Reagent A Reagent B 1:1
Tris/EDTA-Lösung (Zellkultur)	5 ml Tris/EDTA ad 50 ml H <sub>2</sub> O
TF-Assay	
Puffer I-Arbeitslösung	250 µl Puffer I 5 µl DTT 5 µl Protease-Inhibitor
Puffer II-Arbeitslösung	50 µl Puffer I 1 µl DTT 1 µl Protease-Inhibitor
Substratlösung	1 ml Substrat A 1 ml Substrat B 8 ml Substrat-Lösungspuffer
<b>Proteinchemische Methoden</b>	
Formaldehyd (1 %)	1,35 ml Formaldehyd (37 %) ad 50 ml H <sub>2</sub> O
Glycin (1M)	3,75 g Glycin ad 50 ml H <sub>2</sub> O
ChiP-Lysepuffer	0,88 g NaCl 1 ml Triton-X 100 0,79 g Tris-HCl 1 Tablette Proteaseinhibitor ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
Tris-HCl (2M)	31,52 g Tris-HCl ad 100 ml H <sub>2</sub> O; pH 6,8-7,5
LowSalt-Puffer	500 µl Igepal® CA 630 302,85 mg Tris-HCl ad 50 ml H <sub>2</sub> O
Elutionpuffer (Co-ChIP)	100 µl Tris-HCl (2M) 80 mg SDS 460 µl Glycerol 360 µl H <sub>2</sub> O
Natriumacetat (1M)	8,20 g NaOAc ad 100 ml H <sub>2</sub> O
Chelex-Lösung (10 %)	1 g Chelex® 100 Resin ad 10 ml H <sub>2</sub> O
Sammelgelpuffer	6,06 g TRIS Ad 100 ml H <sub>2</sub> O; pH 6,8
Sammelgel (3 %)	5,4 ml H <sub>2</sub> O 2 ml Sammelgelpuffer 600 µl AA/Bis 48 µl APS 16 µl TEMED
Trenngelpuffer	90,9 g TRIS Ad 500 ml H <sub>2</sub> O; pH 8,8
Trenngel (10 %)	8 ml H <sub>2</sub> O

	4 ml Trenngelpuffer 4 ml AA/Bis 80 µl APS 8 µl TEMED
SDS (10 %)	50 g SDS Ad 500 ml H <sub>2</sub> O
Transferpuffer	3,03 g TRIS 11,2 g Glycin in 400 ml H <sub>2</sub> O lösen 100 ml Methanol 3,7 ml SDS (10 %) ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
4x Lysepuffer (Western Blot)	0,8 g SDS 1 ml 2M Tris (pH 6,8-7,5) 4,6 ml Glycerin 2 ml H <sub>2</sub> O 2 Tabletten Proteasehemmer
Ladepuffer (SDS-Gelelektrophorese)	1 ml Lysepuffer 20 µl Bromphenolblau 160 µl 2,5 M DTT
10x TBS	24,2 g TRIS 80 g NaCl Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O; pH 7,6
1x TBST <sub>20</sub> -Waschpuffer	200 ml 10x TBS ad 2000 ml H <sub>2</sub> O 2 ml Tween®20
5x Laufpuffer	30 g TRIS 144 g Glycin Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
1x Laufpuffer	100 ml 5x Laufpuffer 5 ml SDS (10 %) ad 500 ml H <sub>2</sub> O
Strippingpuffer	1,88 g Glycin ad 1000 ml H <sub>2</sub> O; pH 2,0
<b>Zytotoxizität</b>	
Kristallviolett (2 %)	5 g Kristallviolett ad 250 ml H <sub>2</sub> O
Kristallviolett (0,2 %)	1 ml Kristallviolett (2 %) ad 10 ml PBS
Essigsäure (10 %)	900 ml H <sub>2</sub> O 100 ml Essigsäure (100 %)
<b>Migrations- und Invasionassay</b>	
2 % Giemsa-Lösung	1 ml Giemsa-Lösung ad 50 ml H <sub>2</sub> O

Tabelle 7: Verwendete Kits

Kits	Hersteller
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena
illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit	Qiagen N.V., Venlo (Niederlande)
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena
pGlow-TOPO® Expression Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena
DuoSet® Human VEGF	R&D Systems Inc., Minneapolis (USA)
TF Activation Profiling Plate Array II FA-1002	Signosis, Inc., Santa Clara (USA)

QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, (USA)
TF Activation Profiling Plate Array II FA-1002	Signosis, Inc., Santa Clara (USA)
LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Assay Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Nuclear Extraction Kit	Signosis, Inc., Santa Clara (USA)
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Venlo (Niederlande)

**Tabelle 8: Verwendete Antikörper**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Antikörperlösung</b>
GFP Antibody polyclonal	Cell Signaling, Boston (USA)	1:1000 in 5 % (w/v) Milchpulver in 1x TBST <sub>20</sub>
β-Aktin-Antikörper	Abcam, Cambridge (England)	1:10.000 in 5 % (w/v) Milchpulver in 1x TBST <sub>20</sub>
Anti-MZF1-Antikörper	Abnova Corporation, Taipei City (Taiwan)	1:500 in 5 % (w/v) BSA in 1x TBST <sub>20</sub>
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Antikörperlösung</b>
Anti-mouse Antibody, HRP-gekoppelt	Cell Signaling, Boston (USA)	1:5000 in 5 % (w/v) Milchpulver in 1x TBST <sub>20</sub>
Anti-rabbit Antibody, HRP-gekoppelt	Cell Signaling, Boston (USA)	1:5000 in 5 % (w/v) Milchpulver in 1x TBST <sub>20</sub>

### 3.1.4 Zellkultur/Primärkultur

#### 3.1.4.1 Zellkulturmedien

**Tabelle 9: Komplette Medien der Zellkulturen**

<b>Zelllinie</b>	<b>Medium mit Zusätzen</b>
A549 / HNSCCUM-02T	500 ml DMEM 2 % P/S 10 % FCS
primäre Nasenschleimhautzellen	50 ml CNT Prime Airway 0,1 % P/S

### 3.1.4.2 Verwendete Zelllinien

Die Untersuchung der VEGF-Promotoraktivität sowie der mRNA-Stabilität wurde in zwei unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
A549	Humanes Adenokarzinom der Lunge eines 58-jährigen Mannes	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
HNSCCUM-02T	humanes Plattenepithelkarzinom aus dem Zungengrund eines 44-jährigen Mannes	etabliert durch <sup>107</sup>

### 3.1.4.3 Verwendete primäre OP-Proben der Nasenschleimhaut

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nasenschleimhautproben von Patienten untersucht, die an der [REDACTED] operiert wurden. In Tabelle 11 sind die verwendeten Nasenschleimhautproben dargestellt. Die Mehrzahl der Proben stammen dabei von gesunden Patienten, die im Rahmen einer Nasenseptum OP operiert wurden. Bei vier Proben handelt es sich um entzündliches Gewebe der Nase und Nasennebenhöhlen.

**Tabelle 11: Verwendete primäre Nasenschleimhautproben**

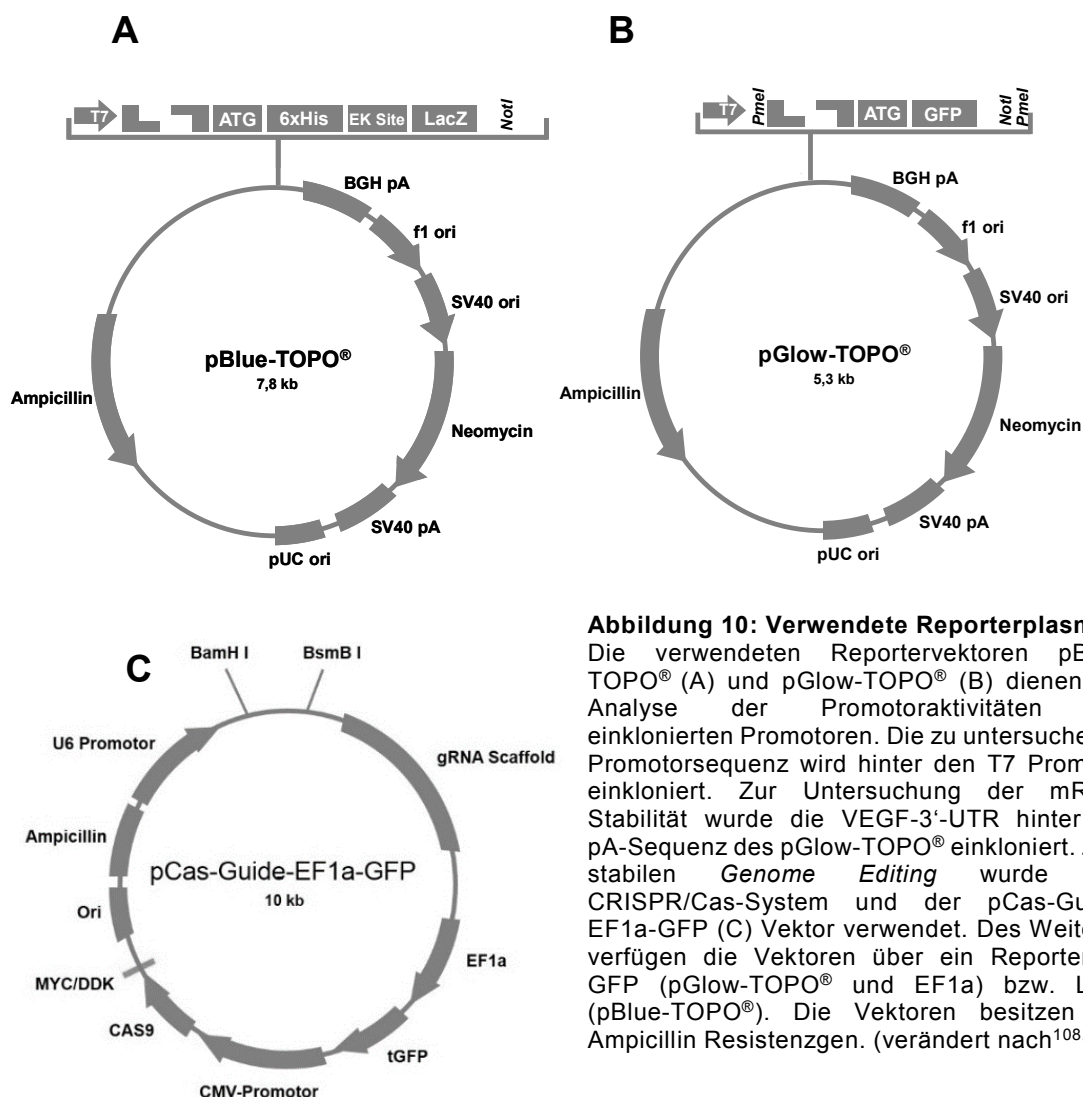
<b>Patient 1</b>	chron. Sinusitis
<b>Patient 2</b>	chron. Sinusitis
<b>Patient 3</b>	rez. Polyposis
<b>Patient 4</b>	CRS mit Polyp
<b>Patient 5</b>	Nasenmuschel
<b>Patient 6</b>	Nasenmuschel
<b>Patient 7</b>	Nasenmuschel
<b>Patient 8</b>	Nasenmuschel
<b>Patient 9</b>	Nasenmuschel
<b>Patient 10</b>	Nasenmuschel
<b>Patient 11</b>	Nasenmuschel
<b>Patient 12</b>	Nasenmuschel
<b>Patient 13</b>	Nasenmuschel
<b>Patient 14</b>	Nasenmuschel
<b>Patient 15</b>	Nasenmuschel
<b>Patient 16</b>	Nasenmuschel
<b>Patient 17</b>	Nasenmuschel

### 3.1.5 Plasmide und *E.coli*-Stämme

Die hierfür benötigten Reporterkonstrukte wurden mittels der in Tabelle 12 aufgeführten Bakterienstämme vervielfältigt.

Tabelle 12: Verwendete *E.coli*-Stämme

Bakterienstamm	Bezeichnung	Hersteller
<i>E.coli</i>	One Short TOP 10	Life Technologies GmbH, Invitrogen, Carlsbad (USA)
<i>E.coli</i>	XL10-Gold	Agilent Technologies, Santa Clara (USA) (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit)



**Abbildung 10: Verwendete Reporterplasmide**

Die verwendeten Reportervektoren pBlue-TOPO® (A) und pGlow-TOPO® (B) dienen der Analyse der Promotoraktivitäten der einklonierten Promotoren. Die zu untersuchende Promotorsequenz wird hinter den T7 Promotor einkloniert. Zur Untersuchung der mRNA-Stabilität wurde die VEGF-3'-UTR hinter die pA-Sequenz des pGlow-TOPO® einkloniert. Zum stabilen *Genome Editing* wurde das CRISPR/Cas-System und der pCas-Guide-EF1a-GFP (C) Vektor verwendet. Des Weiteren verfügen die Vektoren über ein Reporter-gen GFP (pGlow-TOPO® und EF1a) bzw. LacZ (pBlue-TOPO®). Die Vektoren besitzen ein Ampicillin Resistenzgen. (verändert nach<sup>108,109</sup>).



Die in Tabelle 13 gelisteten Reporterplasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und verwendet.

Tabelle 13: Plasmide



Name	Vektor	Insert	Variation	Herkunft
pGlow-VEGF <i>wt</i>	pGlow TOPO®	VEGF- Promotor	-	diese Arbeit
pGlow-VEGF -2578	pGlow TOPO®	VEGF- Promotor	SNP -2578	diese Arbeit
pGlow-VEGF -460	pGlow TOPO®	VEGF- Promotor	SNP -460	diese Arbeit
pGlow-VEGF +405	pGlow TOPO®	VEGF- Promotor	SNP +405	diese Arbeit
pGlow-VEGF -2578/-460	pGlow TOPO®	VEGF- Promotor	SNP -2578 SNP -460	diese Arbeit
pGlow-VEGF -2578/+405	pGlow TOPO®	VEGF- Promotor	SNP -2578 SNP +405	diese Arbeit
pGlow-VEGF +405/-460	pGlow TOPO®	VEGF- Promotor	SNP +405 SNP -460	diese Arbeit
pGlow-VEGF -2578/-460/+405	pGlow TOPO®	VEGF- Promotor	SNP -2578 SNP -460 SNP +405	diese Arbeit
pGlow-CMV	pGlow TOPO®	CMV- Promotor	-	
pGlow-3'-UTR <i>wt</i>	pGlow TOPO®	VEGF 3'-UTR	-	diese Arbeit
pGlow-3'-UTR +936	pGlow TOPO®	VEGF 3'-UTR	SNP +936	diese Arbeit
pBlue-CMV	pBlue TOPO®	CMV- Promotor	-	diese Arbeit
pPGK-Puro	pPGK	Puromycin- Resistenzgen	-	
pCas-gRNA1	pCas-Guide	gRNA1	-	diese Arbeit
pCas-gRNA2	pCas-Guide	gRNA2	-	diese Arbeit
pCas-gRNA3	pCas-Guide	gRNA3	-	diese Arbeit
pCas-gRNA4	pCas-Guide	gRNA4	-	diese Arbeit

Tabelle 14: Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
VEGF	<i>for</i> 5'-CCA CTG CGC TCC CAA GGT GAG GC-3' <i>rev3</i> 5'-CGC GAC TGG TCA GCT GCG GGA TC-3'	VEGF A- Promotor- PCR
CMV	<i>for</i> 5'-CGA TGT ACG GGC CAG ATA TAC G-3' <i>rev</i> 5'-AAT TTC GAT AAG CCA GTA AGC AG-3'	CMV- Promotor- PCR
3'-UTR_Not12	<i>for</i> 5'-CAG CGG CCG CAT GTG ACA AGC CGA GG-3' <i>rev2</i> 5'-CCC GCC GGC GTG AGA GTA AGC GAA GGC-3'	VEGF A-3'- UTR-PCR
-460 C/T	<i>for</i> 5'-TGG GGT TGA GGG TGT TGG AGC GGG G-3'	

	<i>rev</i>	5'-CCC CGC TCC AAC ACC CTC AAC CCC A-3'	Einführung SNPs -460
-2578 C/A	<i>for</i> <i>rev</i>	5'-TAT CCA CCC AGA TCG TGC CAG GGT CTG GC-3' 5'-GCC AGA CCC TGG CAC GAT CTG GGT GGA TA-3'	Einführung SNPs -2578
+405 C/G	<i>for</i> <i>rev</i>	5'-CTT TGC CCC TGT CCC TTT CGC TGC TCG-3' 5'-CGA GCA GCG AAA GGG ACA GGG GCA AAG-3'	Einführung SNPs +405
+936 C/T	<i>for</i> <i>rev</i>	5'-CCA AGA GGG ACC ATG CTG GGT CAC CCG-3' 5'-CGG GTG ACC CAG CAT GGT CCC TCT TGG-3'	Einführung SNPs +936
-2578_Seq	<i>rev</i>	5'-CTT CTC CAG GCT CAC AGC TT-3'	Genotypi- sierung SNP -2578 A/C
-460_Seq	<i>rev</i>	5'-AAA AGT TTC AGT GCG ACG CC-3'	Genotypi- sierung SNP -460 C/T
+405_Seq	<i>rev</i>	5'-GAG CCG TTC CCT CTT TGC TA-3'	Genotypi- sierung SNP +405 C/G
gRNA1	<i>for</i> <i>rev</i>	5'-GAT CGA CGG GGT CAG AGA GAG CGC GG-3' 5'-AAA ACC GCG CTC TCT CTG ACC CCG TC-3'	Klonierung in den pCas- Vektor
gRNA2	<i>for</i> <i>rev</i>	5'-GAT CGT GCG AGC AGC GAA AGC GAC AG-3' 5'-AAA ACT GTC GCT TTC GCT GCT CGC AC-3'	Klonierung in den pCas- Vektor
gRNA3	<i>for</i> <i>rev</i>	5'-GAT CGC AAA GTG AGT GAC CTG CTT TG-3' 5'-AAA ACA AAG CAG GTC ACT CAC TTT GC-3'	Klonierung in den pCas- Vektor
gRNA4	<i>for</i> <i>rev</i>	5'-GAT CGC GGC GGT CAC CCC CAA AAG CG-3' 5'-AAAACGCTTTTGGGGGTGACCGCCGC-3'	Klonierung in den pCas- Vektor
Donor-DNA ( <i>wt</i> )	<i>for</i> <i>rev</i>	5'-AGA GAG AGA CGG GGT CAG AGA GAG CGC GCG GGC GTG CGA GCA GCG AAA GCG ACA GGG GCA A AG TGA GTG ACC TGC TTT TGG GGG TGA CCG CCG GAG CGC GG-3' 5'-CCG CGC TCC GGC GGT CAC CCC CAA AAG CAG GTC ACT CAC TTT GCC CCT GTC GCT TTC GCT GCT CGC ACG CCC GCG CGC TCT CTC TGA CCC CGT CT C TCT CT-3'	Transfektion mit pCas- System ( <i>wt</i> )
Donor-DNA (SNP +405)	<i>for</i> <i>rev</i>	5'-AGA GAG AGA CGG GGT CAG AGA GAG CGC GCG GGC GTG CGA GCA GCG AAA GGG ACA GGG GCA A AG TGA GTG ACC TGC TTT TGG GGG TGA CCG CCG GAG CGC GG-3' 5'-CCG CGC TCC GGC GGT CAC CCC CAA AAG CAG GTC ACT CAC TTT GCC CCT GTC CCT TTC GCT GCT CGC ACG CCC GCG CGC TCT CTC TGA CCC CGT CT C TCT CT-3'	Transfektion mit pCas- System (SNP +405)

### 3.1.6 Software

**Tabelle 15: Verwendete Software**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Ascent Software 2.6	Thermo Electron Corporation, Dreieich
ChemSketch (Version 10)	Advanced Chemistry Development, Inc, Toronto (Kanada)
Chromatogram Explorer (Version 4.0.0)	Heracle BioSoft SRL, Pitești (Rumänien)
Citavi 4	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil (Schweiz)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla (USA)
Image Lab	Bio-Rad, München
Microsoft Office 2003/2013	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
TScratch (Version 1.0)	Chair of Computational Science, ETH Zurich, Zürich (Schweiz) <sup>110</sup>

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien

Die verwendeten *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme wurden als Glycerinkulturen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Herstellung wurden  $900\ \mu\text{l}$  einer Bakterienkultur mit  $100\ \mu\text{l}$  Glycerin versetzt, gevortext und sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Anzucht von Bakterienkolonien wurden zunächst Agarplatten gegossen. Hierzu wurde LB-Agar hergestellt, autoklaviert und bis auf ca.  $60^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Nach der Zugabe von Antibiotika ( $100\ \mu\text{g/ml}$ ) für die Herstellung selektiver Agar-Platten wurden je  $25\ \text{ml}$  der noch warmen Agar-Lösung in  $94\ \text{mm}$ -Petrischalen gegossen. Nach der Auspolymerisierung des LB-Agars wurden die Platten bis zur Verwendung bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Neben der Stammhaltung der Bakterien in Glycerinkulturen können die verwendeten Bakterienstämme auf LB-Agarplatten, umwickelt in Parafilm, mehrere Wochen bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Zur Kultivierung der *E. coli*-Kulturen wurden diese unter heterotrophen Bedingungen in  $5\ \text{ml}$  LB-Medium (ggf. nach Zugabe von Antibiotika) kultiviert ( $8\text{h}/37^{\circ}\text{C}$ ).

#### 3.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien durch die Calciumchlorid-Methode

Um eine effektivere Aufnahme der Plasmid-DNA zu gewährleisten, wurden die *E. coli*-Stämme vor einer Transformation mittels der sogenannten Calciumchlorid-Methode in einen ultrakompetenten Zustand versetzt. Das Prinzip der Methode beruht auf der Herabsetzung des elektrischen Potenzials der Bakterien-Zellwand durch  $\text{CaCl}_2$ , wodurch die Effizienz der Plasmid-Aufnahme gesteigert wird. Die *E. coli*-Stämme wurden zunächst auf unselektiven LB-Agar-Platten ausgestrichen und bei  $37^{\circ}\text{C}$  üN im Bakterien-Brutschrank inkubiert. Eine Kolonie dieser Platte wurde abgeimpft, eine Vorkultur ( $5\ \text{ml}$  LB-Medium) angelegt und erneut üN bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden  $400\ \text{ml}$  LB-Medium beimpft und die Bakterien bis zu einer optischen Dichte (OD) bei  $600\ \text{nm}$  von  $0,6$  kultiviert. Nach dem Erreichen der  $\text{OD}_{600\ \text{nm}}$  wurde der Ansatz auf Eis gestellt, um das Wachstum der Bakterien abzustoppen, bevor diese zentrifugiert ( $3.200\ \text{xg} // 10\ \text{min} // 4^{\circ}\text{C}$ ) und die Pellets in  $10\ \text{ml}$   $\text{CaCl}_2$ -Lösung vereinigt wurden. Eine erneute Zentrifugation diente als Waschschriff bevor die Bakterien in  $10\ \text{ml}$   $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und  $20\ \text{min}$  auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurden die Bakterien zentrifugiert ( $3.200\ \text{xg} // 10\ \text{min} // 4^{\circ}\text{C}$ ), in  $3\ \text{ml}$  kalter  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und die ultrakompetenten Bakterien in  $50\ \mu\text{l}$  Aliquots für bis

zu drei Monate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die ermittelte Transformationseffizienz der Bakterienzellen lag dabei bei  $>10^7$  Kolonien/ $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA.

### 3.2.1.3 Transformation durch Hitzeschock

Die Transformation bezeichnet das Einbringen von Plasmid-DNA in elektro- bzw. chemokompetente Zellen. Zur Transformation der kompetenten *E.coli*-Stämme wurden diese langsam auf Eis aufgetaut (45  $\mu\text{l}$ ), zur Steigerung der Transformationseffizienz mit 2  $\mu\text{l}$  Mercaptoethanol versetzt und 10 min unter regelmäßigem vorsichtigen Mischen auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA zu den kompetenten Bakterien gegeben und nach erneutem Mischen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (30 s //  $45^{\circ}\text{C}$ ) folgte eine sofortige Inkubation auf Eis für 2 min. Zur Optimierung der Transformationseffizienz wurden die Zellen schließlich nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  vorgewärmtem SOC-Medium ( $42^{\circ}\text{C}$ ) auf einem Horizontalschüttler inkubiert (250 rpm // 1 h //  $37^{\circ}\text{C}$ ). Zur abschließenden Antibiotikaselektion und Kolonisierung der Bakterien wurde die Zellsuspension in verschiedenen Verdünnungen auf einer antibiotikahaltigen Agarplatte ( $37^{\circ}\text{C}$ ) ausplattiert und bei  $37^{\circ}\text{C}$  // üN inkubiert. Die abgegrenzten einzelnen Kolonien wurden im Anschluss zur Plasmid-DNA-Gewinnung herangezogen.

## 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.2.1 Plasmid isolation mittels des QIAfilter® Plasmid Mini Kits

Die Plasmidaufreinigung erfolgte unter Verwendung des Plasmidaufreinigungskits innuPREP Plasmid Mini Kit gemäß den Herstellerangaben. Das Prinzip der Plasmid-DNA-Isolation ist die alkalische Lyse. Die Bakterienzellen wurden zunächst in 250  $\mu\text{l}$  RNase-haltigem Puffer resuspendiert, wobei die Zellen aufgeschlossen und denaturiert wurden. Im Anschluss wurden 250  $\mu\text{l}$  Lysepuffer zugegeben und der Ansatz vorsichtig durchmischt. Nach einer Inkubation (5 min // RT) wurde die alkalische Lyse durch Zugabe von 350  $\mu\text{l}$  Neutralisierungspuffer abgeschlossen. Dabei kam es zur Präzipitation von genomischer DNA, Proteinen und Zelltrümmern. Das plasmidhaltige Lysat wurde nach Zentrifugation (16.000  $\times g$  // 10 min //  $4^{\circ}\text{C}$ ) auf Silica-Säulen gegeben. Die negativ-geladene Plasmid-DNA bindet in Gegenwart von chaotropen Salzen an der Silicamembran der Säulen und wurde mit Waschpuffer (2x 700  $\mu\text{l}$ ) gewaschen. Durch Zugabe von UltraPure  $\text{H}_2\text{O}$  wurde die Plasmid-DNA abschließend von der Silicamembran der Säulen eluiert.

### 3.2.2.2 *Plasmidisolierung mittels des QIAfilter® Plasmid Plus Maxi Kits*

Die Isolation der Plasmid-DNA in größerem Maßstab erfolgte unter Verwendung des Plasmidaufreinigungskits QIAfilter® Plasmid Plus Maxi Kits gemäß dem Herstellerprotokoll. Hierzu wurde zunächst eine Vorkultur unter Zugabe von Antibiotika (100 µg/ml) angeimpft und für 6-8 h inkubiert. Die Vorkultur wurde zur Weiterkultivierung in einer üN-Kultur 1:1000 mit Antibiotika-haltigem LB-Medium verdünnt und auf einem Horizontalschüttler inkubiert (100 rpm // 14 h // 37°C). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Bakterien durch Zentrifugation (3.200 xg // 15 min) pelletiert und in Zelllysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert (5 min // RT), bevor die alkalische Lyse durch Zugabe von Neutralisierungspuffer abgestoppt wurde. Das Präzipitat wurde in eine Filterspritze gegeben und 10 min inkubiert bevor dieses auf eine zuvor equilibrierte Säule (10 ml QTB) filtriert wurde. Die Säule wurde im Anschluss zweimal mit je 30 ml Waschpuffer gewaschen und die Plasmid-DNA schließlich mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Nach der Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde die DNA durch Zentrifugation (16.000xg // 60 min // 4°C) gefällt. Nach einem Waschschrift (2x 5 ml 70 % Ethanol, Zentrifugation (16.000 xg // 10 min //4°C)) wurde die DNA getrocknet und in 300 µl UltraPure H<sub>2</sub>O gelöst.

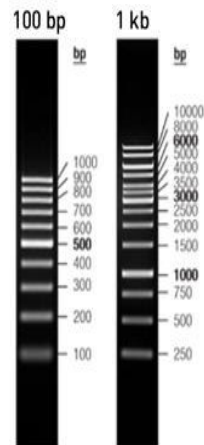
### 3.2.2.3 *Isolation der Gesamt-DNA aus eukaryotischen Zellen*

Die Isolation genomischer DNA aus Zelllinien und Primärkulturen wurde mittels des DNeasy Blood & Tissue Kits nach den Herstellerangaben durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine rasche Aufreinigung der DNA. Nach dem Ablösen der Zellen von der Wachstumsoberfläche mittels Tris/EDTA-(T/E) Lösung wurden diese pelletiert (400 xg // 5 min) und ca.  $5 \times 10^6$  Zellen in 200 µl PBS resuspendiert, bevor zur Lyse der Zellen 20 µl Proteinase K zugegeben wurden. Nach Zugabe von Lysepuffer wurde der Ansatz auf eine DNeasy Mini Säule gegeben und bei 2.800 xg für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde im Folgenden mit Waschpuffern gewaschen (AW1 (2.800 xg // 1 min); AW2 (13.000 xg // 3min)). Die Gesamt-DNA wurde mit 200 µl Puffer AE nach einer 1-minütigen Inkubation durch Zentrifugation (2.800 xg // 1 min) in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen eluiert.

### 3.2.2.4 *Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten*

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten durch eine Agarose-Gelelektrophorese wurde zunächst, unter Berücksichtigung der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente, ein 0,8-1,5 %-iges Agarose-Gel hergestellt, aufgekocht, 5 µl Ethidiumbromid zugegeben

und in eine Gelkammer gegossen. Die zu trennenden DNA-Fragmente wurden vor dem Gelauftrag mit 6x Ladepuffer versetzt und bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleinsäuren der DNA und verändert dadurch das Absorptionsspektrum. Die aufgetrennten Fragmente wurden bei 260 nm sichtbar gemacht und mittels des Geldokumentationssystems dokumentiert. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch einen Molekulargewichtsstandard (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Verwendete molekulare Standards**

Banden der Molekular-Gewichtsstandards 1 kb DNA-Ladder und 100 bp DNA-Ladder (verändert nach<sup>111</sup>).

Nach der Gelelektrophorese wurde die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht, die entsprechenden Fragmente aus dem Gel geschnitten und mittels des GFX Gel Band Purification Kits gemäß den Herstellerangaben isoliert. Zu dem ausgeschnittenen Gelstück mit der Zielsequenz wurde Capture Buffer 2 hinzu pipettiert (1 µl pro µg Gel). Nach kurzem Vortexen und Invertieren wurde das Gel inkubiert (15 min // 60°C), um das Agarosegel aufzulösen. Die gelöste DNA wurde anschließend auf eine Silicamembran pipettiert, wobei die DNA durch die gegebenen Niedrigsalz-Bedingungen bindet. Nach der Zentrifugation (16.000 xg // 1 min // RT) wurde das Eluat verworfen und die an der Säule gebundene DNA gewaschen (500 µl Waschpuffer 1; 16.000 xg // 1 min) bevor diese unter Hochsalzbedingungen eluiert (16.000 xg // 1 min) wurde.

### 3.2.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolation der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des innuPREP RNA Mini Kits gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Prinzip der Methode ist die Lyse der eukaryotischen

Zellen und die selektive Entfernung von genomischer DNA durch Filtration über eine Säule. Die in der Probe verbleibende RNA wurde anschließend an eine weitere Säule gebunden und vor deren Elution aufgereinigt. Hierzu wurden ca. 5 Millionen Zellen (MZ) in Puffer RL inkubiert (2 min // RT) und resuspendiert (3 min // RT) bevor zur selektiven Entfernung der genomischen DNA der Ansatz auf die Säule D pipettiert und zentrifugiert (13.500 xg // 2 min) wurde. Dem Eluat wurden 400 µl Ethanol (100 %) zugegeben und auf die Säule R pipettiert, um die RNA selektiv an die Säule R zu binden (13.500 xg // 2 min). Die gebundene RNA wurde in zwei aufeinander folgenden Waschschritten gewaschen. Nach dem Verwerfen des Filtrats wurde die Säule getrocknet (13.500 xg // 3 min) und die RNA mit 30 µl UltraPure H<sub>2</sub>O eluiert (700 xg // 1 min).

### 3.2.2.6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA/RNA

Die Bestimmung der DNA/RNA-Konzentrationen der Proben erfolgte mittels des NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer, wobei zugleich die Qualität und Reinheit der DNA bzw. RNA überprüft wurde. Die Methode basiert auf der Messung des Absorptionsmaximums von Nukleinsäuren bei 260 nm gemäß dem Lambert-Beerschen-Gesetz ( $c(\text{DNA/RNA}) = \text{OD}_{260 \text{ nm}} \cdot \epsilon$ ). Eine DNA-Lösung mit einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht dabei der  $\text{OD}_{260 \text{ nm}}$  von 1. Entsprechend ist eine  $\text{OD}_{260 \text{ nm}}$  von 1 für RNA-Lösungen von 40 µg/ml definiert. Neben Nukleinsäuren wurde zudem die Absorption der Proteine bei deren Absorptionsmaximum von 280 nm gemessen. Aus den gemessenen Absorptionsmaxima bei den genannten Wellenlängen wurde das Absorptionsverhältnis  $\text{OD}_{260 \text{ nm}} / \text{OD}_{280 \text{ nm}}$  bestimmt, wodurch die Reinheit der Probe abgeschätzt werden kann. Reine DNA-Lösungen haben dabei einen Verhältniswert von 2,0 der durch Verunreinigungen mit Proteinen, Phenol oder anderen Kontaminanten kleiner wird. Ein zweites Absorptionsverhältnis ( $\text{OD}_{260 \text{ nm}} / \text{OD}_{230 \text{ nm}}$ ) diene ebenfalls der Untersuchung der Reinheit der DNA, wobei für reine Nukleinsäuren der Wert für  $\text{OD}_{260 \text{ nm}} / \text{OD}_{230 \text{ nm}}$  zwischen 1,8-2,2 liegt. Als Nullwert der Konzentrationsbestimmung wurde das entsprechende Lösungsmittel verwendet.

### 3.2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; engl.: *Polymerase Chain Reaction*) nach Mullis verwendet<sup>112,113</sup>. Ausgehend von zwei flankierenden Oligonukleotiden wird mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase und Desoxynukleotiden der entsprechende Sequenzbereich amplifiziert. Nach der



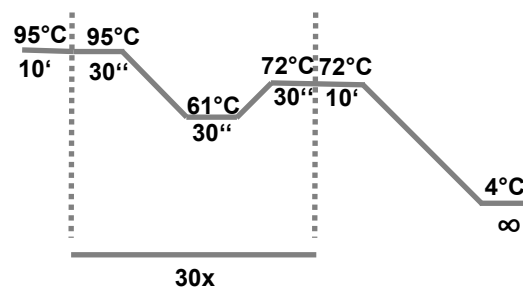
Denaturierung der DNA-Doppelstränge werden die Ansätze in der anschließenden Annealingphase auf 5°C unter der Schmelztemperatur der Primer abgekühlt, wobei sich die Primer an die komplementären Bereiche der Template-DNA anlagern. In der abschließenden Elongationsphase werden die Doppelstränge ausgehend von den Primern von der DNA-Polymerase synthetisiert.

### 3.2.2.7.1 VEGF A-Promotor-PCR

Zur Bestimmung der VEGF A-Promotoraktivität wurde der VEGF A-Promotor in den pGlow-TOPO® Reportervektor kloniert. Hierzu wurde der Promotor sowie ein Teil der 5'-UTR (4017 bp *upstream* des Translationsstarts) aus 20 ng genomischer DNA (siehe 3.2.2.3) nach publiziertem Protokoll amplifiziert<sup>114</sup>. Für die Amplifikation des VEGF A-Promotors wurden die Primer VEGFa (*for*) und VEGFa (*rev3*) (Tabelle 14) sowie der in Tabelle 16 angegebene Ansatz und das in Abbildung 12 dargestellte Temperaturprofil verwendet.

**Tabelle 16: Ansatz der VEGF A-Promotor-PCR**

VEGFa Primer ( <i>for</i> ; 10 µM)	1,25 µl
VEGFa Primer ( <i>rev 3</i> ; 10 µM)	1,25 µl
5x Puffer A	5 µl
dNTP-Mix (10 mM each)	0,5 µl
4 % DMSO	1 µl
TEMPase HotStart DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
Template	200 ng
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 25 µl



**Abbildung 12: Temperaturprofil VEGF A-Promotor-PCR**

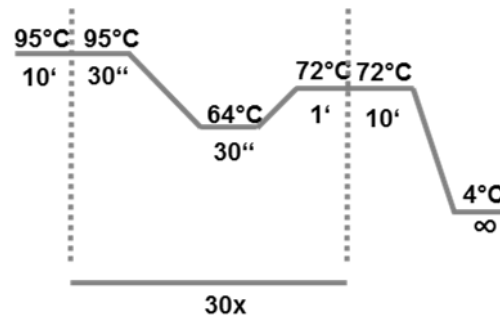
Die erhaltenen PCR-Produkte wurden durch elektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen analysiert (siehe 3.2.2.4), das Produkt bei 3466 bp ausgeschnitten und das DNA-Eluat mittels des GFX-Kits aufgereinigt bevor das PCR-Produkt in das pGlow-TOPO®-Reporterplasmid inkloniert wurde.

### 3.2.2.7.2 VEGF A-3'-UTR-PCR

Zur Bestimmung der 3'-UTR-abhängigen VEGF A-mRNA-Stabilität wurde die 3'-UTR des VEGF A-Gens amplifiziert und in den pGlow-TOPO® Reportervektor hinter die kodierende Sequenz des Reportergens GFP inkloniert. Zur Amplifikation der betreffenden Region wurden 1 µg des VEGF A-Gens und die Primer 3UTR\_for\_NotI2 sowie 3UTR\_rev2\_NotI2 (Tabelle 14) in die PCR eingesetzt. Der PCR-Ansatz sowie die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 17 bzw. Abbildung 13 angegeben.

**Tabelle 17: Ansatz der 3'-UTR-PCR**

3'-UTR for; Not2 (10 µM)	1,25 µl
3'-UTR rev2; Not2 (10 µM)	1,25 µl
5x Puffer E	5 µl
dNTPs (10 mM each)	0,5 µl
AmpliTaq	1 µl
Template (500 ng)	500 ng
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 25 µl

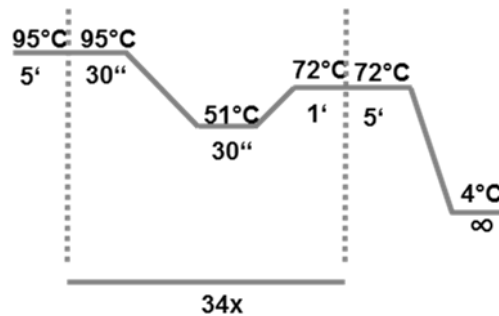
**Abbildung 13: Temperaturprofil VEGF A-3'-UTR-PCR**

### 3.2.2.7.3 CMV-Promotor

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz in den Versuchen zur Bestimmung der VEGF A-Promotoraktivität wurde der CMV-Promotor zunächst amplifiziert und anschließend in den pBlue-TOPO<sup>®</sup> Reportervektor einkloniert. Der CMV-Promotor stammt aus dem *Cytomegalievirus* und stellt einen Promotor mit einer sehr hohen Aktivität dar. Zu dessen Amplifikation wurde das pGlow-TOPO<sup>®</sup>-CMV Plasmid sowie die in Tabelle 18 gegebenen Ansätze und in Abbildung 14 dargestellten Reaktionsbedingungen verwendet, bevor das aufgereinigte PCR-Produkt zur Ligation in den pBlue-TOPO<sup>®</sup> Reportervektor einkloniert wurde.

**Tabelle 18: Ansatz CMV-Promotor-PCR**

CMV for (10 µM)	1,25 µl
CMV rev (10 µM)	1,25 µl
10x Puffer	2,5 µl
dNTPs (10 mM each)	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
pGlow-TOPO <sup>®</sup> CMV	100 ng
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 25 µl

**Abbildung 14: Temperaturprofil CMV-Promotor-PCR**

### 3.2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Untersuchung des VEGF A-Promotors wurde dieser in den pGlow-TOPO<sup>®</sup> Vektor mittels des gleichnamigen Kits nach den Herstellerangaben ligiert. Durch die Ligation von DNA-Fragmenten in die verwendeten Reportervektoren können nach der Transfektion von Zelllinien funktionelle Untersuchungen der einklonierten Sequenzen durchgeführt werden. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz in den nachfolgenden Experimenten wurde der CMV-Promotor in das pBlue-TOPO<sup>®</sup> Reporterplasmid eingebracht. Beide Reporterplasmide verfügen über ein Ampicillin-Resistenzgen sowie

ein Reporter gen und einen T7-Promotor. Das Reporter gen des pGlow-TOPO® Vektors ist das fluoreszierende Protein GFP. Durch die Ligation von Promotorsequenzen vor das Reporter gen kann über die Expression des GFP eine Aussage über die VEGF A-Promotoraktivität getroffen werden. Weiter können transfizierte Zelllinien von nicht transfizierten Zellen durch deren Fluoreszenz unterschieden werden. Das Reporterplasmid pBlue-TOPO® hingegen enthält das Reporter gen LacZ, das ein Blau-Weiß-Kolonie-Screening von positiven Klonen ermöglicht. Zur Ligation wurde das jeweilige Reporterplasmid sowie das aufgereinigte PCR-Produkt aus der Gelisolation (siehe 3.2.2.4) gemischt, für 30 min bei RT inkubiert und anschließend zur Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen eingesetzt (siehe 3.2.1.3). Zur Ligation der VEGF A 3'-UTR hinter die GFP-kodierende Sequenz wurde der pGlow-Vektor mit einkloniertem CMV-Promotor zuvor mittels NotI verdaut (siehe 3.2.2.9.1). Im Anschluss wurden die 5' Enden des Vektors zur Vermeidung der Religation dephosphoryliert. Hierzu wurde der lineare Vektor mit dem Enzym *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIP) inkubiert (1 h/37°C) und nach Gelaufreinigung (siehe 3.2.2.4) zur Ligation eingesetzt (siehe Tabelle 19).

**Tabelle 19: Ansatz zur Ligation von DNA-Fragmenten in Reporterplasmide**

DNA aus Gel-Eluation	25 ng
200 mM NaCl	1 µl
10 mM MgCl <sub>2</sub>	1 µl
pGlow- /pBlue TOPO®	1 µl
Ligase	1 µl
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 6 µl

### 3.2.2.9 Verifizierung der isolierten Plasmid-DNA

#### 3.2.2.9.1 Restriktionsendonuklease-Verdau

Bei Restriktionsenzymen der Klasse II handelt es sich um Endonukleasen, die doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen spalten. Die zu verifizierende Plasmid-DNA wurde mit den in Tabelle 5 aufgeführten Restriktionsenzymen gemäß den jeweiligen Herstellerangaben restringiert. Dazu wurden 1 µg Plasmid-DNA mit 0,5 µl des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur folgenden Verifizierung der Plasmid-DNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 3.2.2.4).

### 3.2.2.9.2 DNA-Sequenzierung

Zur weiteren Verifikation aller verwendeten DNA-Reporterkonstrukte wurden diese durch die Firma ██████████ sequenziert. Die zur Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tabelle 20 aufgeführt.

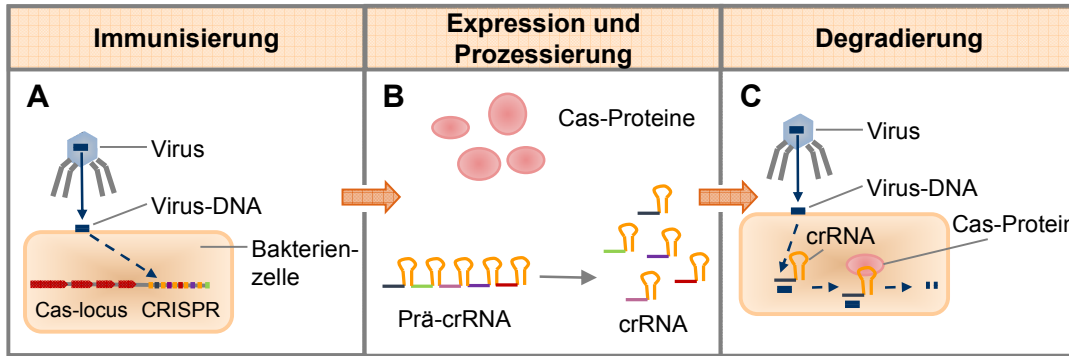
**Tabelle 20: Sequenzierungsprimer**

Name	Verwendung
Seq_pGlow ( <i>for</i> )	pGlow-TOPO® VEGF A-Promotor: ~1280-1740 bp
Seq_pGlow ( <i>rev</i> )	pGlow-TOPO® VEGF A-Promotor: ~2780-1850 bp
-2578_Seq	pGlow-TOPO® VEGF A-Promotor: SNP -2578
-460_Seq	pGlow-TOPO® VEGF A-Promotor: SNP -460
+405_Seq	pGlow-TOPO® VEGF A-Promotor: SNP +405
T7 ( <i>for</i> )	pGlow-/pBlue-TOPO®: 50 bp des Vektors-ca. 1000 bp in Insert
GFP ( <i>rev</i> )	pGlow-TOPO®: 170 bp des Vektors-ca. 1000 bp rev in Insert
CMV ( <i>for</i> )	pGlow- /pBlue-TOPO® CMV: 117-400 bp
CMV ( <i>rev</i> )	pGlow- /pBlue-TOPO® CMV: 750-350 bp
pBlue ( <i>rev</i> )	pBlue TOPO®: 182 bp des Vektors-ca. 800 bp in Insert

### 3.2.2.10 Das CRISPR/Cas-System

#### 3.2.2.10.1 Prinzip der Methode

Bei dem verwendeten *clustered regulatory interspaced short palindrome repeats* (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) System handelt es sich um ein adaptives prokaryotisches Immunsystem, das das Bakterium vor Virusinfektionen schützt<sup>115,116</sup>. Der CRISPR-Locus besteht aus palindromischen Repeatsequenzen (CRISPR), die durch unterschiedliche Spacersequenzen, die identisch zu Fragmenten aus Virus-Genen sind, unterbrochen werden<sup>115</sup>. Die CRISPR-vermittelte Immunabwehr gegenüber Fremd-DNA kann dabei in drei Phasen unterteilt werden. In der Phase der Immunisierung werden dabei neue Spacersequenzen aus der injizierten, parasitären Fremd-DNA in den CRISPR-Locus integriert (Abbildung 15, A)<sup>115,117</sup>. In der anschließenden Phase, der Expression und Prozessierung wird nach der Transkription des CRISPR-Locus entstandene prä-crRNA in kurze Sequenzen (crRNAs) prozessiert<sup>115</sup>. Die crRNA besteht dabei aus zu Fremd-DNA komplementären Sequenzen (Abbildung 15, B). Im letzten Schritt werden bekannte Fremd-DNA Abschnitte erkannt und crRNA-vermittelt über die Endonuklease Cas9 degradiert. Zur Degradierung hybridisiert die crRNA zunächst mit der sogenannten tracrRNA, die durch deren Bildung von Sekundärstrukturen von der Endonuklease erkannt wird (Abbildung 15, C)<sup>117</sup>.

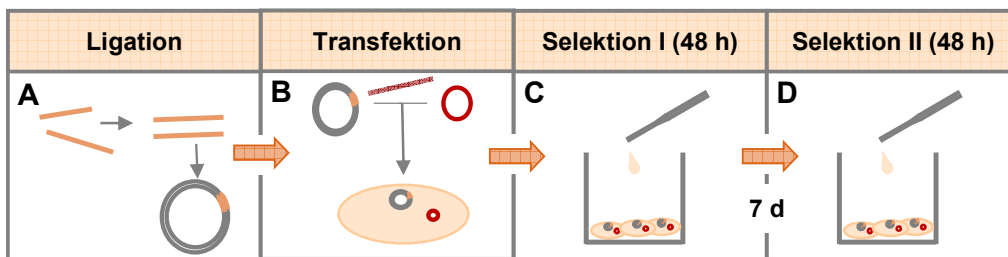


**Abbildung 15: Prinzip des CRISPR/Cas-Systems**

Die prokaryotische Immunabwehr mittels des CRISPR/Cas-Systems kann in drei Phasen unterteilt werden. Im ersten Schritt kommt es dabei zur Immunisierung durch die Infektion mit Fremd-DNA und Einbau von Fragmenten in den CRISPR-Locus (A). In der anschließenden Phase kommt es zur Expression der Cas-Proteine sowie Transkription des CRISPR-Locus. Die entstandene prä-crRNA wird anschließend in crRNA prozessiert (B). Bei einer erneuten Infektion mit Fremd-DNA werden die in den CRISPR-Locus eingebauten DNA-Fragmente erkannt und durch die Cas-Proteine abgebaut (C) (verändert nach<sup>118</sup>).

### 3.2.2.10.2 Annealing und Ligation

Das gezielte Einbringen des prokaryotischen CRISPR/Cas9-Systems in Eukaryonten ermöglicht hierbei mit kleinen Anpassungen das schnelle und gezielte *Genome Editing*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Vektor pCas-Guide-EF1a-GFP verwendet. Zur Etablierung einer Zelllinie, die den Promotor-SNP +405 C/G enthält, wurden verschiedene guideRNAs (gRNA, Tabelle 14), die die hybridisierte crRNA und der tracrRNA ersetzen gemäß den Herstellerangaben in den Vektor eingebracht (Abbildung 16, A).



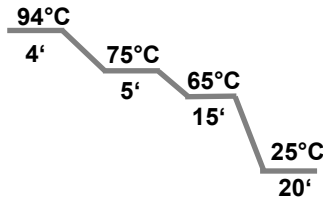
**Abbildung 16: Verlauf der Etablierung von Zelllinien mit dem CRISPR/Cas-System**

Zur Etablierung veränderter Zelllinien wurde nach einem Annealingschritt die gRNA in den Vektor pCas-Guide-EF1a-GFP eingebracht (A). Nach Verifizierung durch Sequenzierung werden die Zellen mit dem pCas-Guide-EF1a-GFP-Vektor der die gewünschte gRNA enthält, einem Puromycin Vektor sowie eine Oligonukleotid-Sequenz zur homologen Reparatur transfiziert (B). Mit Hilfe der Puromycin-Resistenz werden die Zellen in zwei Zyklen mit Puromycin selektiert (4 µg/ml; C und D).

In einem Annealingschritt werden die einzelsträngigen Oligonukleotide zunächst mittels des in Tabelle 21 angegebenen Ansatzes und in Abbildung 17 dargestellten Reaktionsbedingungen vorbereitet.

**Tabelle 21: Annealingansatz**

Oligo ( <i>for/rev</i> ; 100 $\mu$ M)	je 2 $\mu$ l
10x Annealing buffer	4 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	32 $\mu$ l



**Abbildung 17: Temperaturprofil des Annealingschritts**

Zur Vorbereitung des Vektors wurde dieser mittels der Restriktionsenzyme BsmB und BamH I (siehe Tabelle 22) für 3 h bei 37°C verdaut. Im Anschluss wurde der verdaute Vektor im Agarosegel aufgereinigt und isoliert (siehe 3.2.2.4). Der Ansatz wurde in 360  $\mu$ l H<sub>2</sub>O pipettiert und zur Ligation (Tabelle 23) 2 h bei RT inkubiert.

**Tabelle 22: Verdau des pCas-Guide-EF1a-GFP**

10x Restriktionspuffer	3 $\mu$ L
BamH I	0,8 $\mu$ L
BsmB	0,8 $\mu$ L
Vektor	10 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	ad 30 $\mu$ L

**Tabelle 23: Ligationsansatz**

Ligationspuffer	1 $\mu$ l
verdauter pCas-Vektor	1 $\mu$ l
Annealed Oligos	1 $\mu$ l
Ligase	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu$ l

### 3.2.2.10.3 Sequenzierung und Transfektion

Nach der Transformation der Bakterien wurden, wie unter 3.2.1.3 beschrieben, Klone gepickt und nach einer Kultivierung üN zur Plasmidisolation eingesetzt. Nach der Verifikation durch Sequenzierung wurden die pCas-Guide-Vektoren mit den darin enthaltenen gRNAs zur Transfektion eingesetzt (Abbildung 16, B). Es wurde hierbei die unter 3.2.3.5 beschriebene Transfektionsmethode mit kleinen Änderungen verwendet. Zur Transfektion wurden am Vortag 1,5 MZ in eine 10 cm<sup>2</sup> Zellkulturflsche ausgesät und kultiviert. Zur Transfektion wurde neben dem pCas-Guide Vektor eine Oligonukleotid-Sequenz (Donor-DNA; Tabelle 14) gegeben. Diese Sequenz dient als Template für die homologe Reparatur der durch Cas9 verursachten Doppelstrangbrüche. Weiter wurde

ein Puromycin-Vektor zur erleichterten Selektion verwendet. Der Transfektionsansatz ist in Tabelle 24 gegeben.

**Tabelle 24: Transfektionsansatz**

pCas-Guide mit gRNA	13,5 µg
pPGK-Puro	1,5 µg
Donor-DNA	13,5 µg
jetPRIME® Puffer	750 µl
jetPRIME® Reagent	40 µl

#### 3.2.2.10.4 Selektion und Kultivierung

24 h nach der Transfektion wurden die Komplexe abgenommen, die Zellen abgelöst und auf eine 145 mm Platte ausplattiert. Nach 48-stündiger Kultivierung wurden die Zellen durch Zugabe von 4 µg/ml Puromycin für 48 h selektiert (Abbildung 16, C), bevor nach 7-tägiger Kultivierung eine weitere Puromycin-Selektion erfolgte (Abbildung 16, D). Nach einer erneuten Kultivierung für 7 Tage wurden Zellklone gepickt und in eine 24-well Platte überführt und kultiviert. Zur Verifikation der etablierten CRISPR/Cas9 Zelllinie wurde zunächst die Fluoreszenz des im Vektor enthaltenen GFP ausgenutzt. Im Anschluss wurde die DNA isoliert (siehe 3.2.2.3), eine VEGF-PCR (siehe 3.2.2.7.1) durchgeführt und das entstandene PCR-Produkt sequenziert (siehe 3.2.2.9.2).

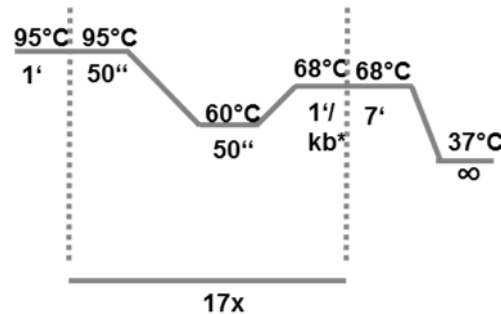
#### 3.2.2.11 Gezielte Mutagenese

Zur Einführung der Einzelnukleotid-Polymorphismen wurde das QuikChange II XL Site Direct Mutagenesis Kit verwendet. Bei der gezielten Mutagenese (SDM; engl.: *site-directed mutagenesis*) werden zunächst die DNA-Primer, die die gewünschte Mutation enthalten, synthetisiert. Um die Mutationsstelle verfügen die Primer über die komplementäre Sequenz der Template-DNA. Hierdurch können die Primer an die gewünschte Stelle hybridisieren und somit ein Einzel- oder Mehrfachbasen-Austausch erzielen, sowie Basen einfügen oder entfernen. Der einzelsträngige DNA-Primer wird während der SDM durch die DNA-Polymerase verlängert und das Gen mit der gewünschten Mutation kopiert. Zur Einführung der SNPs des VEGF A-Gens wurden die gleichnamigen und in Tabelle 14 aufgeführten Primer verwendet. Als DNA-Template diente das pGlow-TOPO® VEGF A-Promotor *wt*-Reporterkonstrukt zur Einführung der SNPs -2578 A/C, -460 C/T und +405 C/G bzw. das pGlow-TOPO® VEGF A-3'-UTR *wt*-Reporterkonstrukt zur Einführung des SNP +936 C/T. Zur Einführung der SNP-Kombinationen wurden die SNPs nacheinander eingeführt, wobei als Template die Konstrukte mit den bereits eingeführten SNPs verwendet wurden. Die Mutagenese erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Hierzu wurde zur Einführung der gewünschten

Mutation zunächst eine PCR mit folgendem Ansatz (Tabelle 25) und Temperaturprofil (Abbildung 18) durchgeführt. Im Anschluss wurden die methylierten Basen der Template-DNA in einem Dpn I-Verdau verdaut und 2 µl an Stelle der Plasmid-DNA zur Transformation der Bakterien eingesetzt (siehe 3.2.1.3).

**Tabelle 25: Ansatz der gezielten Mutagenese**

10x Reaktionspuffer	5 µl
Template (Plasmid-DNA-Konstrukte)	10 ng
Primer ( <i>for/rev</i> ; 10 µM)	je 1,25 ng
3,5 µl dNTP-Mix (0,1 mM each)	3,5 µl
QuikSolution	3 µl
PfuUltra HF DNA polymerase (2,5U/µl)	1 µl
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 50 µl



**Abbildung 18: Temperaturprofil der SDM-PCR**

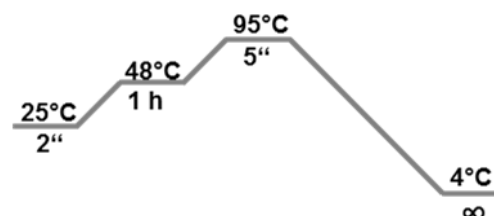
\* 3'-UTR: 6 min; VEGF A-Promotor: 8 min

### 3.2.2.12 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Mittels des Enzyms Reverse Transkriptase kann aus der zuvor isolierten RNA die komplementäre cDNA synthetisiert werden. Zur unspezifischen Synthese von cDNA wurde ein *random hexamer* Primer verwendet, der aus sechs zufällig zusammengesetzten Basen besteht und dadurch an zahlreiche Stellen der RNA bindet. Vor der reversen Transkription wurden 1 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl bei 65°C für 10 min denaturiert. Anschließend wurde die reverse Transkription nach Zugabe von 25 µl des folgenden Mastermixes (Tabelle 26) und unter den in Abbildung 19 dargestellten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Verwendung in der qRT-PCR für bis zu einem Monat bei -20°C gelagert.

**Tabelle 26: Mastermix RT-PCR**

Random Primers	1,25 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	11 µl
Nucleotide (10 mM)	2,5 µl
Reverse Transcription 10x Puffer	5 µl
M-MLV Reverse Transkriptase	0,5 µl
Recombinant RNasin® Ribonuklease Inhibitor	1 µl
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 25 µl



**Abbildung 19: Temperaturprofil der RT-PCR**

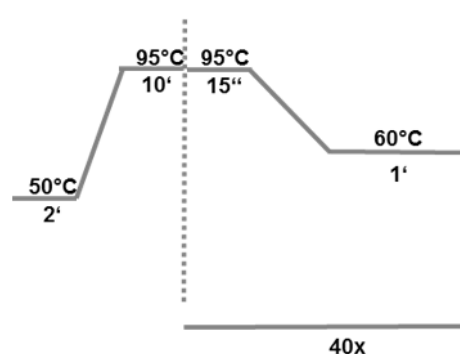


### 3.2.2.13 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR; engl.: *quantitative real-time polymerase chain reaction*) bietet die Möglichkeit der Quantifizierung der entstehenden PCR-Produkte durch Fluoreszenzmessung, wobei zwei Prinzipien unterschieden werden können. Zum einen kann eine gesteigerte Fluoreszenz eines Fluoreszenz-Farbstoffes (z. B. SYBR-Green) nach Interkalation in die DNA verwendet werden, zum anderen können Oligonukleotide als Sonde eingesetzt werden. Zur Bestimmung der Expressionsstärke der Promotorkonstrukte sowie der mRNA-Stabilität wurde eine qRT-PCR mit TaqMan-Sonden durchgeführt. Neben der *for* und *rev* Primer wurden zusätzlich sogenannte Hydrolysesonden eingesetzt, die an beiden Enden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind (*Reporter und Quencher*). Diese TaqMan-Sonden lagern sich in der kombinierten Annealing/Extensionsphase zwischen den beiden Primern an. Durch die 5' > 3' Endonukleaseaktivität der eingesetzten *Thermus aquaticus* (Taq)-Polymerase wird die Sonde in der Elongationsphase hydrolysiert, da diese am 3'-Ende nicht verlängert werden kann. Das Prinzip der anschließenden Fluoreszenz-Messung mit Hilfe von TaqMan-Sonden basiert auf einem Fluoreszenz-Resonanz-Transfer der durch die räumliche Nähe der beiden komplementären Fluorophore ermöglicht wird. Durch den Energietransfer wird das Fluoreszenzsignal des Reporters erniedrigt und die des Quenchers erhöht. Durch die Hydrolyse der Sonde wird die räumliche Nähe der komplementären Fluorophore aufgehoben, wobei das Reporter-Signal stärker und das Quencher-Signal schwächer wird. Zur Bestimmung der Promotoraktivität der Reporterstrukture und der Bestimmung der mRNA-Stabilität wurde die relative Expression des Reportergens GFP untersucht. Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurde die relative Expression des Reportergens LacZ bestimmt. Die tatsächlich eingesetzte DNA-Menge wurde durch das *housekeeping*-Gen GAPDH ermittelt. Es wurden der in (Tabelle 27) angegebene Ansatz sowie die in Abbildung 20 dargestellten Reaktionsbedingungen verwendet.

**Tabelle 27: Ansatz der qRT-PCR mittels TaqMan-Sonden**

TaqMan Gene Expression Master Mix	12,5 µl
TaqMan-Primer	1,25 µl
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 25 µl



**Abbildung 20: Temperaturprofil der TaqMan-PCR**

#### 3.2.2.14 Bestimmung der mRNA-Stabilität mittels Actinomycin D

Zur Bestimmung der mRNA-Stabilität wurde Actinomycin D in einer Endkonzentration von 10 µg/ml Medium für 1-8 h zu den transfizierten Ansätzen gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Actinomycin D-haltige Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit T/E abgelöst. Die RNA wurde isoliert (siehe 3.2.2.5) und die Stabilität nach reverser Transkription (siehe 3.2.2.12) mittels GFP-spezifischer PCR (siehe 3.2.2.13) bestimmt.

### 3.2.3 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.3.1 Verwendete Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die humane Lungenadenokarzinom Zelllinie A549 verwendet. Diese Zelllinie entstammt einem humanen Adenokarzinom eines 58-jährigen Mannes und dient als Modellsystem zur Untersuchung epithelialer Tumore der unteren Atemwege. Zusätzlich wurde die Zelllinie HNSCCUM-02T verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um ein humanes Plattenepithelkarzinom (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*), das aus dem Zungengrund eines 44-jährigen Mannes etabliert wurde<sup>107</sup>.

#### 3.2.3.2 Allgemeine Kulturbedingungen und Zellkultivierung

Die verwendeten Zelllinien wurden unter aseptischen Bedingungen in Zellkulturflaschen bei 37°C // 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei den verwendeten Karzinomzelllinien handelt es sich um adhärente Linien, die unter den genannten Bedingungen als *Monolayer* wachsen. Nach Konfluenz der Zellen wurde zur Subkultivierung zunächst das verbrauchte Medium abgenommen, der Zellrasen mit PBS gespült und die Zellen mit T/E-Lösung (1:10 in PBS) von der Kulturoberfläche abgelöst (4 min // 37°C). Durch Zugabe von 8 ml frischem Kulturmedium wird die Reaktion abgestoppt, die Zellen durch Resuspendierung vereinzelt und die Suspension zentrifugiert (400 xg // 5 min // RT). Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 6 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen, wobei ein Aliquot (2 ml) zur Subkultivierung in eine neue Kulturflasche gegeben wurde.

#### 3.2.3.3 Zellzahlbestimmung und Zellaussaat

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte lichtmikroskopisch unter Verwendung des Trypanblau-Ausschlusstests in einer Neubauer-Zählkammer. Das Testprinzip ist dabei die Fähigkeit vitaler Zellen, den Farbstoff Trypanblau aus dem Zellinneren zu transportieren. Auf Grund dieser fehlenden Fähigkeit der toten Zellen erscheinen diese

bei lichtmikroskopischer Betrachtung blau und können von lebenden Zellen unterschieden werden. Für die Bestimmung wurden 20 µl Trypanblau-Lösung (0,4 %) mit 20 µl Zellsuspension versetzt, auf die Zählkammer gegeben und ausgezählt. Die Zahl vitaler Zellen in der Zellsuspension pro ml ergibt sich aus folgender Gleichung.

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Durchschnitt pro Großquadrat} \cdot 2 \cdot 1000$$

Das Produkt der Gesamtzellzahl pro Großquadrat, dem Verdünnungsfaktor (2) und dem Kammerfaktor (10000) ergibt die Zellzahl /ml der Zellsuspension

In Tabelle 28 sind die für die durchgeführten Zellkultur-Ansätze verwendeten Volumina sowie die eingesetzten Zellzahlen der unterschiedlichen Reaktionsgefäße angegeben.

**Tabelle 28: Eingesetzte Zellzahl und Volumina der Reaktionsansätze**

Reaktionsansatz	Zellzahl	Volumen
6-well	250.000	2 ml
24-well	100.000	500 µl
96-well	15.000	200 µl
1 µm-Transwell	70.000	200 µl
8 µm-Transwell	250.000	200 µl
Scratch-assay (pro Kammer)	70.000	100 µl

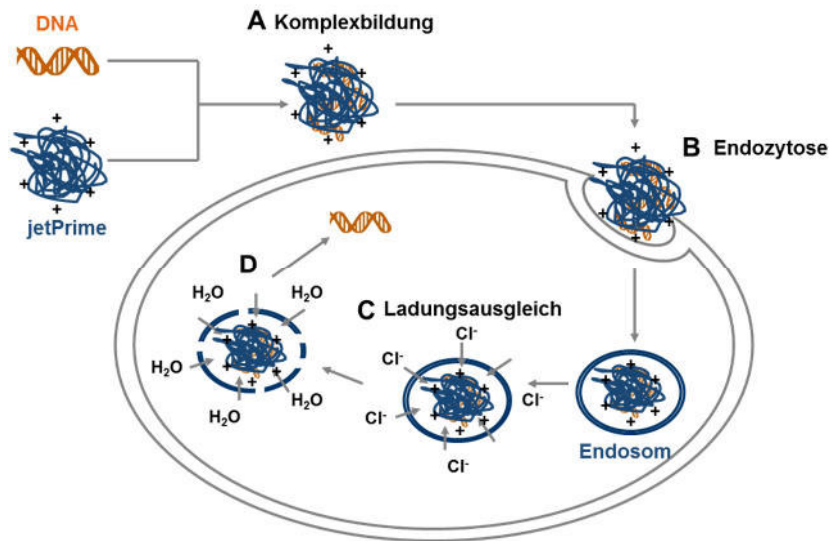
#### 3.2.3.4 Kryokonservierung der Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden die konfluenten Kulturen mit T/E von der Kulturoberfläche einer 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche abgelöst und zweimal mit PBS gewaschen (400 xg // 5 min // RT). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 3 ml fetalem Kälberserum (FCS; engl.: *fetal calf serum*) mit 10 % DMSO resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in sterilen Kryoröhrchen mit Hilfe einer Einfrierhilfe langsam (1°C / min) auf -80°C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Inkulturnahme eingefrorener Zellen wurden diese bei RT rasch aufgetaut, in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und zentrifugiert (400 xg // 5 min // RT). Das Zellpellet wurde resuspendiert und unter den in 3.2.3.1 genannten Kulturbedingungen kultiviert.

#### 3.2.3.5 Transfektion eukaryotischer Zellen mit jetPRIME®

Zur Transfektion der Reporterkonstrukte in eukaryotische Zellen wurde das Transfektionsreagenz jetPRIME® Reagent verwendet. Die Transfektion mittels jetPRIME® basiert auf einem polymerbasierten System dessen kationische Moleküle mit der negativ geladenen DNA positiv geladene Komplexe bilden (Abbildung 21, A). Diese Komplexe werden über Endozytose in die Zellen aufgenommen (Abbildung 21, B), indem die positiv geladenen Komplexe mit den negativ geladenen Phospholipiden der

Zellmembran interagieren. Nach der Aufnahme kommt es zur Azidifizierung der Endosomen, wobei die Protonen durch die als „Protonen-Schwamm“ wirkenden Komplexe abgefangen werden. Durch den kontinuierlichen Protonenfluss in das Endosom kommt es zum Ladungsausgleich durch Chloridionen (Abbildung 21, C) und einen daraus resultierenden erhöhten osmotischen Druck. Dem osmotischen Druck wird durch den Zufluss von Wasser entgegengewirkt, wodurch die Endosomen zum Platzen (Abbildung 21, D) gebracht werden und die DNA ins Zytoplasma freigesetzt wird.



**Abbildung 21: Transfektion der eukaryotischen Zellen mittels jetPRIME® Reagent**

Zur Transfektion der Tumorzelllinien wurde das Transfektionsreagenz jetPRIME® Reagent verwendet. Das Transfektionsreagenz bildet dabei mit der eingesetzten Plasmid-DNA kationische Komplexe (A) die über Endozytose in die Endosomen der Zellen aufgenommen werden (B). Durch den Ladungsausgleich in den Endosomen kommt es zum Einstrom von Chloridionen (C), der eine Erhöhung des osmotischen Drucks zur Folge hat. Im Anschluss kommt es zum Einstrom von Wasser der schließlich zum Platzen der Endosomen führt (D) (verändert nach<sup>119</sup>).

Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach dem Herstellerprotokoll mit Veränderungen. In Tabelle 29 sind die verwendeten Volumina der unterschiedlichen Reaktionsansätze aufgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen ausgesät und kultiviert (siehe 3.2.3.3). Zur Transfektion wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße das entsprechende Volumen Reaktionspuffer vorgelegt bevor die in Tabelle 29 aufgeführte Menge an Plasmid-DNA zugegeben wurde. Die Ansätze wurden 5 s gevortext, abzentrifugiert und das Transfektionsreagenz zugegeben. Nach einem erneuten Vortexen und Abzentrifugieren wurden die Ansätze für 12 min // RT inkubiert. Das Medium der zu transfizierenden Zellen wurde abgenommen, der Zellrasen mit PBS gewaschen und neues Medium in die Reaktionsansätze gegeben. Nach Ablauf der

Inkubationszeit wurden die Transfektionskomplexe auf die Zellen gegeben und zur Erhöhung der Transfektionseffizienz auf dem Horizontalschüttler inkubiert (150 rpm // 10 min // RT). Abschließend wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert (37°C // üN). Am nächsten Tag wurden die Komplexe von den Ansätzen abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Frisches Medium wurde auf die Zellen gegeben bevor diese erneut für 24 h im Brutschrank inkubiert wurden.

**Tabelle 29: Transfektionsansätze und –bedingungen**

Kultur-gefäß	Gesamt-volumen	jetPRIME® Puffer	DNA	jetPRIME® Reagent	Transfektions-ansatz
6-well	2 ml	200 µl	2 µg	4 µl	200 µl
24-well	0,5 ml	50 µl	0,5 µg	0,5 µl	50 µl
96-well	100 µl	5 µl	0,05 µg	0,5 µl	5 µl

### 3.2.3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die erfolgreiche Transfektion der pGlow-TOPO® Reporter-Konstrukte in die verwendeten Zelllinien wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie verifiziert. Das im Vektor lokalisierte Reporter-Gen GFP wird abhängig von der Promotoraktivität des ligierten Promotors exprimiert. GFP ist ein Protein, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht (395 bzw. 475 nm) unter dem Fluoreszenzmikroskop grün fluoresziert (509 nm). Durch diese Proteineigenschaft konnte die erfolgreiche Transfektion überprüft werden.

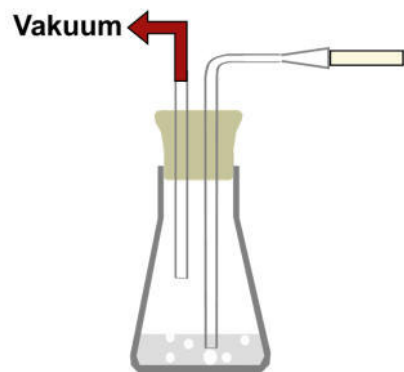
### 3.2.3.7 Isolation und Kultivierung von Primärzellen der Nasenschleimhaut

Die aus dem OP der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz erhaltenen Nasenschleimhautproben wurden bis zur Aufarbeitung bei 4°C in Basismedium (DMEM) oder PBS gelagert (bis zu 6 h). Zur Aufarbeitung wurde das Gewebe zunächst zerteilt und Knorpel sowie Knochen entfernt. Die Desinfektion des Gewebes erfolgte für jeweils 10 s in 70 % EtOH, Sterillium und 70 % EtOH, bevor es zum Verdau in 0,8 % Dispase II kommt (üN // 4°C). Am Folgetag wurde das verdaute Gewebe in Basismedium ausgewaschen, bevor es anschließend erneut zerkleinert und für 15 min bei 37°C in Accutase inkubiert wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gewebe mittels eines Zellschabers durch ein 70 µm Sieb gerieben, um die Zellen zu isolieren. Nachdem das Sieb bis zu einem Gesamtvolumen von ca. 40 ml gespült wurde, wurden die Zellen durch Zentrifugation (400 xg // 10 min) pelletiert. Der Überstand wurde dekandiert und das Zellpellet in CnT Prime Airway Medium aufgenommen. Zum Anzüchten der primären Zellen werden 80.000 Zellen / cm<sup>2</sup> in ein Kulturgefäß ausgesät. Nach der Isolation wurden die Zellen zu den in 3.2.3.1 genannten Kulturbedingungen kultiviert, wobei alle 3-5 Tage das

Medium ausgetauscht oder neues Medium zugegeben wurde. Zur Subkultivierung der Zellen bei einer Konfluenz von 80 % wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen, bevor die Zellen mit T/E (5 min // 37°C) abgelöst wurden. Im Anschluss wurde pro ml T/E 0,5 ml Trypsininhibitor zugegeben und für 5 min mit 10 ml Basismedium (DMEM) inkubiert. Nach der Zentrifugation (400 xg // 10 min) wurden die Zellen in CnT Prime Airway Medium kultiviert.

### 3.2.3.8 Herstellung des Zigarettenrauchextrakts

Der Zigarettenrauchextrakt (CSE; engl.: *cigarette smoke extract*) wurde nach einer Methode von Su *et al.* (1998) gewonnen<sup>120</sup>. Hierzu wurde durch eine Vakuumanlage (Abbildung 22) eine Zigarette (Marlboro Gold) in 10 ml (37°C) PBS „geraucht“. Diese Zigarettenmarke wurde verwendet, da die Feststoffzusammensetzung vergleichbar mit der der in Studien häufig verwendeten Kentucky Referenz-Zigarette ist<sup>121</sup>. Nach den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Su *et al.* (1998) entspricht eine 2,5 %-ige Lösung des entstehenden Extraktes einem Zigarettenkonsum von einer ½ Schachtel Zigaretten am Tag. Eine 10 %-ige Verdünnung hingegen einem Konsum von 2 Schachteln am Tag<sup>120</sup>. Vor der Verwendung wurde der gewonnene CSE sterilfiltriert (0,22 µM), um größere Feststoffe und Bakterien zu entfernen.



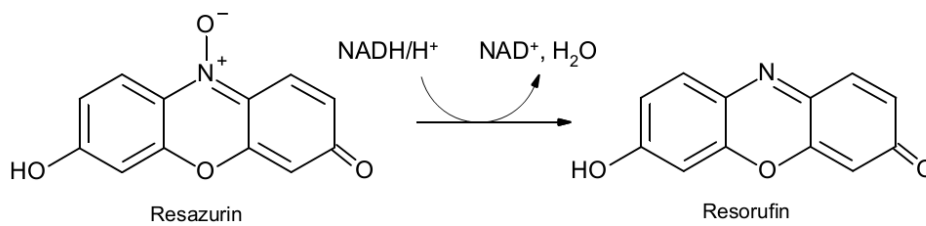
#### Abbildung 22: Gewinnung von CSE

Die Gewinnung des CSE erfolgte in einer Vakuumanlage nach Su *et al.* (2008)<sup>120</sup>. Dabei wurde eine Zigarette in 10 ml PBS (37°C) mit einem angelegten Vakuum von 0,4 l/min geraucht (A). Der entstandene CSE wurde anschließend sterilfiltriert (verändert nach<sup>120</sup>).

#### 3.2.3.8.1 AlamarBlue®-Assay

Zur Quantifizierung der metabolischen Aktivität der Zellen wurde ein AlamarBlue®-Assay durchgeführt. Das Prinzip der Methode ist die Verstoffwechslung des blauen, nicht fluoreszierenden Farbstoffes Resazurin in das rote und fluoreszierende Resorufin (Abbildung 23) durch zelleigene Reduktasen (z. B. NADPH-Dehydrogenase). Die

umgesetzte Menge des Redoxfarbstoffes wird anschließend bestimmt und als Maß für die Viabilität der Zellen verwendet<sup>122</sup>.



**Abbildung 23: Umsetzung des nicht-fluoreszierenden Resazurins in Resorufin**

Resazurin wurde zur Bestimmung der Zellviabilität eingesetzt. Gesunde, wachstumsfähige Zellen reduzieren dabei das Resazurin langsam zu Resorufin. Zytotoxische Stoffe reduzieren die metabolische Aktivität und somit das Redoxpotential der Zellen, wodurch das Resazurin langsamer oder nicht umgesetzt wird und als Maß der Viabilität der Zellen verwendet wird (verändert nach<sup>123</sup>).

Zur Durchführung des AlamarBlue<sup>®</sup>-Assays wurden die Zellen ausgesät (siehe 3.2.3.3) und inkubiert (siehe 3.2.3.8). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und die Totkontrollen für 10 min mit 70 % EtOH abgetötet. Im Folgenden wurden die Zellen für 3 h mit dem Indikatorfarbstoff (10 % (v/v) in frischem Medium) inkubiert (37°C // 5 % CO<sub>2</sub>) und die entstandene Fluoreszenz des Resorufins am Fluorometer vermessen (Ex. 540 nm; Em. 600 nm). Zur Normierung der Ergebnisse auf die Zellzahl wurde im Anschluss eine Kristallviolett färbung durchgeführt.

#### 3.2.3.8.2 Kristallviolett färbung

Die Färbung mit Kristallviolett beruht auf einer von Gillies *et al.* (1986) beschriebenen Methode zur Bestimmung der Zellzahl<sup>124</sup>. DNA-assoziierte Nukleoproteine der Zellen werden mit wässriger Kristallviolett-Lösung angefärbt bevor der Farbstoff mittels 10 %-iger Essigsäure aus den Zellen extrahiert und photometrisch (540 nm) gemessen wird. Die Farbtintensität wurde als Maß der Zellzahl verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kristallviolett färbung zusätzlich zur Quantifizierung der im AlamarBlue<sup>®</sup>-Assay ermittelten metabolischen Aktivität der Zellen durchgeführt. Zunächst wurde der AlamarBlue<sup>®</sup> Indikatorfarbstoff abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 min // RT mit 0,2 %-iger Kristallviolettlösung inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde der Farbstoff mit 40 µl einer 10 %-igen Essigsäure aus den Zellen extrahiert und bei 540 nm im Photometer vermessen.

### 3.2.3.8.3 LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Assay

Zur weiteren Untersuchung des zytotoxischen Einflusses des CSE wurde ein LIVE/DEAD®-Assay mittels des LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Assay Kits durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist die gleichzeitige Detektion lebender und toter Zellen durch zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe. Lebende Zellen werden dabei durch deren intrazelluläre Esterase-Aktivität detektiert indem das nicht-fluoreszierende Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) in fluoreszierendes Calcein (Ex. 495 nm // Em. 515 nm) gespalten wird. Die Detektion der toten Zellen erfolgt mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Ethidium Homodimer-1 (EthD-1), der durch die nicht-intakten Zellmembran in die Zelle gelangen kann und es durch Bindung mit Nukleinsäuren zu einer Erhöhung der Fluoreszenz kommt (Ex. 538 nm // Em. 638 nm). Zur Durchführung des LIVE/DEAD®-Assay wurden Zellen ausgesät (siehe 3.2.3.3) und inkubiert (siehe 3.2.3.8). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze zunächst mit PBS gewaschen und die Totkontrollen mit 70 % EtOH abgetötet (10 min). Die Zellen wurden anschließend mit 100 µl (96-well) der 4 µM EthD-1- sowie 2 µM Calcein-Arbeitslösung I inkubiert (30 min // RT) bevor die Fluoreszenz des Calceins (Ex. 495 nm // Em. 515 nm) und des EthD-1 (Ex. 538 nm // Em. 638 nm) im Fluorometer gemessen wurde. Zur abschließenden Quantifizierung wurde die Gesamtzellzahl bestimmt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 70 % EtOH (10 min) abgetötet, mit einer EthD-1-Arbeitslösung II erneut inkubiert (30 min // RT) und vermessen (Ex. 538 nm // Em. 638 nm).

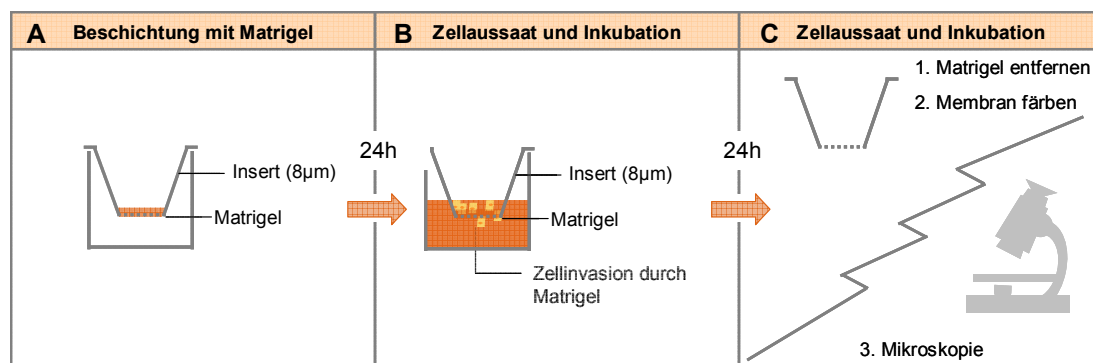
### 3.2.3.9 Migrations- und Invasionsassay

#### 3.2.3.9.1 Transwell-Invasionsassay

Der *Transwell*-Invasionsassay ist der am häufigsten verwendete Assay zur Bestimmung der Zellinvasion und wird durch dessen Einführung durch Boyden oftmals als *Boyden chamber assay* bezeichnet<sup>125,126</sup>. Das Prinzip dieser Methode basiert auf zwei Medium enthaltende horizontale Kammern, die durch eine poröse Membran (8 µm) getrennt sind, durch die die Zellen wandern können. Auf die poröse Membran der *Transwells* wurde Matrigel gegeben, um das Invasionsverhalten der Zellen besser mit den *in vivo* Verhältnissen vergleichen zu können (Abbildung 24). Matrigel ist das gereinigte Sekret der murinen Sarkom-Zelllinie Engelbreth-Holm-Swarm und gleicht in seiner Zusammensetzung annähernd der extrazellulären Matrix. Zur Beschichtung der *Transwells* wurde mit gekühlten Verbrauchsmaterialien gearbeitet. Hierzu wurde das aliquotierte Matrigel zunächst bei 4°C // üN aufgetaut. Das Matrigel wurde hierzu 1:6 mit DMEM verdünnt, 70 µl in die *Transwells* gegeben und üN im Brutschrank bei 37°C getrocknet (Abbildung 24, A). Zur Durchführung dieses Assays wurden Zellen in Basismedium (DMEM; siehe 3.2.3.3) in die *Transwells* ausgesät. In die untere Kammer



hingegen wurden 750  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium gegeben um einen Invasionsreiz zu bieten. Die Ansätze wurden 24 h im Brutschrank inkubiert, sodass die Zellen in vertikaler Richtung durch die Poren wandern konnten (Abbildung 24, B). Die Zellen wurden durch die Färbung nach Pappenheim fixiert und quantifiziert (Abbildung 24, C)<sup>127</sup>. Hierzu wurde zunächst das Medium der *Transwells* abgenommen und die *wells* zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die *Transwells* für 3 min in May-Grünwald-Lösung inkubiert und die Zellen durch das Methanol als Bestandteil der Lösung fixiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Lösung 1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und für 20 s inkubiert, bevor im direkten Anschluss die *Transwells* mit einer 2 %igen Giemsa-Lösung inkubiert wurden (30 min // RT). Nachdem die *Transwells* mit H<sub>2</sub>O gespült wurden, wurden die nicht migrierten Zellen und das Matrigel mit Hilfe eines Wattestäbchens entfernt. Die poröse Membran der *Transwells* wird zur Betrachtung unter dem Durchlichtmikroskop mit einem Skalpell aus den *Inserts* geschnitten und auf einen Objektträger gelegt. Zur Quantifizierung der migrierten Zellen wurde jede Membran mit 10 Bildern unter dem Mikroskop fotografiert und die migrierten Zellen computergestützt ausgezählt.



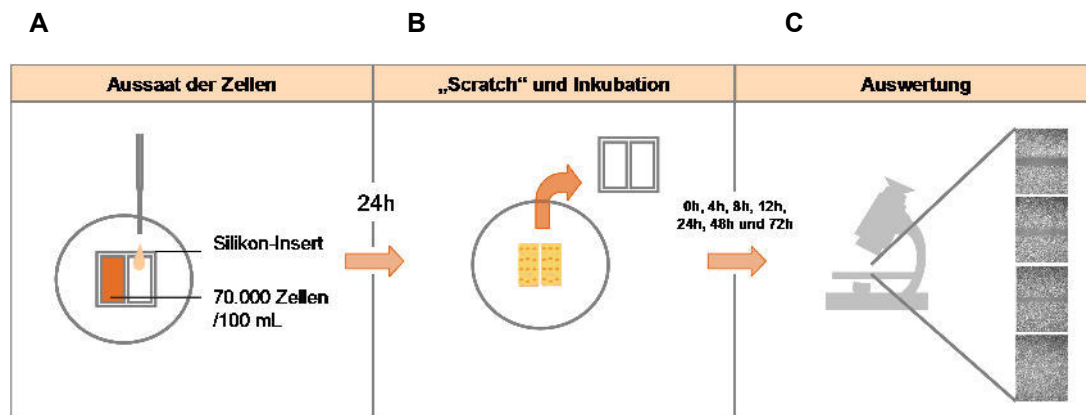
**Abbildung 24: Invasionsassay**

Zur Durchführung des *Transwell*-Invasionsassays wurden nach Beschichtung der *Transwells* (8  $\mu\text{m}$ ) mit Matrigel (A; Verdünnung 1:6 mit Basismedium) 0,25 MZ in 200  $\mu\text{l}$  DMEM ausgesät (B). Als Invasionsreiz wurden in die *wells* 750  $\mu\text{l}$  frisches Kulturmedium gegeben und für 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt, die Zellen mittels der Pappenheim-Färbung fixiert, gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet (C).

### 3.2.3.9.2 Wundheilungsassay

Der Wundheilungsassay („Scratch“-Assay) dient zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen. Zur Durchführung des Assays wurden die Einsätze der Firma Ibidi verwendet, die eine Kultivierung der Zellen in zwei Kammern ermöglicht. Nach Aussaat (siehe 3.2.3.3; Abbildung 25, A) und Inkubation (siehe 3.2.3.8) der Zellen wurden die Einsätze entfernt, wodurch ein definierter zellfreier Spalt entsteht (Abbildung 25, B). Die Migration der Zellen in den unbewachsenen Spalt wurde über

24 h dokumentiert (Abbildung 25, C) und die freie unbewachsene Fläche mit Hilfe der TScratch Software ausgewertet.



**Abbildung 25: Durchführung des Scratch-Assays**

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens der Zellen nach Transfektion und Inkubation mit CSE wurden die Zellen in zwei, durch ein Silikon-Insert getrennte Kammern ausgesät (A). Nach Konfluenz der Zellen wurde das Insert entfernt (B) und das Wachstum in den zellfreien Spalt lichtmikroskopisch dokumentiert (C).

### 3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.4.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mittels des DC Protein Assays. Das Prinzip der Methode ist eine kolorimetrische Proteinbestimmung durch die Reaktion von Proteinen mit einer basischen Kupfertartratlösung, die zur Reduktion des ebenfalls zugegebenen Folinreagenzes führt. Die Extinktion der Reduktionsprodukte wird bei 750 nm vermessen und dient als Maß der Proteinkonzentration. Zur Quantifizierung des Proteingehalts in der Probe wurde eine BSA-Kalibriergerade (0 µg/µl - 2 µg/µl) verwendet. Es wurden jeweils 5 µl der Zellysate in Dreifachbestimmung in 96-well Platten gegeben. Die weitere Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Nach Messung der Extinktion wurde eine Kalibriergerade erstellt und der Proteingehalt der Proben mittels der Funktionsgleichung der Geraden berechnet.

#### 3.2.4.2 ELISA

Mit dem *Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay* (ELISA) können Proteine nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung quantitativ bestimmt werden. Der spezifisch bindende Primärantikörper wird zunächst an eine Oberfläche gebunden bevor das Zielprotein an diesen bindet. Es folgt die Zugabe eines Sekundärantikörpers der zum einen eine Spezifität für das Zielprotein besitzt und an den zum anderen ein Enzym

gekoppelt ist, das eine Farbreaktion katalysiert. Im Anschluss kann nach Zugabe eines Substrats die Enzymaktivität als Maß des Proteingehalts in der Probe durch eine Farbreaktion bestimmt werden.

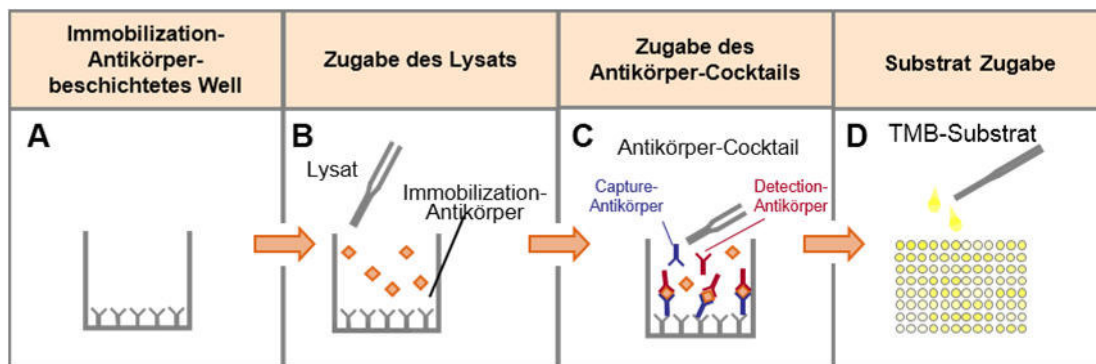
#### 3.2.4.2.1 VEGF A-Überstand-ELISA

Zur Untersuchung der VEGF A-Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde der *DuoSet® ELISA Development Systems Assay* (VEGF) durchgeführt. Die Überstände der un-/behandelten wurden abgenommen, zentrifugiert (4.000 xg // 5 min) und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der VEGF A-Konzentration wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden zunächst Mikrotiterplatten mit einer primären Antikörper-Lösung inkubiert (üN // RT). Am nächsten Tag wurden die Mikrotiterplatten 3x // 5 min mit Waschpuffer gewaschen und mit 1x Reagent-Diluent blockiert (1 h // RT). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Mikrotiterplatten erneut mit Waschpuffer gewaschen, bevor zur Bindung des VEGF A-Proteins an die Antikörper 100 µl der Proben bzw. der acht VEGF A-Standards (2000 mg/ml - 0 mg/ml) in die Platten pipettiert und für 2 h // RT inkubiert wurden. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl Detektions-Antikörper-Lösung in die Platten gegeben und erneut inkubiert (2 h // RT). Es folgte ein erneuter Waschschrift (3x // 5 min) bevor die Platten mit 100 µl einer Streptavidin-*horseradish peroxidase* (HRP)-Lösung inkubiert (20 min // RT (dunkel)) wurden. Zur abschließenden Detektion wurden die Platten erneut gewaschen und 100 µl Substrat-Lösung zugegeben (20 min // RT (dunkel)). Nach der Zugabe von 50 µl 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde der VEGF A-Gehalt der Proben und der Konzentrationsreihe im Photometer (450 nm und 540 nm) vermessen. Zur Wellenlängen-Korrektur wurde die Differenz der OD<sub>540 nm</sub> und der OD<sub>450 nm</sub> bestimmt und die VEGF A-Konzentration mit Hilfe einer Ausgleichsgeraden der Konzentrationsreihe berechnet.

#### 3.2.4.2.2 GFP-ELISA

Zur Untersuchung der mRNA-Stabilität auf Proteinebene wurde das *GFP SimpleStep ELISA® Kit* verwendet. Die *wells* der ELISA-Platten sind dabei mit einem *Immobilization*-Antikörper beschichtet. Die zu untersuchenden Proben und die GFP-Standards bilden mit einem Antikörper-Cocktail, der einen *Capture*- bzw. einen *Detection*-Antikörper enthält, einen *Capture*-Antikörper//Protein//*Detection*-Antikörper-Komplex der an die *Immobilization*-Antikörper im *well* bindet. Nach Inkubation der gebundenen Komplexe mit einem 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat und abschließender Zugabe einer Stop-Lösung kann die Farbreaktion bei 450 nm detektiert werden. Die Quantifizierung des Versuchs erfolgt mittels einer GFP-Standardkalibriergeraden. Nachdem die Zellen

ausgesät (siehe 3.2.3.3), transfiziert (siehe 3.2.3.5) und inkubiert wurden (siehe 3.2.3.8), wurden in jedes 6-well 250 µl 1x *Cell Extraction Buffer* gegeben. Die Zellen wurden geerntet und 15 min auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation (13.000 xg // 20 min // 4°C) der Lysate wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zu dessen Verwendung bei -80°C gelagert. Nach der Durchführung der Proteingehaltsbestimmung (siehe 3.2.4.1) wurden je 0,5 mg/ml Zelllysate in 50 µl *Cell Extraction-Buffer* bzw. 50 µl der acht GFP-Standards (2000 pg/ml-0 pg/ml) in die *wells* pipettiert. Durch Zugabe von 50 µl des Antikörper-Cocktails kommt es zur Bildung eines *Capture-Antikörper//GFP//Detection-Antikörper-Komplex* der an die *Immobilization-Antikörper* der *wells* bindet. Nach Inkubation auf einem Horizontalschüttler (400 rpm // 1 h // RT) wurden die *wells* mit Waschpuffer gewaschen und 100 µl eines TMB-Substrats in die *wells* pipettiert. Nach erneuter Inkubation auf einem Horizontalschüttler (400 rpm // 10 min // RT (dunkel)) wurde nach Zugabe von 100 µl *Stop-Solution* die Farbreaktion bei 450 nm bestimmt.



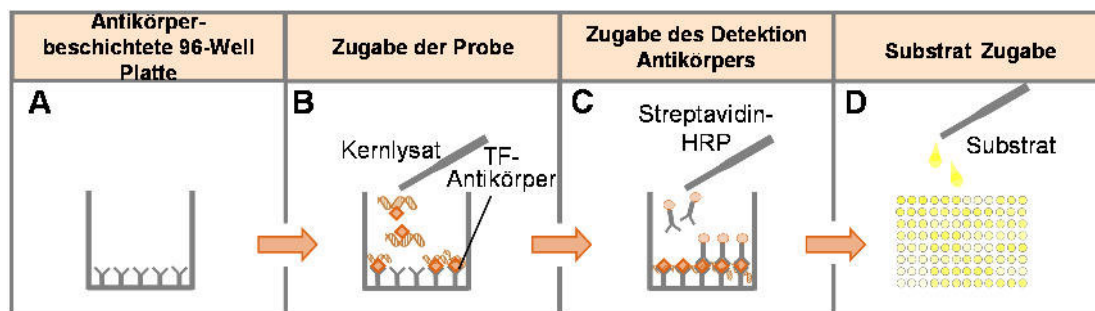
**Abbildung 26: Durchführung des GFP-ELISAs**

Nach der Lyse der Zellen wurde das Lysat in mit Immobilization-Antikörper beschichtete *wells* gegeben (A und B). Im Anschluss kommt es zur Bildung eines *Capture-Antikörper//Protein//Detection-Antikörper-Komplexes* das an den im *well* gebundenen *Immobilization-Antikörper* bindet (C). Nach TMB-Substratzugabe kommt es zur Farbreaktion, die bei 450 nm detektiert wurde (D; verändert nach<sup>128</sup>).

### 3.2.4.2.3 Transkriptionsfaktor-Array

Zur Untersuchung des Einflusses der CSE-Inkubation wurde ein Transkriptionsfaktor-Array zur Bestimmung der TF-Expression durchgeführt. Hierzu wurde der *TF Activation Profiling Plate Array II FA-1002* verwendet, wobei 96 Transkriptionsfaktoren parallel untersucht werden können. Nach Aussaat (6-well Format; siehe 3.2.3.3) der Zellen und Inkubation, wurde das Kernlysate mittels des *Nuclear Extraction Kits* gemäß den Herstellerangaben isoliert. Hierzu wurde das Medium der Ansätze abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen, bevor 250 µl der Puffer I-Arbeitslösung zugegeben und die Zellen auf dem Horizontalschüttler inkubiert wurden (200 rpm // 10 min // Eis). Nach dem

Ablösen der Zellen wurden die Zellen pelletiert (13.500  $xg$  // 5 min // 4°C) und nach Zugabe von 50  $\mu l$  Puffer II-Arbeitslösung auf einem Horizontalschüttler lysiert (200 rpm // 120 min // Eis). Das Kernlysats wurde nach abschließender Zentrifugation (13.000  $xg$  // 5 min // 4°C) in den Transkriptionsfaktor-Array eingesetzt, der ebenfalls gemäß den Herstellerangaben durchgeführt wurde. Hierzu wurden 10  $\mu l$  des isolierten Kernlysats mit 15  $\mu l$  *Binding*-Puffer und 5  $\mu l$  eines Transkriptionsfaktor Probe Mix II inkubiert (30 min // RT). Die TF-DNA-Komplexe wurden über eine equilibrierte Säule (200  $\mu l$  *Filter Binding Buffer*, 2.800  $xg$  // 1 min) aufgereinigt und isoliert. Das Eluat wurde anschließend in ein PCR-Tube überführt, 5 min bei 95°C denaturiert und in 500  $\mu l$  H<sub>2</sub>O (auf Eis) überführt. 600  $\mu l$  der denaturierten Probe wurden anschließend in 10 ml warmen (42°C) Hybridisierungspuffer verdünnt und je 100  $\mu l$  in die *wells* pipettiert (Abbildung 27, A). Die in der Probe enthaltenen DNA-TF-Komplexe binden dabei an die in den *wells* vorhandenen TF-Antikörper (Abbildung 27, B).



**Abbildung 27: Prinzip und Durchführung des Transkriptionsfaktor-Arrays**

Mittels des *TF Activation Profiling Plate Array II* kann die TF-Expression von 96 TF parallel untersucht werden. Prinzip der Methode ist die Bindung der im Kernlysats enthaltenen TF an die DNA und nach Aufreinigung an die entsprechenden Antikörper der Hybridisierungsplatte (A und B). Nach anschließender Zugabe eines sekundären Antikörpers (C) kann die TF-Expression mittels Farbreaktion bestimmt werden (D).

Das *well* des Wilms-Tumor-Transkriptionsfaktor 1 (WT1) diente dabei als Leerwert indem nur Hybridisierungspuffer zugegeben wurde (Abbildung 28). Die Platte wurde mit einer Folie luft- und lichtdicht abgeklebt und üN // 42°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen und die Platte dreimal mit je 200  $\mu l$  vorgewärmtem Hybridisierungs-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 200  $\mu l$  Blockierungspuffer zugegeben und die Platten auf einem Horizontalschüttler inkubiert (50 rpm // 15 min // RT). Nach dem Verwerfen des Puffers wurden 95  $\mu l$  Steptavidin-HRP zugegeben (Abbildung 27, C) und auf dem Horizontalschüttler inkubiert (50 rpm // 45 min // RT), bevor im Anschluss die Platte dreimal mit je 200  $\mu l$  Detektions-

Waschpuffer gewaschen wurde. Zur Detektion der gebundenen TF-DNA-Komplexe wurden 95 µl Substratlösung in die *wells* pipettiert (Abbildung 27, D) und nach einminütiger Inkubation im Luminometer vermessen. Zur Normalisierung des Arrays wurden die gemessenen Werte auf den TF WT1 bezogen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AP1	CDP	GATA	NF-1	Pit	Stat3	XBP	FOXG1	HoxA-5	NRF 2(A)	ProX1	SOX2
B	AP2	CREB	GR/PR	NFAT	PPAR	Stat4	AP3	FOXO1	HSF	Oct-1	RB	SOX9
C	AR	E2F-1	HIF	NF-E2	PXR	Stat5	AP4	FREAC-2	KLF4	Pax2	RUNX	SOX18
D	ATF2	EGR	HNF4	NFKB	SMAD	Stat6	COUP-TF	Gli-1	MyoD	Pax3	ROR (RZR)	SRY
E	Bm-3	ER	IRF	OCT4	Sp1	TCF/LEF	ELK	Gfi-1	MZF	Pax8	RXR	TFE3
F	C/EBP	Ets	MEF2	p53	SRF	YY1	FOXA1	HEN (NSCL-1)	Nkx2-5	PIT1	SF-1	USF-1
G	CAR	FAST-1	Myb	Pax-5	SATB 1	TR	FOXC1	HNF-1	Nkx3-2	PLAG1	SMUC	VDR
H	CBF	GAS/ISRE	Myc-Max	Pbx1	Stat1	TFIID	FOXO3	HOX4C	NRF1	MEF1	Snail	WT1

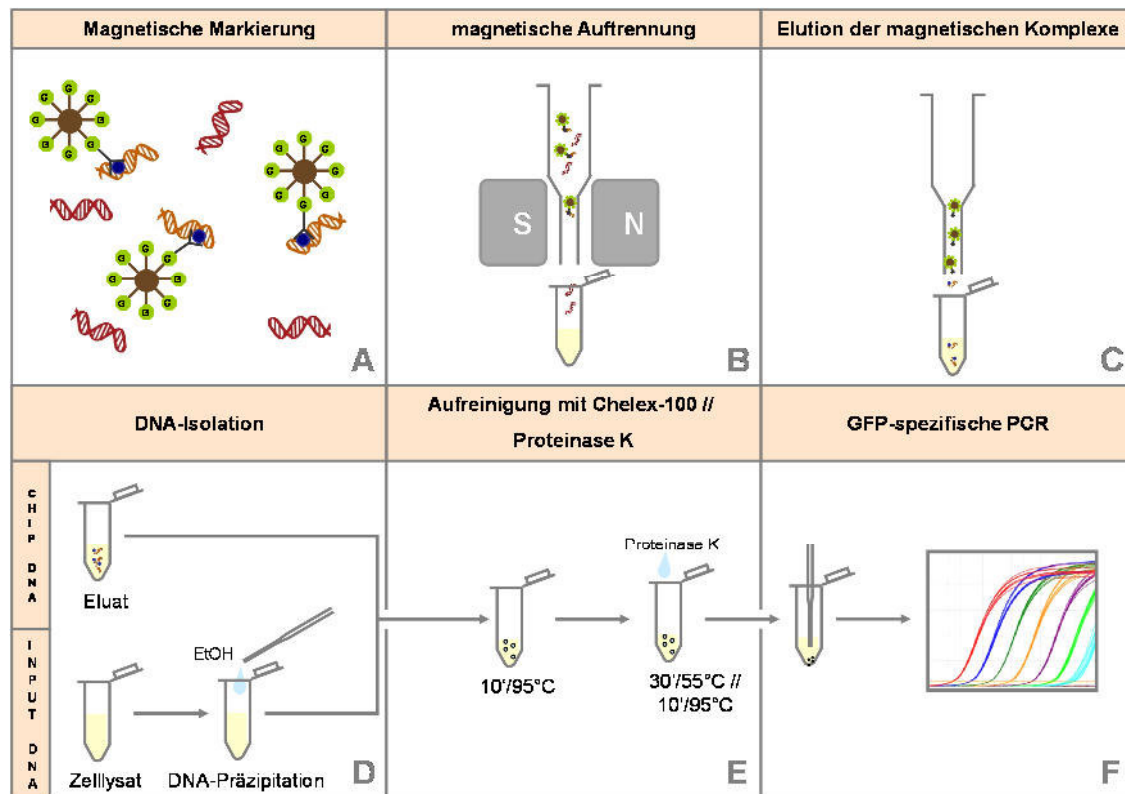
**Abbildung 28: Plattenbelegung des Transkriptionsfaktor-Arrays**

Mittels der *TF Activation Profiling Plate Array II* kann die TF-Aktivität von 96 TF parallel mit der gezeigten Plattenbelegung untersucht werden. Der Transkriptionsfaktor WT1 (*well* H12) diente dabei der Normalisierung.

### 3.2.4.3 Co-Chromatin-Immunopräzipitation (Co-ChiP)

Das Prinzip der Co-Chromatin-Immunopräzipitation (Co-ChiP) ist ein *cross-link* zwischen der DNA und den interagierenden TFs, bevor diese Komplexe mittels Antikörpergekoppelten magnetischen *Beads* isoliert und in eine spezifische qRT-PCR eingesetzt werden (Abbildung 29). Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an ein publiziertes Protokoll von Dahl *et al.* (2008)<sup>129</sup>. Zunächst wurden die Zellen ausgesät (6-*well* Format; siehe 3.2.3.3), transfiziert (siehe 3.2.3.5) und nach einer 24-stündigen Kultivierung inkubiert (siehe 3.2.3.3). Im Anschluss an die Inkubation wurde das Medium der Zellen abgenommen, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit T/E abgelöst. Nach einer Zentrifugation (4000 *xg* // 1 min // 4°C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (4000 *xg* // 1 min // 4°C). Anschließend wurden die Zellen in 150 µl PBS resuspendiert und nach Zugabe von 1 % Formaldehyd die TF-DNA-Interaktion fixiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 19 µl Glycin (1 M) zugegeben und erneut inkubiert (5 min // RT). Die Zellen wurden abzentrifugiert (4000 *xg* // 4 min // RT), in 500 µl ChiP-Lysepuffer resuspendiert und inkubiert (30 min // Eis). Um die DNA-TF-Komplexe über die Antikörpergekoppelten magnetischen *Beads* zu isolieren, wurden diese durch Sonifikation (30 s / 0,5 s / 90 % // 30 s Pause // 3x) in ca. 500 bp lange Fragmente zerkleinert,

abzentrifugiert und der Überstand bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.  $150\ \mu\text{l}$  des Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wobei es nach Zugabe von  $2\ \mu\text{g}$  TF-Antikörper zur Bildung von Antikörper-TF-DNA-Komplexen kommt. Zur magnetischen Markierung der Komplexe (Abbildung 29, A) wurden  $50\ \mu\text{l}$  der Protein G *MicroBeads* zugegeben und der Ansatz inkubiert ( $30\ \text{min}$  // Eis). Die entstandenen magnetisch markierten Antikörper-TF-DNA-Komplexe wurden auf  $\mu\text{Beads}$  gegeben, die zuvor mit ChiP-Lysepuffer equilibriert und in ein magnetisches Feld gestellt wurden. Die magnetisch markierten Komplexe verbleiben dabei im magnetischen Feld, wobei ungebundene DNA die Säulen passiert (Abbildung 29, B). Im Folgenden wurden die  $\mu\text{Beads}$  viermal mit ChiP-Lysepuffer ( $200\ \mu\text{l}$ ) und abschließend mit *Low-Salt*-Puffer ( $100\ \mu\text{l}$ ) gewaschen. Zur Elution der TF-DNA-Komplexe wurden zunächst  $20\ \mu\text{l}$  Elutions-Puffer ( $95^{\circ}\text{C}$ ) zugegeben und  $5\ \text{min}$  inkubiert. Das entstandene Tröpfchen wurde entfernt und die Komplexe schließlich durch Zugabe von  $50\ \mu\text{l}$  Elutions-Puffer ( $95^{\circ}\text{C}$ ) eluiert (Abbildung 29, C), wobei die  $\mu\text{Bead}$ -Antikörper-Komplexe im magnetischen Feld verbleiben. Zur Analyse der an die TF gebundenen DNA wurden zunächst die an die DNA gebundenen Proteine durch Zugabe und Inkubation mit einer 10 %-igen Chelex-Lösung in einem Horizontalschüttler ( $400\ \text{rpm}$  //  $10\ \text{min}$  //  $99^{\circ}\text{C}$ ) und  $1\ \mu\text{l}$  Proteinase K ( $30\ \text{min}$  //  $55^{\circ}\text{C}$ ) verdaut (Abbildung 29, E). Zur Deaktivierung der Proteinase K wurde der Ansatz erneut für  $10\ \text{min}$  bei  $99^{\circ}\text{C}$  inkubiert, der Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Durchführung der qRT-PCR bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für bis zu einer Woche gelagert. Zur Bestimmung der DNA-Menge, die in die Immunopräzipitation eingesetzt wurde, wurde die DNA der eingesetzten Probe (*Gesamt-Input-DNA*) isoliert und ebenfalls eine qRT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden  $100\ \mu\text{l}$  des Überstands, der in die Immunopräzipitation eingesetzt wurde, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und  $0,3\ \mu\text{l}$  Natriumacetat-Lösung ( $1\text{M}$ ) zugegeben. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von  $250\ \mu\text{l}$  EtOH ( $100\ \%$ ) präzipitiert ( $30\ \text{min}$  //  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Nach einer Zentrifugation ( $13.000\ \text{xg}$  //  $15\ \text{min}$  //  $4^{\circ}\text{C}$ ) wurde das DNA-Pellet in EtOH ( $70\ \%$ ) gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde ebenfalls in  $40\ \mu\text{l}$  10 %iger Chelex-Lösung aufgenommen und der Verdau der gebundenen Proteine, wie bereits beschrieben, durchgeführt. Die GFP-spezifischen qRT-PCR wurde wie unter 3.2.2.13 beschrieben durchgeführt.



**Abbildung 29: Durchführung des Co-ChIPs**

Bei der verwendeten Co-ChIPs wurden die Zellen zunächst transfiziert und inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen, Lyse in Lysepuffer und *cross-links* durch Formaldehyd wurden die Zellen sonifiziert. Die entstandenen TF-DNA-Komplexe werden an  $\mu$ Beads gekoppelt (A) die wiederum zuvor mit TF-spezifischen Antikörpern markiert wurden. Die Bead/TF-DNA-Komplexe wurden über ein magnetisches Feld isoliert (B/C) und nach Aufreinigung der DNA und Umkehrung des *cross-links* (D/E) schließlich in eine qRT-PCR eingesetzt (F).

### 3.2.4.4 Western Blot

#### 3.2.4.4.1 Gewinnung von Lysaten

Nach Behandlung der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. In jedes *well* einer 6-*well* Platte wurden 100  $\mu$ l Lysepuffer gegeben, die Zellen mittels eines Zellschabers abgelöst und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden diese auf Eis sonifiziert (30 s // 90 % // 0,5 s // 0,5 s Pause) und nach Zentrifugation (13.000  $xg$  // 10 min // 4 min) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.2.4.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

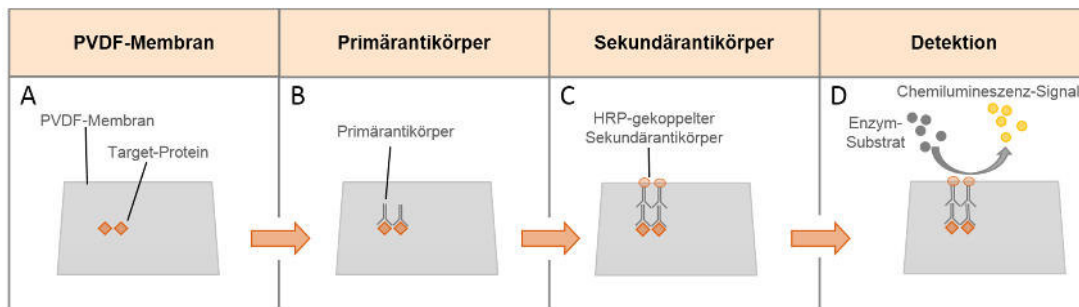
Zur Auftrennung von Proteinen nach deren Größe wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) verwendet. Hierbei werden die Eigenladungen der Proteine mittels der Denaturierung und negativen Ladung des SDS überdeckt und über



ein Polyacrylamidgel in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Zur Bestimmung der Molekulargewichte der detektierten Proteine wurde ein Protein Marker verwendet. Das verwendete diskontinuierliche System besteht aus zwei Gelen unterschiedlichen pH-Werts (Sammelgel: pH 8,8; Trenngel: pH 6,8), wobei die Proben im Sammelgel zunächst aufkonzentriert werden, bevor diese im Trenngel aufgetrennt wurden. Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden gemäß der vorangegangenen Proteinbestimmung (siehe 3.2.4.1) 40 µg eines Zelllysates eingesetzt und vor dem Auftragen in die Geltaschen bei 95°C // 10 min aufgeköcht. Der Gellauf erfolgte in 1x Laufpuffer bei Stromstärke von 10 mA pro Gel bis zum Erreichen des Trenngels. Im Anschluss wurde eine Stromstärke von 20 mA pro Gel angelegt (1 h).

#### 3.2.4.4.3 Western-Blot mittels des Semi-Dry-Verfahrens

Zum Nachweis und Quantifizierung der mittels der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden diese aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Hierzu wurden die in Transferpuffer eingeweichten Whatmanpapiere, das Gel und die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran in den Blotter geschichtet, sodass das Gel zur Anode gerichtet ist. Durch das Anlegen von 1,5 mA pro cm<sup>2</sup> Gel wurden die Proteine auf die Membran übertragen (Abbildung 30, A). Nach einem Waschschrift mit TBST<sub>20</sub>-Waschpuffer (1x 5 min) wurde die Membran für 1 h in Blockierungspuffer inkubiert bevor es nach einem weiteren Waschschrift (3x 5 min) zur Inkubation mit einem primären Antikörper (siehe Tabelle 8) kam (Abbildung 30, B; üN // 4°C). Nach erneutem Waschen der Membran (3x 5 min) wurde diese mit einem Zweitantikörper (1 h // RT) inkubiert (Abbildung 30, C) und die Proteine nach einem Waschschrift (3x 5 min) nach 2-minütiger Inkubation mit ECL (*enhanced chemiluminescent substrate*) detektiert (Abbildung 30, D). Die Detektion der Proteine beruht auf einer Chemilumineszenz-Reaktion. Hierbei kommt es zur Oxidation des Luminol basierten Detergenz ECL durch die am sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase (HRP; engl.: *horseradish peroxidase*) und dabei zur Emission von Licht das mittels eines Detektors aufgenommen werden kann. Die Beladungskontrolle der aufgetragenen Proteinmenge erfolgte mittels des *housekeeping*-Proteins β-Aktin. Hierzu wurde die Membran zur Entfernung der Antikörper zunächst gestrippt (30 min // RT // 25 mM Glycin (pH 2)). Im Anschluss erfolgen eine Inkubation mit 1 % (w/v) SDS und ein Waschschrift (3x5 min). Die Inkubation der Beladungskontrolle erfolgte nach Blockierung der Membran. Zur densitometrischen Auswertung der Blots wurde die Software Image Lab verwendet.



**Abbildung 30: Prinzip der Immunodetektion des Western Blots**

Nach dem Übertragen der Proteine auf die PVDF-Membran (A) wurde diese nach Blockierung der Membran üN bei 4°C mit dem Primärantikörper des Zielproteins inkubiert (B). Nach einem Waschschrift erfolgt die Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (C), wodurch nach Substratzugabe eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert wird, die mittels des Detektors aufgenommen werden kann (D).

### 3.2.5 Statistische Auswertung

Mit Ausnahme der Versuche mit Primärkulturen wurden alle Versuche mindestens dreimal unabhängig reproduziert und als arithmetisches Mittel mit der dazugehörigen Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels der Software GraphPad Prism. Die CSE-Konzentrationsreihen sowie die mit unterschiedlichen Konstrukten transfizierten Zellen wurden mittels des *One-way* ANOVA und anschließendem Post-Hoc-Test nach der Bonferroni-Methode kalkuliert. Nach Transfektion der Promotorkonstrukte und Inkubation mit CSE wurde nach Bestimmung der VEGF-Promotoraktivität ein *unpaired t-test* durchgeführt. Ein Signifikanzniveau  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant,  $p < 0,01$  (\*\*) als statistisch hoch signifikant und  $p < 0,001$  (\*\*\*) als statistisch äußerst signifikant angenommen.

## 4 Ergebnisse

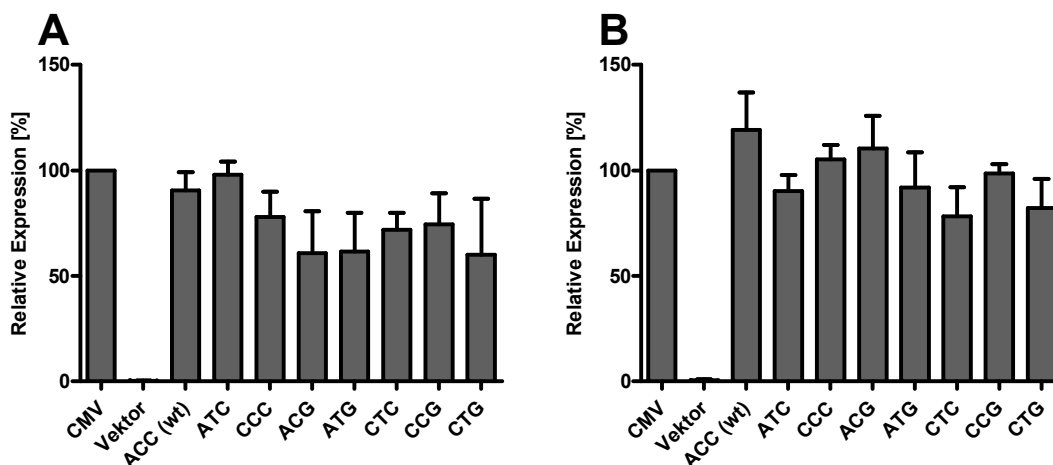
### 4.1 Untersuchung der VEGF-Expression

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des potenziellen Einflusses der in epidemiologischen Studien als krankheitsassoziiert beschriebenen SNPs auf die VEGF-Expression. Zudem sollte die Wirkung von Zigarettenrauchextrakt (CSE) in Abhängigkeit spezifischer SNPs untersucht werden. Zur mechanistischen Untersuchung der SNP-abhängigen VEGF-Regulation wurde die Promotoraktivität der verwendeten Zelllinien nach Transfektion mit Reporterkonstrukten analysiert. In den Konstrukten befindet sich der VEGF-Promotor (2744 bp), der mit den SNPs -2578 A/C, -460 C/T und +405 C/G sowie deren Kombinationen mutiert wurde. Der Reportervektor erlaubt die Untersuchung der Promotoraktivität durch das Maß der Expressionsstärke des Reportergens GFP. Im Anschluss wurde zur Untersuchung der genotypspezifischen VEGF-Expression und des Einflusses von CSE eine VEGF-spezifische qRT-PCR der primären Nasenschleimhautzellen durchgeführt. Neben der Untersuchung der VEGF-Expression durch eine qRT-PCR wurde der Einfluss der SNPs sowie die Inkubation mit CSE auf proteinchemischer Ebene mittels VEGF-ELISA analysiert. Zusätzlich wurde das zytotoxische Potenzial des verwendeten CSE sowie die Migration und Invasion untersucht.

#### 4.1.1 SNP-abhängige VEGF-Promotoraktivität

Zur Untersuchung der SNP-abhängigen VEGF-Promotoraktivität und dem Einfluss von CSE wurden die verwendeten Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T zunächst mit den VEGF-Reporterkonstrukten transfiziert. Als Positivkontrolle wurde in diesen Vektor anstatt des VEGF-Promotors der CMV-Promotor einkloniert, wobei als Negativkontrolle der leere Vektor verwendet wurde. Nach der Transfektion wurden Zellen mit 10 % CSE inkubiert, nach Ablauf der Inkubationszeit die RNA isoliert, revers transkribiert und zur GFP-spezifischen qRT-PCR eingesetzt. Die relative Expression wurde hierbei auf das *housekeeping* Gen GAPDH bezogen. In Abbildung 31 ist die SNP-abhängige VEGF-Promotoraktivität der untersuchten Zelllinien A549 (A) und HNSCCUM-02T (B) dargestellt. In A549 konnte nach Transfektion mit dem Reporterkonstrukt SNP -460 (ATC; +7 %) eine leichte Erhöhung der Promotoraktivität bezüglich des *wt* (ACC) beobachtet werden. Die anderen SNPs zeigen im Vergleich zum *wt* eine geringere Promotoraktivität. Vergleicht man die untersuchten SNPs im Einzelnen, erhöht der SNP -460 (ATC; +7 %;  $p > 0,05$ ) die Promotoraktivität leicht, während der SNP -2578 (CCC; -13 %;  $p > 0,05$ ) eine reduzierte Aktivität aufweist. Der SNP +405

(ACG; -30 %) besitzt bei der Betrachtung der einzelnen SNPs die geringste Promotoraktivität ( $p > 0,05$ ). Die Untersuchung von zwei SNPs in Kombination zeigt für -460//+405 ( $p > 0,05$ ; AGT; -29 %) eine erniedrigte Promotoraktivität. Die SNP-Kombinationen -2578//-460 ( $p > 0,05$ ; CTC; -19 %) und -2578//+405 ( $p > 0,05$ ; CCG; -16 %) weisen eine höhere Promotoraktivität auf als die Kombination der SNPs +405//-460 ( $p > 0,05$ ; CGT; -29 %). Die Kombination aller drei untersuchten SNPs ( $p > 0,05$ ; CTG; -31 %) besitzt die geringste Promotoraktivität. Für die OSCC-Zelllinie HNSCCUM-02T konnte für alle untersuchten SNPs sowie deren Kombinationen eine erniedrigte Expression im Vergleich zum *wt* gezeigt werden. Bei der Betrachtung der einzelnen SNPs steigt die relative Expression in der Reihenfolge -460 ( $p > 0,05$ ; ATC; -29 %), -2578 ( $p > 0,05$ ; CCC; -14 %) und +405 ( $p > 0,05$ ; ACG; -9 %). Die Kombination -2578//+405 ( $p > 0,05$ ; CCG; -20 %) besitzt ein niedrigeres relatives Expressionslevel als die jeweiligen Level der Einzel-SNPs. Die niedrigsten Expressionslevel konnten für die SNP-Kombinationen -2578//-460 (CTC; -28 %;  $p > 0,05$ ) und -2578//-460//+405 (CTG; -18 %;  $p > 0,05$ ) beobachtet werden.



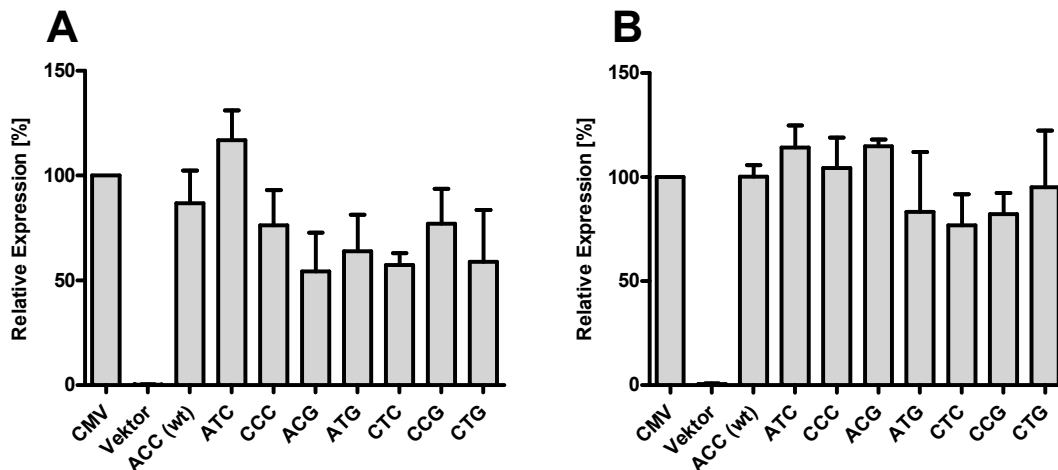
#### Abbildung 31: Messung der SNP-abhängigen VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion mit VEGF-Promotor-SNP-Konstrukten

Nach der Transfektion der Zelllinien A549 (A) und HNSCCUM-02T (B) wurde die SNP-abhängige Promotoraktivität untersucht. Hierzu wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und zur GFP-spezifischen qRT-PCR eingesetzt. Die relative GFP-Expression wurde durch die  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ -Methode mittels des *housekeeping* Gens GAPDH quantifiziert und als Prozent der Positivkontrolle (CMV-Promotor) angegeben. In der Zelllinie A549 konnte nur nach Transfektion des Promotorkonstrukts -460 ( $p > 0,05$ ; ATC) eine vergleichbare Promotoraktivität mit dem *wt* gezeigt werden. Die restlichen untersuchten Konstrukte zeigen eine geringere Promotoraktivität (A). In der Zelllinie HNSCCUM-02T konnte nach Transfektion der Konstrukte -460 ( $p > 0,05$ ; ATC), -460//+405 ( $p > 0,05$ ; ATG), -2578//-460 ( $p > 0,05$ ; CTC), -2578//+405 ( $p > 0,05$ ; CCG) und -2578//-460//+405 ( $p > 0,05$ ; CTG) eine geringere Promotoraktivität beobachtet werden, während die anderen Konstrukte keinen Unterschied im Vergleich zum *wt* zeigten (B) ( $n=3$ ).

#### 4.1.2 Einfluss von CSE auf die SNP-abhängige VEGF-Promotoraktivität

Im Anschluss an die Untersuchung der SNP-abhängigen Promotoraktivität sollte der SNP-abhängige Einfluss von CSE untersucht werden. Nach Transfektion der Zellen mit den genannten Reporterkonstrukten wurden die Ansätze für 24 h mit 10 % CSE inkubiert. Anschließend wurde nach Ablauf der Inkubationszeit die RNA isoliert und eine GFP-abhängige qRT-PCR durchgeführt. In Abbildung 32 sind die relativen Expressionen als Prozente der Positivkontrolle CMV für die Zelllinien A549 (A) und HNSCCUM-02T (B) dargestellt.

In der Zelllinie A549 weisen alle untersuchten Konstrukte, mit Ausnahme des Reporterkonstrukts -460 ( $p > 0,05$ ; ATC; 117 %), eine geringere Promotoraktivität im Vergleich zum *wt* (ACC; 87 %) auf. Die relative Expression der einzelnen SNPs nach Inkubation mit 10 % CSE nimmt dabei in der Reihenfolge SNP -460 ( $p > 0,05$ ; ATC; +30 %), SNP -2578 ( $p > 0,05$ ; CCC; -11 %) und +405 ( $p > 0,05$ ; ACG; -33 %) ab. Die Untersuchung der Promotoraktivität für die Konstruktkombinationen -460//+405 ( $p > 0,05$ ; ATG; -23 %), -2578//-460 (CTC; -30 %;  $p > 0,05$ ) und -2578//+405 ( $p > 0,05$ ; CCG; -10 %) sowie -2578//-460//+405 ( $p > 0,05$ ; CTG; 29 %) zeigt eine geringere Promotoraktivität als der *wt*. Die Transfektion der Zelllinie HNSCCUM-02T mit den untersuchten SNPs resultiert nach Inkubation mit CSE in den Konstrukten -460 ( $p > 0,05$ ; ATC; +14 %) und +405 (ACG; +15 %;  $p > 0,05$ ) in einer erhöhten, mit dem Reporterkonstrukt -2578 (CCC; +4 %;  $p > 0,05$ ) in einer vergleichbaren, relativen Expression bezüglich des *wt*. Die Promotoraktivität nach Transfektion mit einer Kombination zweier SNPs weist in allen untersuchten Kombinationen eine relative Promotoraktivität von ca. 80 % auf und liegt dabei 20 % unter der des *wt*. Die Kombination aller drei untersuchten SNPs (CTG; 95 %;  $p > 0,05$ ) zeigt hingegen eine Promotoraktivität vergleichbar mit dem *wt*.



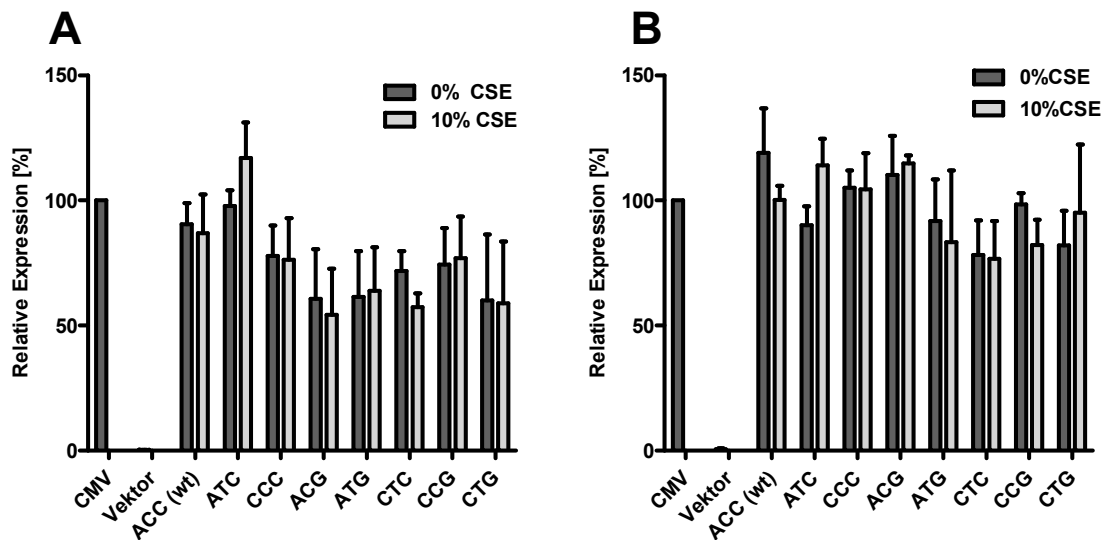
**Abbildung 32: Messung der CSE- und SNP-abhängigen VEGF-Promotoraktivität**

Im Anschluss an die Transfektion der Zelllinien A549 (A) der HNSCCUM-02T (B) wurde die SNP-abhängige Promotoraktivität nach Inkubation mit CSE untersucht. Hierzu wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und zur GFP-spezifischen qRT-PCR eingesetzt. Die relative GFP-Expression wurde durch die  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ -Methode mittels des *housekeeping* Gens GAPDH quantifiziert und als Prozent der Positivkontrolle (CMV-Promotor) angegeben. Im Vergleich zum *wt* (ACC) konnte in der Zelllinie A549 nach Inkubation mit 10 % CSE eine geringere Promotoraktivität für die SNP-Konstrukte +405 ( $p > 0,05$ ; ACG), -460//+405 ( $p > 0,05$ ; ATG), -2578// -460 ( $p > 0,05$ ; CTC) und -2578// -460//+405 ( $p > 0,05$ ; CTG) beobachtet werden (A). Die Promotoraktivität des Konstruktes -460 ( $p > 0,05$ ; ATC) war in A549 im Vergleich zum *wt* (ACC) erhöht. In der Zelllinie HNSCCUM-02T konnten eine erhöhte Promotoraktivität der Konstrukte -460 ( $p > 0,05$ ; ATC) und +405 ( $p > 0,05$ ; ACG) bezüglich des *wt* beobachtet werden (B). Geringere Promotoraktivitäten konnten für die SNP-Kombinationen -2578// -460 ( $p > 0,05$ ; CTC), -460//+405 ( $p > 0,05$ ; ATG), -2578// -460//+405 ( $p > 0,05$ ; CTG) und -2578//+405 ( $p > 0,05$ ; CCG) beobachtet werden. Keine Veränderung wurde für den SNP -2578 ( $p > 0,05$ ; CCC) gezeigt ( $n=3$ ).

#### 4.1.3 Vergleich der Promotoraktivität der mit CSE inkubierten Zellen mit den unbehandelten Kontrollen in Abhängigkeit des Genotyps

Die vergleichende Betrachtung der mit CSE behandelten, transfizierten Ansätze sowie der unbehandelten Kontrolle ist in Abbildung 33 dargestellt. Gezeigt ist wiederum die relative Expression der behandelten und unbehandelten Ansätze normiert auf die Positivkontrolle CMV. Nach Transfektion der Zelllinie A549 mit dem Reporterkonstrukt -460 (ATC) konnte eine gesteigerte VEGF-Promotoraktivität ( $p > 0,05$ ; +19 %) nach Inkubation mit 10 % CSE im Vergleich zur transfizierten, unbehandelten Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 32, A). Der Reporterkonstrukt -2578// -460 ( $p > 0,05$ ; CTC; -14 %) hingegen weist nach Inkubation eine verringerte Promotoraktivität bezüglich dessen unbehandelter Kontrolle auf. Nach Transfektion und Inkubation mit 10 % CSE konnte für die übrigen Reporterkonstrukte keine Veränderung der VEGF-Promotoraktivität im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle beobachtet werden. Die relative Expression im Rahmen einer vergleichenden Betrachtung der HNSCCUM-02T ist in Abbildung 33 (B) dargestellt. Die Inkubation der mit dem *wt*-

Konstrukt transfizierten HNSCCUM-02T resultiert in einer Abnahme der Promotoraktivität von 19 % ( $p > 0,05$ ). Vergleichbares wurde nach Transfektion mit dem Konstrukt -2578//+405 ( $p > 0,05$ ; CCG; -16 %) gezeigt. Die Transfektion mit dem Konstrukt -460 (ATC; +24 %;  $p > 0,05$ ) resultiert in einer erhöhten VEGF-Promotoraktivität nach Inkubation mit CSE im Vergleich zum unbehandelten Ansatz.



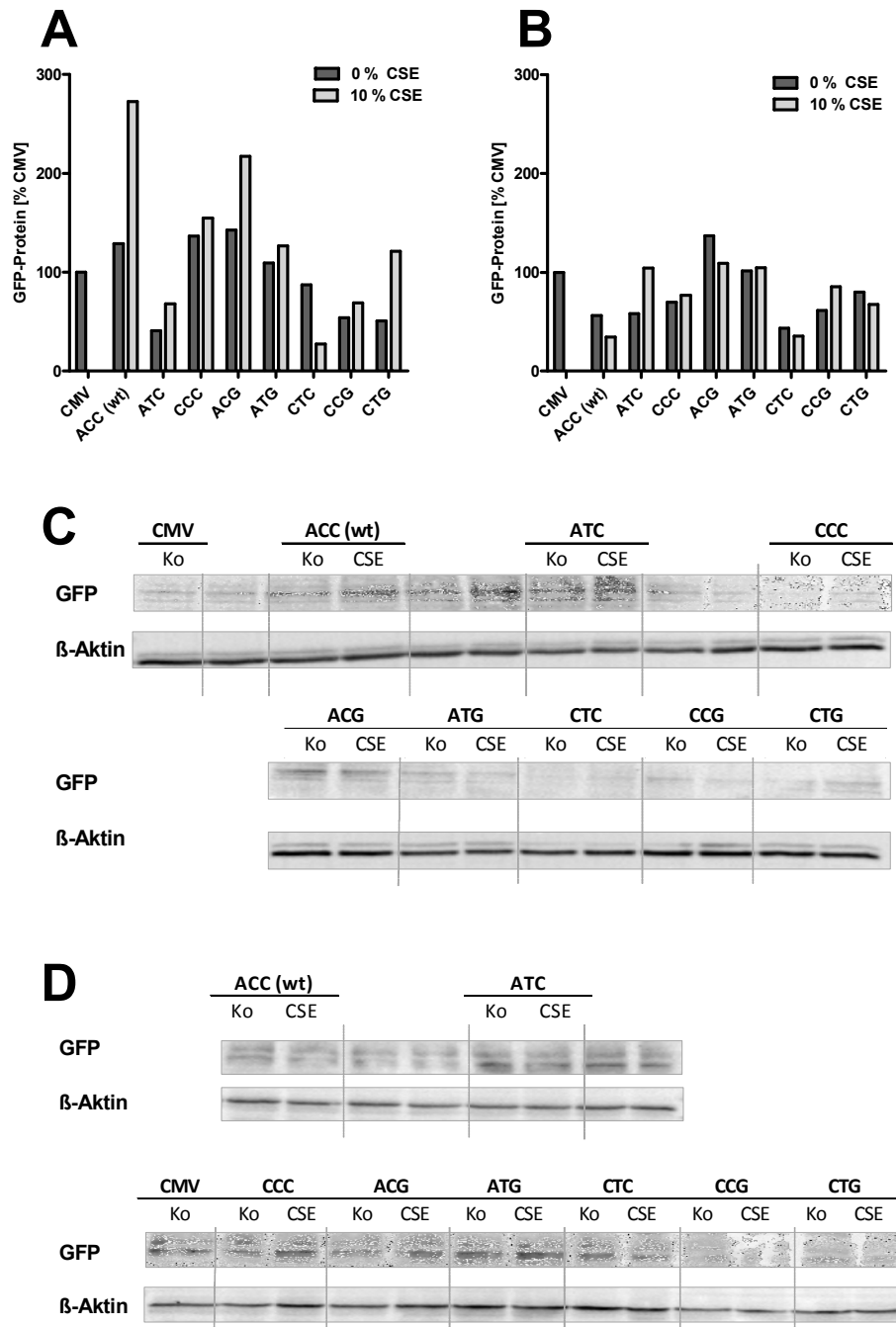
**Abbildung 33: Messung des Einflusses von CSE auf die Promotoraktivität in Abhängigkeit des Genotyps**

Nach der Transfektion der Zelllinien A549 (A) und HNSCCUM-02T (B) wurde die SNP- und CSE-abhängige Promotoraktivität vergleichend gegenübergestellt. In der Zelllinie A549 konnte eine erhöhte VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion des Promotor-SNPs -460 ( $p > 0,05$ ; ATC) und Inkubation mit CSE beobachtet werden. Eine verringerte Promotoraktivität konnte hingegen nach Transfektion und Inkubation des Reporterkonstrukts -2578//+460 gezeigt werden ( $p > 0,05$ ; CCG). Im Gegensatz dazu konnte in der Zelllinie HNSCCUM-02T eine reduzierte Promotoraktivität der Konstrukte des wt ( $p > 0,05$ ; ACC) und der Kombination -2578//+405 ( $p > 0,05$ ; CCG) nach Inkubation mit 10 % CSE beobachtet werden. Eine Erhöhung der VEGF-Promotoraktivität konnte für das SNP-Konstrukt -460 ( $p > 0,05$ ; ATC) gezeigt werden ( $n=3$ ).

Zur Untersuchung der SNP-abhängigen VEGF-Promotoraktivität und des Einflusses von CSE auf Proteinebene, wurde nach Transfektion und Inkubation der Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. In der Zelllinie A549 konnte eine mit dem wt-Konstrukt vergleichbare GFP-Proteinkonzentration nach Transfektion mit den Reporterkonstrukten -2578 (CCC; -8 %) und +405 (ACG; +14 %) beobachtet werden (Abbildung 34; A/C). Die Transfektion mit den Konstrukten -460//+405 (ATG; -19 %) und -2578//+460 (ATC; -42 %) resultierte in einer leichten Abnahme der Expression im Vergleich zum wt. Die niedrigsten GFP-Expressionen konnten für die Konstrukte -460 (ATC; -88 %), -2578//+405 (CCG; -75 %) und -2578//+460//+405 (CTG; -78 %) gezeigt werden. Die vergleichende Betrachtung der

transfizierten unbehandelten A549 mit den mit CSE behandelten Zellen zeigte mit Ausnahme des Reporterkonstrukts -2578//-460 (CTC; -60 %) eine erhöhte GFP-Expression. Die größte Veränderung nach Inkubation mit 10 % CSE konnte nach Transfektion des *wt*-Konstrukts sowie den Konstrukten +405 (ACG, +75 %) und -2578//-460//+405 (CTG; +71 %) gezeigt werden. In der Zelllinie HNSCCUM-02T konnte nach Transfektion eine mit dem *wt* vergleichbare GFP-Proteinkonzentration für die Reporterkonstrukte -460 (CTC; 58 %), -2578 (ACC; 70 %) und -2578//+405 (ACG; 62 %) beobachtet werden (Abbildung 34; B/D). Die niedrigste Proteinkonzentration in HNSCCUM-02T wurde nach Transfektion des Reporterkonstrukts -2578//-460 (ATC; 44 %) gezeigt. Eine im Vergleich zum *wt* erhöhte GFP-Proteinkonzentration konnte nach Transfektion der Konstrukte +405 (CCG; 137 %), -460//+405 (CTG; 102 %) und -2578//-460//+405 (ATG; 80 %) beobachtet werden. Die Inkubation der transfizierten Zellen mit CSE resultiert in den Konstrukten -2578 (ACC), -460//+405 (CTG), -2578//-460 (ATC) und -2578//-460//+405 (ATG) in keiner Veränderung der GFP-Expression. Eine Abnahme wurde nach Transfektion des *wt* sowie des Konstrukts +405 (CCG; -28 %) gezeigt, während eine erhöhte Proteinkonzentration für die Konstrukte -460 (CTC; +46 %) und -2578//+405 (ACG; +24 %) bezüglich der jeweiligen unbehandelten Kontrolle beobachtet werden konnte.





**Abbildung 34: Messung der CSE-abhängigen Proteinkonzentration nach Transfektion der Zelllinien mit SNP-Promotorkonstrukten**

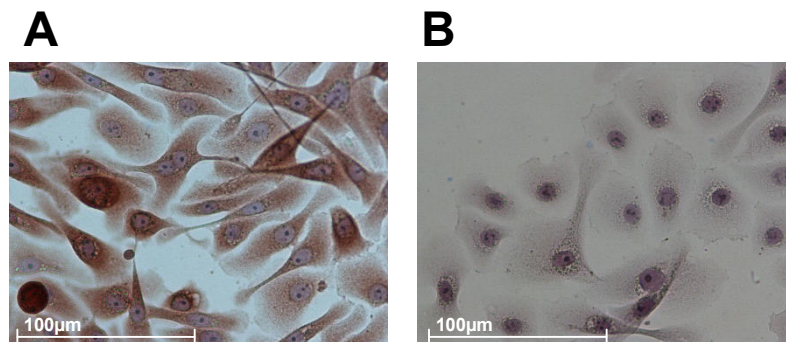
Die Zelllinien wurden zunächst transfiziert und mit 10 % CSE inkubiert. Im Anschluss wurden Zellysate hergestellt, zur SDS-PAGE eingesetzt und ein GFP-spezifischer Western Blot durchgeführt. In (A) und (B) sind die auf die eingesetzte Proteinmenge mittels des *housekeeping* Gens  $\beta$ -Aktin quantifizierte Proteinkonzentrationen dargestellt. In der Zelllinie A549 (A; C) konnte im Vergleich zum *wt* eine vergleichbare Proteinkonzentration für die SNPs -2578 (CCC) und +405 (ACG) beobachtet werden. Für die restlichen untersuchten Haplotypen konnte eine geringere Proteinkonzentration gezeigt werden. Die SNP-spezifische Änderung der Proteinkonzentration der Zelllinie HNSCCUM-02T ist in (B) und (D) gezeigt. Während im Vergleich zum *wt* eine erhöhte GFP-Konzentration für die Konstrukte +405 (ACG) und -460/+405 (ATG) gezeigt werden konnte, wurde für den SNP -2578/-460 (CTC) eine geringere Konzentration beobachtet. Nach Transfektion der Konstrukte -460 (ATC) und -2578/+405 (CCG) und Inkubation steigt die GFP-Proteinkonzentration ( $n=1$ ).

#### 4.1.4 SNP-abhängige VEGF-Expression und -Proteinkonzentration

Die Ergebnisse der Untersuchung des SNP-abhängigen Einflusses von CSE auf die VEGF-Promotoraktivität weist auf eine Abhängigkeit der VEGF-Regulation durch CSE hin. Mittels der primären Nasenschleimhautzellen sollte die SNP-abhängige VEGF-Expression und –Translation bestätigt werden und der Einfluss von CSE untersucht werden. Hierzu wurden epitheliale Zellen aus primärer Nasenschleimhaut isoliert und mittels Cytokeratin 13 Färbung deren epithelialer Ursprung verifiziert. Des Weiteren wurde eine Färbung des FGFR4 als Positivkontrolle für Fibroblasten durchgeführt. Im Anschluss wurden die isolierten Epithelzellen für 24 h mit 10 % CSE inkubiert, die RNA isoliert, revers transkribiert und zur VEGF-spezifischen qRT-PCR eingesetzt. Die relative Expression wurde auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Im Anschluss wurde die VEGF-Proteinkonzentration in den Überständen der Zellkulturen A549 und HNSCCUM-02T sowie den primären Nasenschleimhautzellen untersucht.

##### 4.1.4.1 Untersuchung der primären Nasenschleimhaut auf deren epithelialen Ursprung

Der epitheliale Ursprung der isolierten Primärzellen konnte in der immunhistologischen Analyse durch eine positive Cytokeratin13-Färbung (Abbildung 35, A) sowie eine negative FGFR4-Färbung (Abbildung 35, B) bestätigt werden.



**Abbildung 35: Nachweis des epithelialen Ursprungs der primären der Nasenschleimhautzellen**

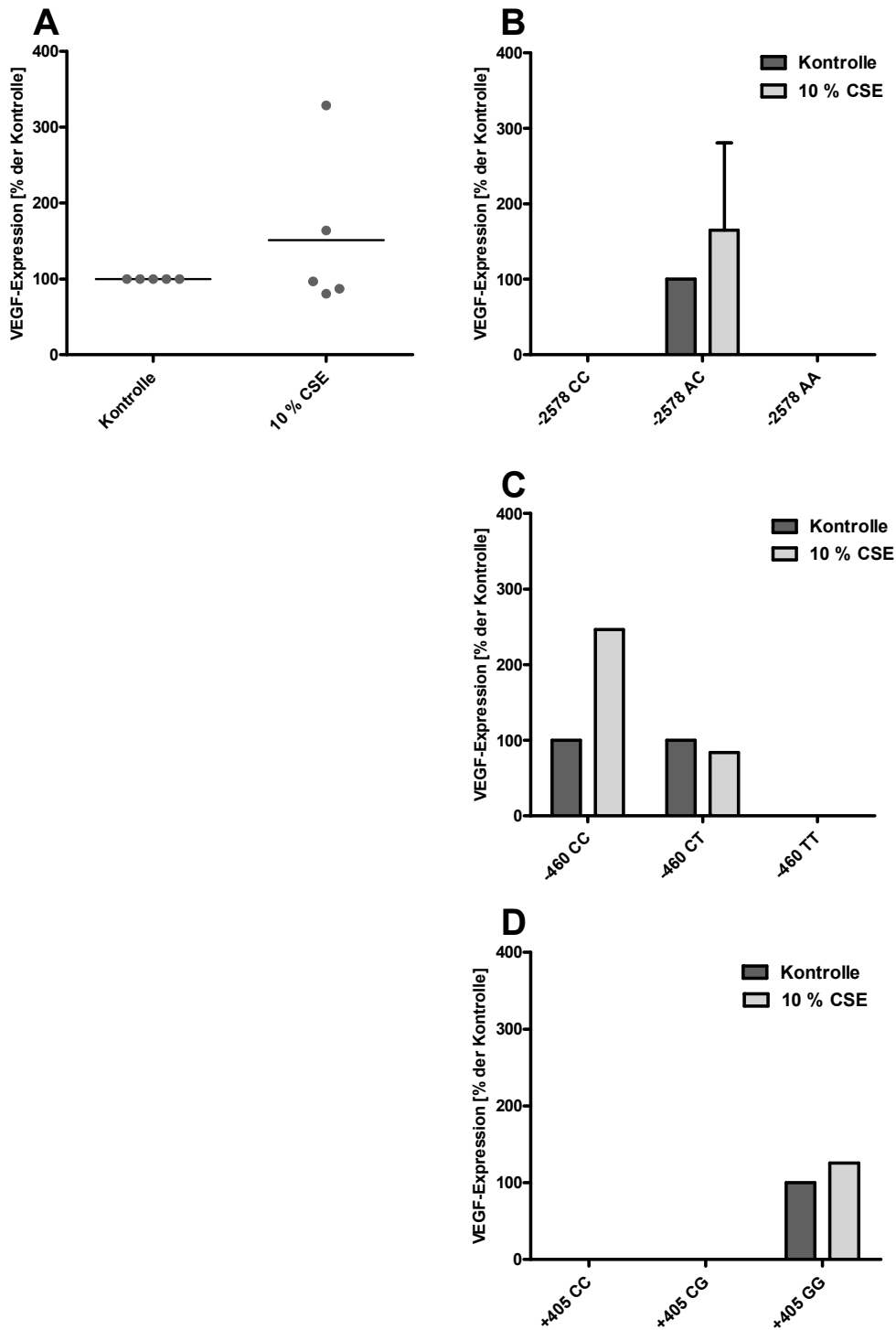
Die immunhistologische Analyse der isolierten primären Nasenschleimhautzellen zeigt eine positive braune Cytokeratin 13-Färbung (A). Die FGFR4-Färbung hingegen ist negativ (B). Die immunhistologische Analyse bestätigt den epithelialen Ursprung der isolierten Zellen (400-fache Vergrößerung).

Unter den 17 im Rahmen dieser Arbeit untersuchten primären Nasenschleimhautproben stammen 13 Proben aus gesunden Probanden, die im Rahmen einer Nasenseptum-OP an der Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz operiert

wurden. Bei drei verwendeten Proben handelte es sich um entzündliches Gewebe von Patienten mit einer chronischen Rhinosinusitis (CRS). Eine Probe wurde einem Patienten mit rezidivierende (rez.) Polyposis entnommen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten hinsichtlich der VEGF-Expression keine Unterschiede des entzündlichen Gewebes im Vergleich zum Gewebe gesunder Probanden gemacht werden, wodurch keine weitere Unterscheidung getroffen wurde.

#### *4.1.4.2 SNP-abhängige VEGF-Expression der primären Nasenschleimhautzellen*

In Abbildung 36 (A) ist die relative VEGF-Expression als Prozent der unbehandelten Kontrolle nach Inkubation mit 10 % CSE dargestellt. Im Mittel konnte nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE eine erhöhte VEGF-Expression von 152 % der unbehandelten Kontrolle beobachtet werden ( $p > 0,05$ ). Es konnte zudem gezeigt werden, dass nur zwei Patientenproben eine erhöhte VEGF-Expression nach Inkubation mit 10 % CSE aufweisen. Die anschließende genotypspezifische Analyse der Proben hinsichtlich der VEGF-Expression resultierte nach Inkubation mit CSE für den SNP -2578 AC in einer erhöhten VEGF-Expression auf 165 % der unbehandelten Kontrolle ( $p > 0,05$ ; Abbildung 36, B). Der SNP -460 CC zeigt ebenfalls eine erhöhte VEGF-Expression von 246 % nach Inkubation mit CSE (Abbildung 36, C). Im heterogenen Genotyp -460 CT konnte eine verringerte Expression von 84 % beobachtet werden. Hinsichtlich des SNPs +405 konnte nur der Genotyp GG identifiziert werden, wobei eine erhöhte Expression von 126 % gezeigt werden konnte (Abbildung 36, D).

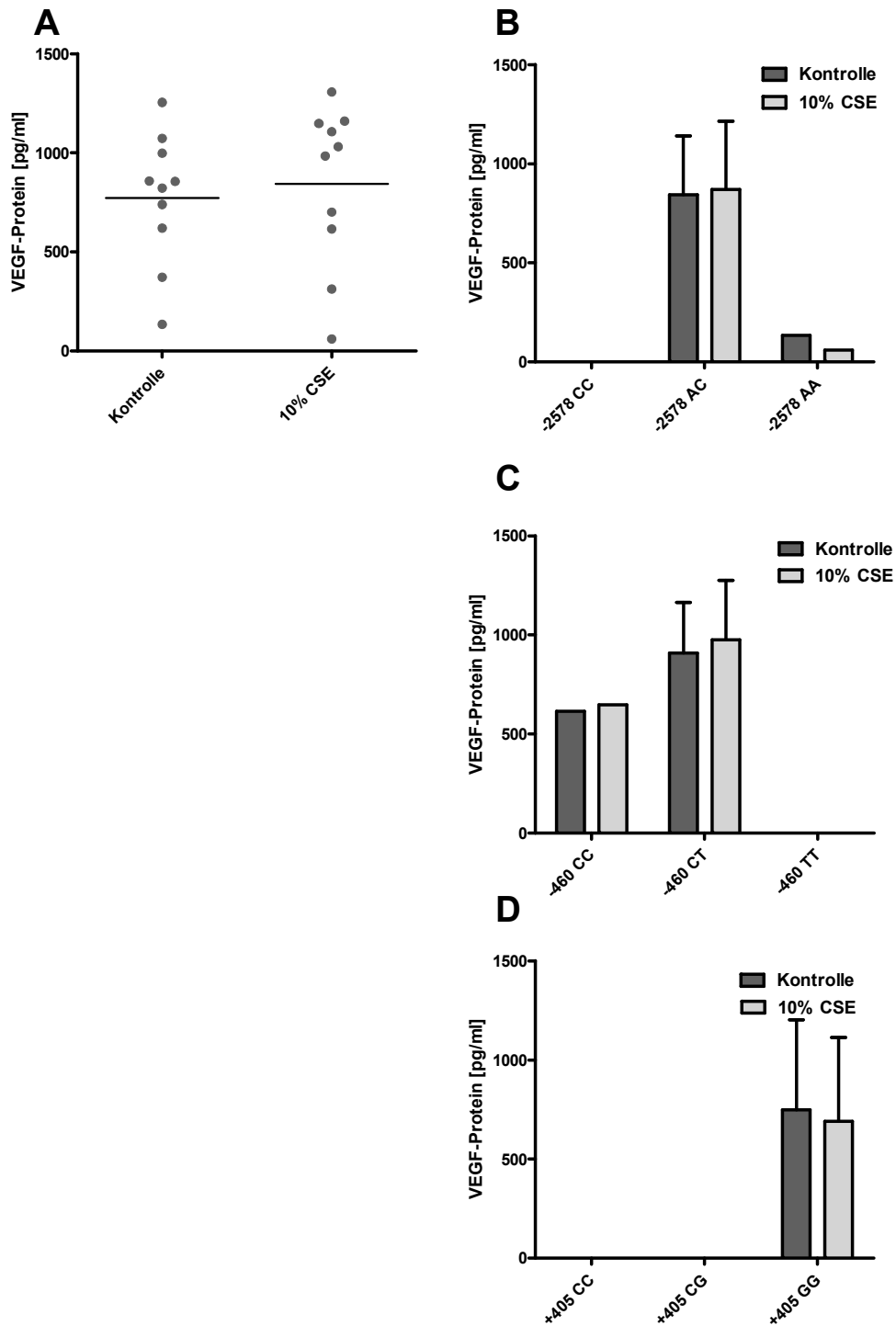


**Abbildung 36: Messung der VEGF-Expression der primären Nasenschleimhautzellen nach Inkubation mit CSE**

Zur Untersuchung der SNP- und CSE-abhängigen VEGF-Expression wurden die primären Nasenschleimhautzellen für 24 h mit 10 % CSE inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und zur VEGF-spezifischen qRT-PCR eingesetzt ( $p > 0,05$ ; A;  $n = 5$ ). Nach Genotypisierung der primären Nasenschleimhautzellen und Inkubation mit 10 % CSE konnte eine veränderte VEGF-Expression in Abhängigkeit des Genotyps der SNPs -2578 A/C ( $p > 0,05$ ; B), -460 C/T (C) und +405 C/G (D) gezeigt werden. (-2578 AC:  $n = 3$ ; -460 CC:  $n = 2$ ; -460 CT:  $n = 2$ ; +405 GG:  $n = 2$ ).

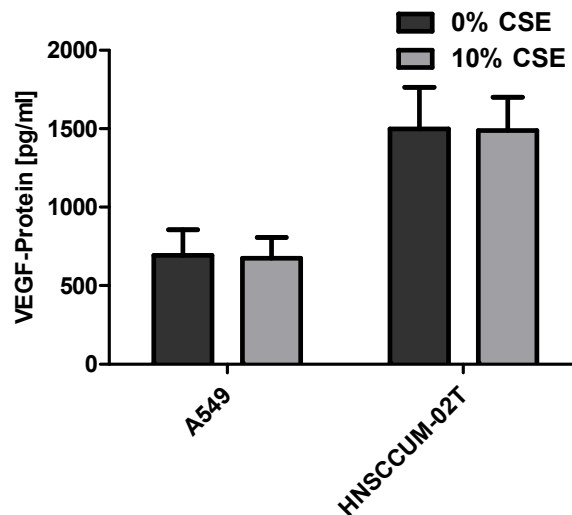
#### 4.1.4.3 SNP-abhängige VEGF-Translation der primären Nasenschleimhautzellen und Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T

Zur Untersuchung der SNP-abhängigen VEGF-Translation wurde ein VEGF-ELISA aus dem Zellüberstand durchgeführt. Hierzu wurden die Primärkulturen mit CSE inkubiert und die Überstände in den VEGF-ELISA eingesetzt. In Abbildung 37 ist die VEGF-Proteinkonzentration der primären Nasenschleimhautproben dargestellt. Es konnte keine signifikante Veränderung der VEGF-Proteinkonzentration im Zellüberstand nach Inkubation mit CSE beobachtet werden ( $p > 0,05$ ; Abbildung 37, A). Die genotypspezifische Analyse zeigte eine geringere Proteinkonzentration für den AA-Genotyp (133,9 pg/ml) im Vergleich zum Genotyp AC (843,9 pg/ml). Nach Inkubation mit 10 % CSE konnte keine Änderung der VEGF-Konzentration im Genotyp AC gezeigt werden ( $p > 0,05$ ; Abbildung 37, B). Für den AA Genotyp hingegen wurde eine Abnahme von 133,9 pg/ml der Kontrolle auf 59,0 pg/ml nach Inkubation mit CSE beobachtet. Der Vergleich der Genotypen des SNPs -460 zeigt eine geringere Proteinkonzentration des Genotyps CC. Nach Inkubation mit CSE konnte in den identifizierten Genotypen keine Änderung beobachtet werden ( $p > 0,05$ ) (Abbildung 37, C). Für den SNP +405 GG Genotyp wurde eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unveränderte Proteinkonzentration gezeigt ( $p > 0,05$ ; Abbildung 37, D). Analog der Bestimmung der Proteinkonzentration der primären Nasenschleimhautzellen wurden die Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T mit 10 % CSE inkubiert und die VEGF-Translation bestimmt. In den Überständen der HNSCCUM-02T Zellen wurde dabei eine VEGF-Konzentration von 1.500 pg/ml gezeigt (Abbildung 38). Die Proteinkonzentration der Zelllinie A549 hingegen lag bei 459 pg/ml. Die Inkubation mit 10 % CSE resultiert in beiden Zelllinien in keiner Änderung der VEGF-Proteinkonzentration.



**Abbildung 37: Messung der VEGF-Proteinkonzentration nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE**

Zur Untersuchung der VEGF-Proteinkonzentration nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit 10 % CSE wurde ein VEGF-ELISA aus dem Überstand durchgeführt. Hierzu wurden die Zellüberstände nach 24-stündiger Inkubation mit CSE in den VEGF-ELISA eingesetzt. Im Mittel konnte hierbei keine Änderung der VEGF-Proteinkonzentration beobachtet werden ( $p > 0,05$ ; A). Nach genotypspezifischer Analyse und Inkubation mit CSE konnte eine VEGF-Expression in Abhängigkeit des Genotyps der SNPs -2578 A/C (B), -460 C/T (C) und +405 C/G (D) gezeigt werden (-2578 AA:  $n=1$ ; -2578 AC:  $n=5$  ( $p > 0,05$ ); -460 CC:  $n=2$ ; -460 CT:  $n=5$  ( $p > 0,05$ ); +405 GG:  $n=3$  ( $p > 0,05$ )).



**Abbildung 38: Messung der VEGF-Proteinkonzentration nach Inkubation der Zelllinien mit CSE**

Zur Untersuchung der VEGF-Proteinkonzentration nach Inkubation der Zellen mit 10 % CSE wurde ein VEGF-ELISA aus dem Überstand durchgeführt. Hierzu wurden die Zellüberstände nach 24-stündiger Inkubation mit CSE in den VEGF-ELISA eingesetzt. Im Mittel konnte hierbei keine Änderung der VEGF-Proteinkonzentration beobachtet werden ( $n=3$ ;  $p>0,05$ ).

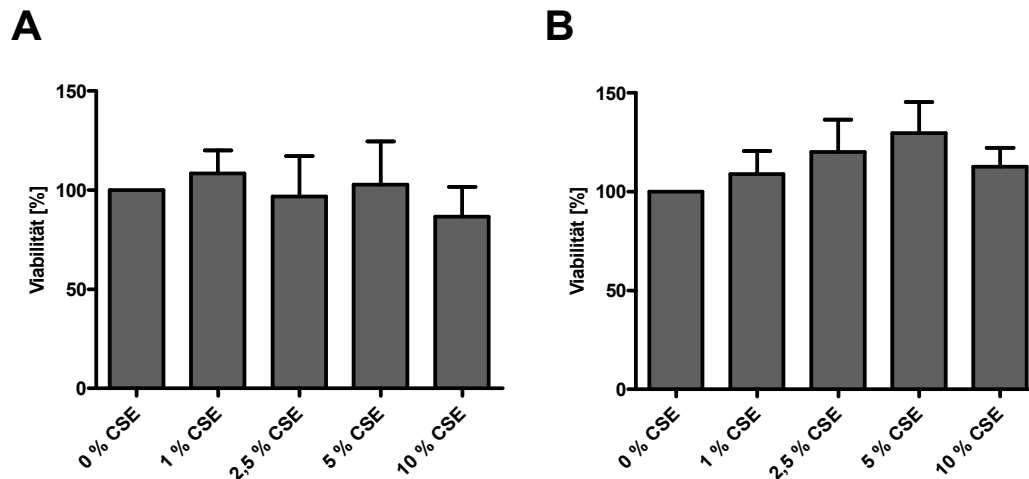
#### 4.1.5 Zytotoxizität von CSE

Zusätzlich zur Untersuchung des CSE in Abhängigkeit der VEGF-SNPs wurde der zytotoxische Einfluss des verwendeten CSE in den verwendeten Zellkulturmodellen A549 und HNSCCUM-02T analysiert. Zur Untersuchung der Viabilität, der Vitalität sowie der absoluten Zellzahl wurden ein AlamarBlue®-Assay, ein LIVE/DEAD®-Assay sowie eine Kristallviolett-färbung nach Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen CSE-Konzentrationen durchgeführt. Im Anschluss wurde das zytotoxische Potential des CSE nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen analysiert.

##### 4.1.5.1 Konzentrationsabhängige Viabilität

Zur Untersuchung der Viabilität wurden die Zellen für 24 h mit frisch hergestelltem CSE in Konzentrationen von 1 %, 2,5 %, 5 % und 10 % CSE inkubiert. Vor der Durchführung des AlamarBlue®-Assays wurden die Zellen der Totkontrolle mit 70 % EtOH abgetötet. Die Viabilität wurde mittels Kristallviolett-färbung auf die Lebendzellzahl quantifiziert. In Abbildung 39 ist die Viabilität in Prozent der unbehandelten Kontrolle für die Zelllinien A549 (A) und HNSCCUM-02T (B) dargestellt (Totkontrolle nicht dargestellt). In der Lungenkarzinomzelllinie A549 wurden keine CSE-abhängigen Effekte nach Inkubation mit CSE im Konzentrationsbereich von 1-5 % CSE auf die Viabilität der Zellen beobachtet. Nach Inkubation mit 10 % CSE wurde eine geringe nicht signifikante Abnahme auf 87 % ( $p>0,05$ ) der unbehandelten Kontrolle gezeigt. In der OSCC-Zelllinie

HNSSCUM-02T hingegen steigt die Viabilität der Zellen bis zu einer Konzentration von 5 % CSE konzentrationsabhängig auf 130 % der unbehandelten Kontrolle. In der höchsten untersuchten Konzentration von 10 % CSE nimmt die Viabilität (auch: metabolische Aktivität) ab, liegt jedoch weiter über der metabolischen Aktivität der unbehandelten Kontrolle (113 %;  $p>0,05$ ).

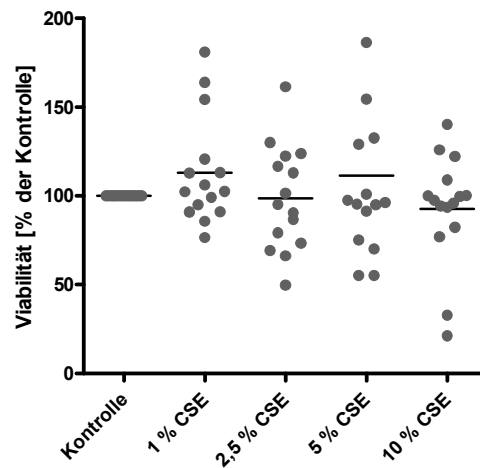


**Abbildung 39: Messung der metabolischen Aktivität nach Inkubation der Zelllinien mit CSE**

Die verwendeten Zelllinien wurden für 24 h mit CSE (1-10 %) inkubiert. Die metabolische Aktivität der Ansätze wurde mittels AlamarBlue®-Assays bestimmt und über die Lebendzellzahl quantifiziert. Die Zelllinie A549 (A) zeigt hierbei keine Änderung der metabolischen Aktivität nach Inkubation mit CSE (1-5 %). Nach Inkubation der A549 mit 10 % CSE nimmt die metabolische Aktivität auf 87 % der Kontrolle ab ( $p>0,05$ ). Die HNSSCUM-02T Zellen (B) hingegen zeigen bis zu einer Konzentration von 5 % CSE eine konzentrationsabhängige Zunahme der metabolischen Aktivität. Nach Inkubation von 10 % CSE nimmt die Viabilität auf 113 % der unbehandelten Kontrolle ab ( $p>0,05$ ) (A549:  $n=8$ ; HNSSCUM-02T:  $n=6$ ).

Analog der zytotoxischen Untersuchung der Zellkulturmodelle wurden die primären Nasenschleimhautzellen für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen CSE (1-10 %) inkubiert und zur Bestimmung des Effekts auf die Zellviabilität ein AlamarBlue®-Assay durchgeführt. Die Untersuchung der metabolischen Aktivität der primären Nasenschleimhautzellen zeigt keinen Effekt auf die Viabilität der Zellen nach Inkubation mit CSE. Die metabolische Aktivität nach Inkubation mit 1-10 % CSE liegt zwischen 113 % und 93 % der unbehandelten Kontrolle ( $p>0,05$ ; Abbildung 40, A).



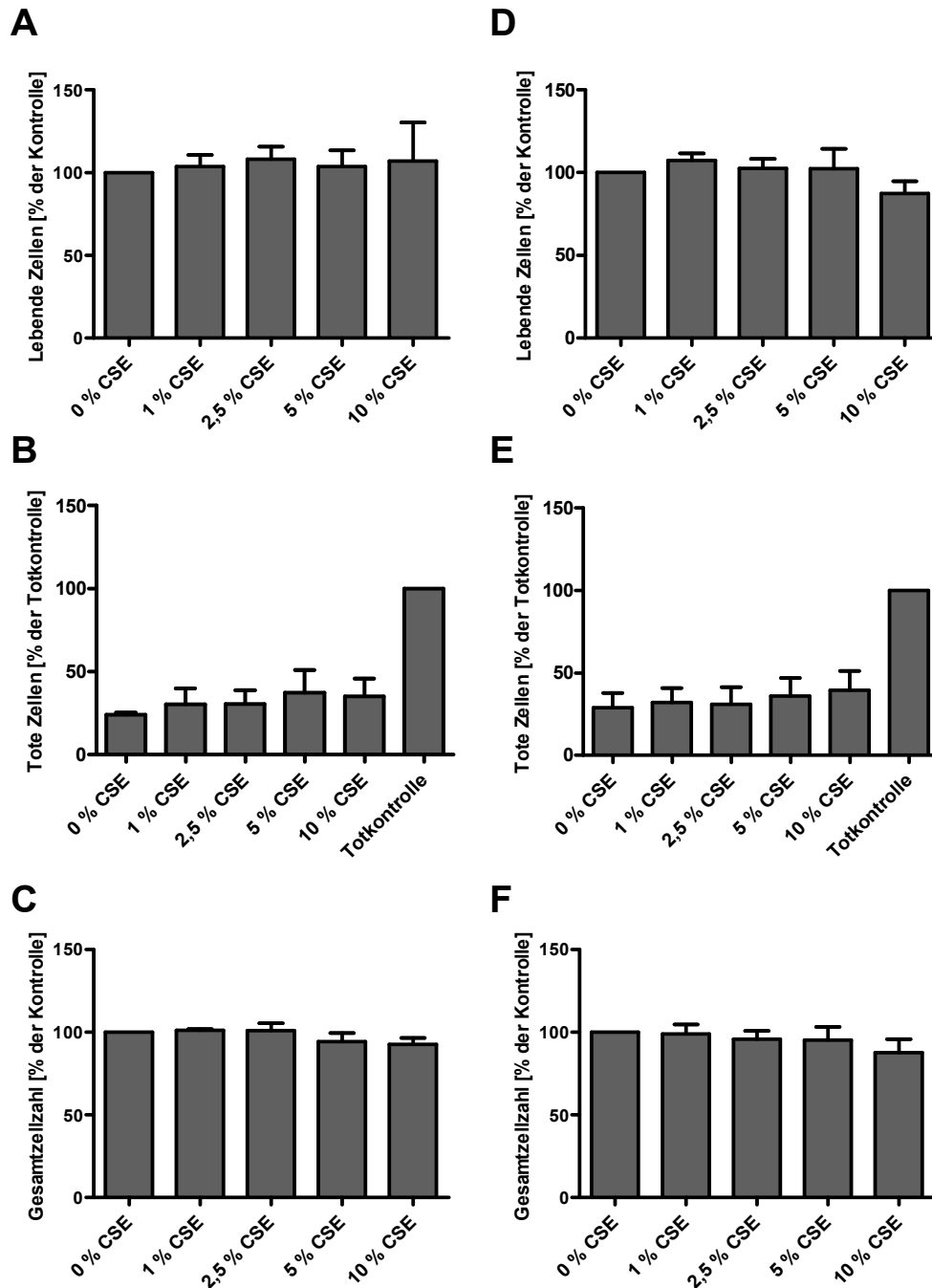


**Abbildung 40: Messung der metabolischen Aktivität nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE**

Die isolierten primären Nasenschleimhautzellen wurden für 24 h mit CSE (1-10 %) inkubiert. Die metabolische Aktivität der Ansätze wurde mittels des AlamarBlue®-Assays bestimmt und über die Lebendzellzahl quantifiziert. Im Mittel konnte dabei keine Änderung der metabolischen Aktivität bestimmt werden ( $p > 0,05$ ; A;  $n = 15$ ).

#### 4.1.5.2 CSE-abhängige Vitalität und Gesamtzellzahl

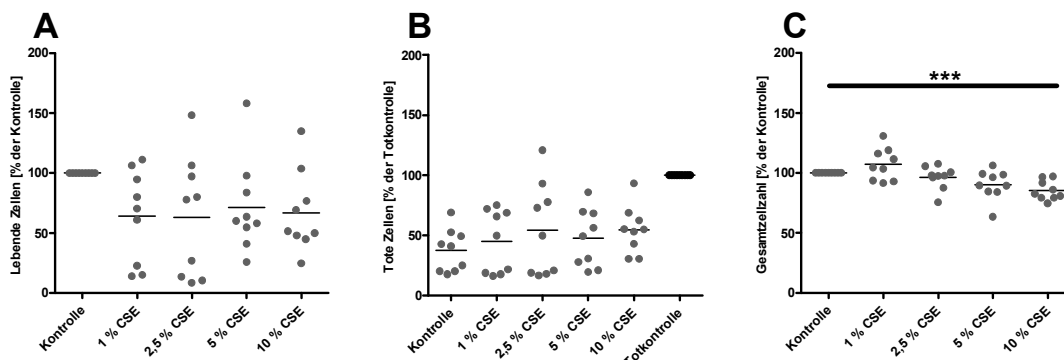
Analog der Untersuchung der CSE-abhängigen Viabilität wurde die Zellzahl der lebenden sowie der toten Zellen mittels LIVE/DEAD®-Assay untersucht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit den Farbstoffen Calcein AM, zur Bestimmung der Lebendzellzahl, und EthD-1, zur Färbung der toten Zellen inkubiert und deren Fluoreszenz bestimmt. Im Anschluss wurden die Zellen zur Quantifizierung auf die Gesamtzellzahl bezogen, wobei die Zellen mit 70 % EtOH (10 min) abgetötet und erneut mit EthD-1 inkubiert wurden. In Abbildung 41 werden die quantifizierten Werte der Lebendzellzahl sowie der Gesamtzellzahl in Prozent der unbehandelten Kontrolle, in der Abbildung der Anzahl der toten Zellen in Prozent der Totkontrolle, dargestellt. In der Zelllinie A549 wurde keine Änderung der Lebendzellzahl in allen untersuchten CSE-Konzentrationen beobachtet ( $p > 0,05$ ; Abbildung 41, A). Die Zellzahl nach Bestimmung der toten Zellen zeigte eine leichte Zunahme nach Inkubation mit CSE ( $p > 0,05$ ; Abbildung 41, B). Nach Inkubation von 1 % CSE lag der Anteil der toten Zellen bei 34 % der Totkontrolle und stieg nach Inkubation mit 5 % bzw. 10 % CSE auf 37 % bzw. 35 % der Totkontrolle an. Die Inkubation der HNSCCUM-02T mit CSE in einem Konzentrationsbereich von 1-5 % resultiert in einer leicht erhöhten Anzahl lebender Zellen bis auf 107 % der unbehandelten Kontrolle. Eine Abnahme der Lebendzellzahl auf 87 % zeigte sich nach einer Inkubation mit 10 % CSE ( $p > 0,05$ ; Abbildung 41, D). Einhergehend mit dieser Beobachtung steigt die Zellzahl der toten Zellen konzentrationsabhängig im Vergleich zur Kontrolle um 11 % ( $p > 0,05$ ; Abbildung 41, E).



#### Abbildung 41: Messung der Vitalität nach Inkubation der Zelllinien mit CSE

Zur Bestimmung des Anteils lebender bzw. toter Zellen nach einer Inkubation mit CSE wurden die Zellen für 24 h mit CSE inkubiert. Im Anschluss wurde ein LIVE/DEAD®-Assay durchgeführt. Dieser Assay ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung lebender bzw. toter Zellen durch die Fluoreszenzfarbstoffe Calcein AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen). Während die Anzahl der lebenden Zellen in der Zelllinie A549 (A) unverändert bleibt ( $p > 0,05$ ), sinkt die Zellzahl in der Zelllinie HNSCCUM-02T nach Behandlung mit der höchsten untersuchten Konzentration von 10 % CSE ( $p > 0,05$ ; B). Nach Färbung der Zellen mit EthD-1 konnte in A549 ( $p > 0,05$ ; C) und HNSCCUM-02T ( $p > 0,05$ ; D) ein leichter Anstieg gezeigt werden. Die Analyse der Gesamtzellzahl weist in A549 ( $p > 0,05$ ; E) sowie HNSCCUM-02T ( $p > 0,05$ ; F) eine leichte konzentrationsabhängige Abnahme nach Inkubation mit CSE auf ( $n=3$ ).

Die abschließende Untersuchung der Gesamtzellzahl nach Abtöten der Zellen mit 70 % EtOH weist nach Inkubation mit CSE in beiden untersuchten Zelllinien eine konzentrationsabhängige Abnahme der Gesamtzellzahl auf. In der Zelllinie A549 sinkt die Gesamtzellzahl konzentrationsabhängig von 100 % der unbehandelten Kontrolle auf 93 % in der höchsten untersuchten Konzentration von 10 % CSE ( $p > 0,05$ ; Abbildung 41, C). In der Zelllinie HNSCCUM-02T wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme auf 88 % ( $p > 0,05$ ; Abbildung 41, F) beobachtet. Analog der Untersuchung der Zelllinien wurde nach Isolation der primären Nasenschleimhautzellen ein LIVE/DEAD®-Assay durchgeführt (Abbildung 42). Die Lebendzellzahl liegt nach Inkubation mit CSE (1-10 %) zwischen 63-71 % der unbehandelten Kontrolle ( $p > 0,05$ ; Abbildung 42, A). Der Anteil toter Zellen steigt von 37 % der unbehandelten Kontrolle auf 45-55 % der Totkontrolle, unabhängig von der CSE-Konzentration ( $p > 0,05$ ; Abbildung 42, B). Bei der Untersuchung der Gesamtzellzahl (Abbildung 42, C) konnte im Mittel eine signifikante Abnahme der Zellzahl mit steigender CSE-Konzentration auf bis zu 85 % nach Inkubation mit 10 % CSE gezeigt werden ( $p = 0,004$ ).

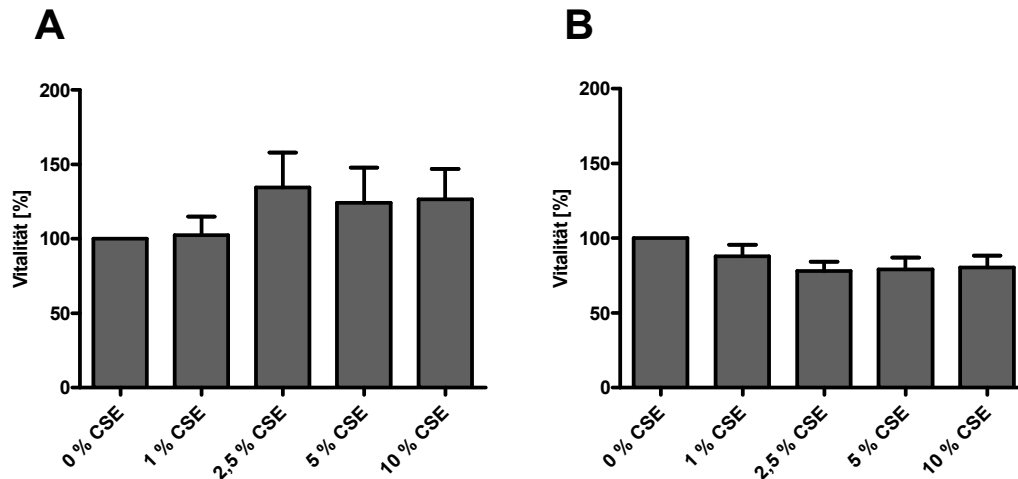


**Abbildung 42: Messung der Vitalität nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE**

Zur Bestimmung des Anteils lebender bzw. toter Zellen nach Inkubation mit CSE wurden die primären Nasenschleimhautzellen nach deren Aussaat inkubiert. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde ein LIVE/DEAD®-Assay durchgeführt. Der Anteil der lebenden Zellen nimmt nach Inkubation aller CSE-Konzentrationen ab ( $p > 0,05$ ; A;  $n = 9$ ). Der Anteil der toten Zellen nimmt mit steigender CSE-Konzentration zu ( $p > 0,05$ ; B;  $n = 9$ ). Bei der Untersuchung der Gesamtzellzahl konnte eine signifikante, konzentrationsabhängige Abnahme beobachtet werden ( $p = 0,004$ ; C;  $n = 9$ ; \*\*\*= $P < 0,001$ ).

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Kristallviolett-Färbung nach Inkubation unterschiedlicher CSE-Konzentrationen durchgeführt. Die photometrische Auswertung der Färbung zeigte nach Inkubation der Zelllinie A549 in allen untersuchten Konzentrationen einen Anstieg der Lebendzellzahl (Abbildung 43, A). Nach Inkubation der Zelllinie A549 mit 1 % CSE konnte ein Anstieg auf 102 % der Kontrolle beobachtet

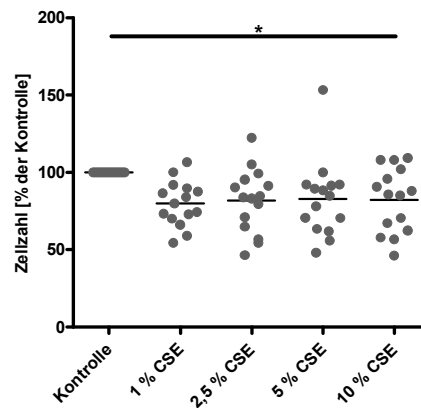
werden. Die Inkubation mit Konzentrationen zwischen 2,5-10 % CSE weist einen weiteren Anstieg der Lebendzellzahl bis zu 134 % der Kontrolle auf ( $p>0,05$ ). In der Zelllinie HNSCCUM-02T sinkt die Lebendzellzahl nach Inkubation mit 1 % CSE auf 88 % der Kontrolle, während die Gesamtzellzahl nach Inkubation höherer Konzentrationen geringfügig weiter auf 78 % der Kontrolle abnimmt ( $p>0,05$ ; Abbildung 43, B).



**Abbildung 43: Messung der Lebendzellzahl nach Inkubation der Zelllinien mit CSE**

Zur Bestimmung des Effekts der Inkubation mit CSE auf die Lebendzellzahl wurde eine Kristallviolett-färbung durchgeführt. Hierzu wurden die verwendeten Zelllinien A549 (A) und HNSCCUM-02T (B) 24 h nach deren Aussaat mit CSE inkubiert (24 h). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und eine Kristallviolett-färbung durchgeführt. Nach Inkubation der Zelllinie A549 mit 2,5-10 % CSE konnte eine erhöhte Lebendzellzahl auf bis zu 134% der Kontrolle beobachtet werden ( $p>0,05$ ; A). In der Zelllinie HNSCCUM-02T hingegen kommt es in allen untersuchten CSE-Konzentrationen zur Abnahme auf bis zu 78 % der Kontrolle ( $p>0,05$ ; B) (A549: n=8; HNSCCUM-02T: n=6).

Analog der Bestimmung der Lebendzellzahl der Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T wurde die Lebendzellzahl der primären Nasenschleimhautzellen nach Inkubation mit CSE mittels einer Kristallviolett-färbung bestimmt. Hierbei konnte eine signifikante Abnahme der Lebendzellzahl bezüglich der Kontrolle auf 80-83 % in allen untersuchten Konzentrationen beobachtet werden ( $p=0,02$ ; Abbildung 44).



**Abbildung 44: Messung der Lebendzellzahl nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE**

Analog der Bestimmung der Gesamtzellzahl der primären Nasenschleimhautzellen mittels Kristallviolett färbung wurden die isolierten primären Nasenschleimhautzellen ausgesät und für 24 h mit CSE unterschiedlicher Konzentrationen (1-10%) inkubiert. Die Lebendzellzahl wird im Anschluss mittels Kristallviolett färbung analysiert. Im Mittel kann eine Abnahme der Zellzahl nach Inkubation mit CSE (1-10%) beobachtet werden ( $p=0,02$ ;  $A; n=15$ ;  $*=p<0,05$ ).

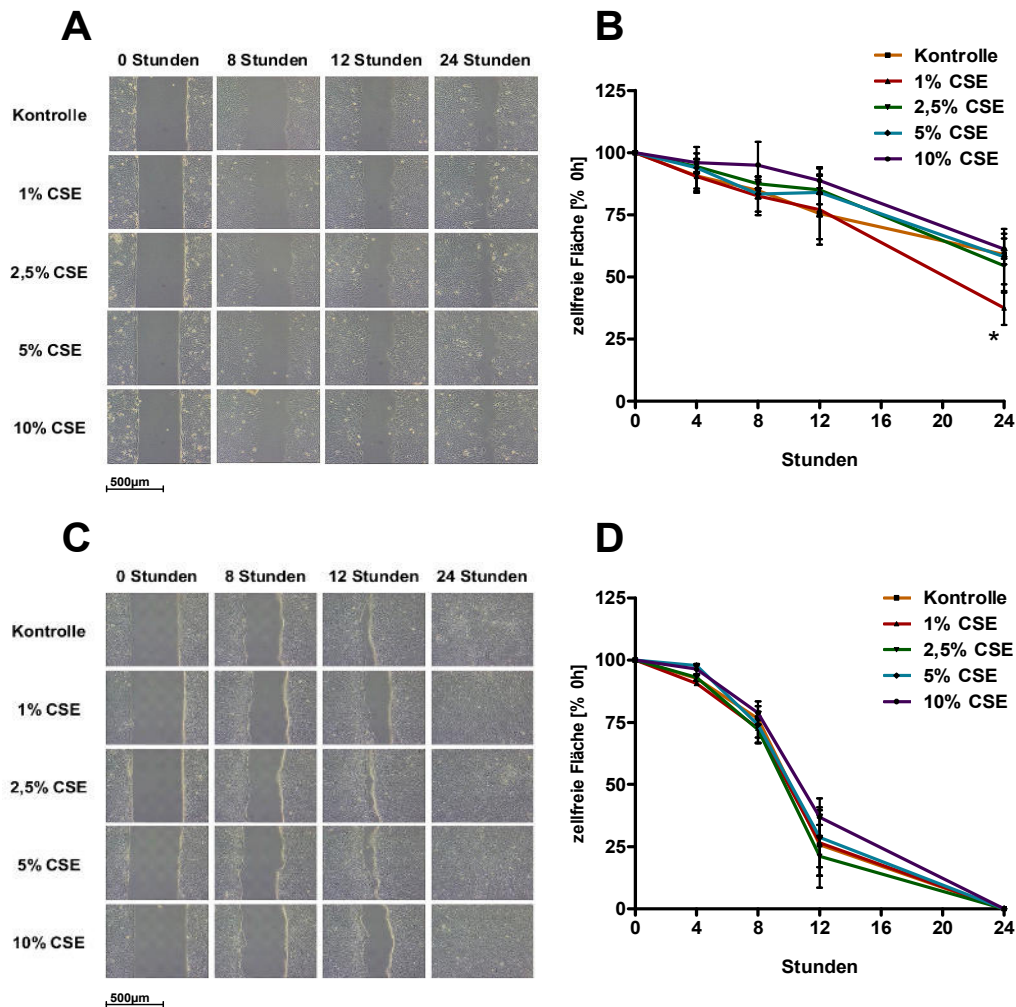
#### 4.1.5.3 CSE-abhängige Migration/Invasion

Die Migration sowie die Invasion von Tumorzellen stellen wichtige Voraussetzungen einer Metastasierung von Tumoren dar, wobei der VEGF eine Schlüsselrolle spielt. Der potenzielle Einfluss des CSE auf die Metastasierung sollte *in vitro* untersucht werden. Die CSE-abhängige Migration wurde nach Inkubation mit unterschiedlichen CSE-Konzentrationen mittels des Scratch-Assays untersucht. Um etwaige Effekte des CSE auf die Invasion zu untersuchen wurde ein Invasionsassay durchgeführt.

##### 4.1.5.3.1 CSE-abhängige Untersuchung der Migration

Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher CSE Konzentrationen auf die Migration der Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T wurde ein Scratch-Assay durchgeführt, wobei die Zellen zunächst für 24 h mit 0 %, 1 %, 2,5 %, 5 % und 10 % CSE inkubiert wurden. Im Anschluss wurde das *Insert* entfernt und die Migration der Zellen in den zuvor zellfreien Spalt über einen Zeitraum von 24 h nach den Zeitpunkten 0, 4, 8, 12 und 24 h dokumentiert und computergestützt ausgewertet. In Abbildung 45 (A) sind exemplarisch mikroskopische Aufnahmen der A549 nach Inkubation der mit 0 %, 1 %, 5 % und 10 % CSE nach den Zeitpunkten 0, 8, 12 und 24 h dargestellt. Die Aufnahmen zeigen eine gesteigerte Migration nach 24-stündiger Inkubation mit 1 % und 2,5 % CSE. Diese Beobachtung konnte nach computergestützter Auswertung der zellfreien Fläche im Verhältnis zur ursprünglich zellfreien Fläche zum Zeitpunkt 0 h bestätigt werden (Abbildung 45, B). Des Weiteren konnte eine gesteigerte Migration nach Inkubation mit

5 % CSE gezeigt werden. In Folge einer Inkubation mit 1 % CSE sind 12 h nach Beginn des Beobachtungszeitraums 77 % der ursprünglich zellfreien Fläche nicht bewachsen. Die unbehandelte Kontrolle weist nach 12 h eine zellfreie Fläche von 87 % auf. Die zellfreie Fläche der mit den Konzentrationen 2,5 %, 5 % und 10 % behandelten A549 hingegen zeigen keine Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Eine konzentrationsabhängige Migration der Zellen konnte 24 h nach Beginn des Beobachtungszeitraums gezeigt werden ( $p=0,03$ ). Während bei der mit 1 % CSE behandelten Kontrolle 38 % der ursprünglich unbewachsenen Fläche weiterhin zellfrei sind, nimmt die unbewachsene Fläche mit steigender Konzentration zu (2,5 % CSE: 53 %; 5 % CSE: 58 %; 10 % CSE: 61 %). In der unbehandelten Kontrolle sind 68 % der ursprünglich unbewachsenen Fläche weiterhin zellfrei. Mikroskopische Aufnahmen nach 0, 8, 12 und 24 h der Zelllinie HNSCCUM-02T nach Inkubation mit CSE sind in Abbildung 45 (C) dargestellt. In der Zelllinie HNSCCUM-02T konnte eine gesteigerte Migration nach Inkubation mit 2,5 % sowie 5 % CSE beobachtet werden. Die höchste untersuchte Konzentration von 10 % CSE hingegen weist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine gehemmte Migration in den zellfreien Spalt auf. In Abbildung 45 (D) ist analog der Auswertung der A549 die computergestützte Auswertung der HNSCCUM-02T bezogen auf die unbewachsene Fläche zu Beginn des Beobachtungszeitraums dargestellt. Die Zelllinie HNSCCUM-02T zeigt über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg keine veränderte Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach Inkubation mit 1-5 % CSE. 12 h nach Entfernung des *Inserts* liegt der Anteil der ursprünglich zellfreien Fläche zwischen 21 % und 37 %. Nach Inkubation mit 10 % CSE konnte nach 12 h eine geringere Migrationsgeschwindigkeit beobachtet werden (40 %). Nach weiteren 12 h (d.h. 24 h) nach Entfernen des *Inserts* war der zuvor zellfreie Spalt in allen Ansätzen mit Zellen bewachsen.

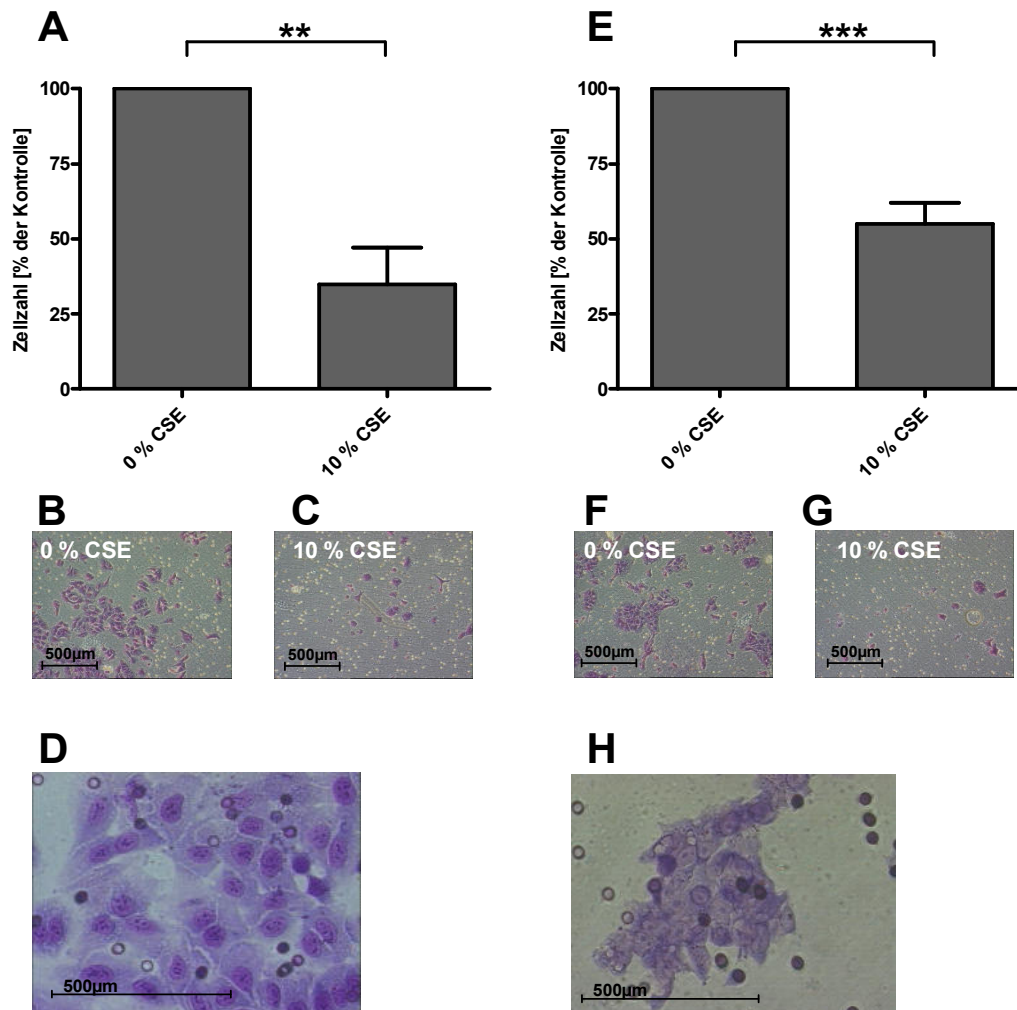


**Abbildung 45: Messung der Migration nach Inkubation der Zelllinien mit CSE**  
 Die Migration der verwendeten Zellkulturmodelle A549 (A; B) und HNSCCUM-02T (C; D) wurde mittels des Scratch-Assays bestimmt. Hierbei wurde das Wachstum in einen zellfreien Spalt zeitabhängig (0-24 h) untersucht. Die Lungenkarzinomzelllinie A549 zeigte ein konzentrationsabhängiges Migrationsverhalten, wobei in den Konzentrationen von 1-5 % CSE eine erhöhte Migration gezeigt werden konnte. Die Untersuchung der Zelllinie HNSCCUM-02T resultierte nach Inkubation mit 1-5 % CSE in keinem konzentrationsabhängigen Effekt, wobei der ursprünglich zellfreie Spalt bereits nach 24 h vollständig bewachsen ist. Nach Inkubation mit 10 % CSE konnte eine geringere Migration beobachtet werden (n=3; Vergrößerung: 100-fach; \*= $p < 0,05$ ).

#### 4.1.5.3.2 CSE-abhängige Invasion

Im Folgenden soll mittels des Invasionsassays eine CSE-abhängige Invasion der Zellen nach Inkubation mit 10 % CSE untersucht werden. Nach Beschichtung der *Transwells* mit Matrigel wurden die Zellen ausgesät und anschließend mit 10 % CSE inkubiert. Zur Bestimmung der invasiven Zellzahl wurde nach Pappenheim-Färbung der Zellen das Matrigel und die darin verbleibenden Zellen entfernt. Zur Dokumentation der Zellinvasion wurden mindestens 12 mikroskopische Aufnahmen der Membranen abphotographiert

(Abbildung 46, B/F (Kontrolle) und C/G (10 % CSE); Vergrößerung: 50-fach). Die migrierten Zellen wurden ausgezählt und in Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt. In der Zelllinie A549 sinkt die Invasion der Zellen nach Inkubation mit 10 % CSE statistisch signifikant auf 35 % der Kontrolle ( $p=0,002$ ; Abbildung 46, A). In der Zelllinie HNSCCUM-02T konnte ebenfalls eine signifikant verminderte Invasion der Zellen durch das Matrigel auf 49 % ( $p=0,001$ ) der Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 46, E).



#### Abbildung 46: Messung der Invasion nach Inkubation der Zelllinien mit CSE

Die Invasion der Zellen nach Inkubation mit 10 % CSE wurde mittels des Invasionsassays untersucht. Hierzu wurden die Zellen 24 h nach der Aussaat mit 10 % CSE inkubiert und die Invasion der Zellen nach weiteren 24 h mittels Pappenheim-Färbung visualisiert. Nach Inkubation der Zelllinien A549 ( $p=0,002$ ; A) und HNSCCUM-02T ( $p=0,001$ ; E) konnte eine signifikant reduzierte Invasion der Zellen im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle beobachtet werden. Eine lichtmikroskopische Aufnahme (100-fache Vergrößerung) der A549 ist für die unbehandelte Kontrolle (B) und den inkubierten Ansatz (C) dargestellt. Exemplarische Aufnahmen der Invasion der HNSCCUM-02T sind in (F) für die unbehandelte Kontrolle und (G) nach Inkubation mit 10 % CSE gezeigt. Die Aufnahme der A549 (D) und HNSCCUM-02T (H) in 100-facher Vergrößerung zeigt die nach der Pappenheimfärbung charakteristischen violetten Zellkerne und das helle Zytoplasma ( $n=3$ ; \*\*\*= $P<0,001$ ; \*\*= $P<0,01$ ).



In Abbildung 46 (F) und (G) sind die Membranen mit den auf die Membranunterseite infiltrierten Zellen der Kontrolle (F) sowie des inkubierten Ansatzes (G) exemplarisch in 100-facher Vergrößerung dargestellt. In Abbildung 46 D (A549) und H (HNSCCUM-02T) können die in 100-facher Vergrößerung dargestellten dunkel gefärbten Zellkerne der infiltrierten Zellen vom Zytoplasma unterschieden werden.

#### 4.1.6 Regulation der VEGF-Promotoraktivität auf transkriptioneller Ebene

Nach der Untersuchung der SNP- und CSE-abhängigen VEGF-Promotoraktivität wurden deren Regulationsmechanismen auf transkriptioneller Ebene untersucht. Hierzu wurde neben der Untersuchung des Einflusses des CSE auf die Expression von Transkriptionsfaktoren (TF), der TF *myeloid zinc finger 1* (MZF1), dessen potenzielle Bindungsstelle am VEGF-Promotor-SNP +405 lokalisiert ist, näher betrachtet.

##### 4.1.6.1 Einfluss von CSE auf die Transkriptionsfaktor-Expression

Zur Untersuchung des Einflusses von CSE auf die Expression der potenziell für die CSE-abhängige VEGF-Regulation verantwortlichen TFs wurde zunächst ein TF-Array durchgeführt. Hierzu wurde die Zelllinie A549 mit 10 % CSE inkubiert, die Kernextrakte isoliert und die TF-Expression analysiert. In Tabelle 30 sind die TF-Expressionen der Kontrolle und nach Inkubation mit 10 % CSE im Überblick dargestellt. In Anhang VI befindet sich die Abbildung der TF-Expression nach Inkubation mit 10 % CSE. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist die Expression der Mehrzahl der untersuchten TF im Vergleich zum inkubierten Ansatz erhöht (Tabelle 30). Die höchste TF-Expression der unbehandelten A549 konnte für die TF Gli-1 (4.456 RLU), MEF1 (1.190 RLU), PLAG1 (6.205 RLU), PPAR (1.183 RLU), RXR (8.510 RLU) und Snail (1.095 RLU) beobachtet werden. Nach Inkubation der Zelllinie A549 konnte eine Abnahme der TF-Expression der genannten TFs auf unter 4,0 RLU gezeigt werden. Eine mittlere Expression zeigten die TF COUP-TF (542 RLU), E2F-1 (853 RLU), SF-1 (280 RLU), SMUC (660 RU) und VDR (994 RLU). Nach Inkubation mit 10 % CSE nimmt die Expression von E2F-1 auf 2,1 RLU ab, wobei die TF-Expression der TF COUP-TF, SF-1, SMUC und VDR unter der Nachweisgrenze liegen. Eine TF-Expression zwischen 25 und 100 RLU konnte für die TFs *hepatocyte nuclear factor* (HNF-1; 52 RLU), HOX4C (30 RLU), MZF (31 RLU), PXR (60 RLU), SATB1 (37 RLU), SOX-18 (42 RLU), TFIID (26 RLU) und TR (54 RLU) gezeigt werden. Nach Inkubation mit 10 % CSE liegt die Expression der genannten TFs unter der Nachweisgrenze. Für die TFs Ets und CBF ist die TF-Expression im Gegensatz zu den bisher betrachteten TFs nach Inkubation mit 10 % CSE leicht erhöht bzw. für die TF AP1/2, C/EBP und CAR auf dem Niveau der unbehandelten Kontrolle. Unter den durch CSE beeinflussten SNPs konnte der MZF1

identifiziert werden, dessen potenzielle Bindungsstelle im Bereich des SNPs +405 lokalisiert ist.

**Tabelle 30: Messung der TF-Expression nach Inkubation mit CSE**

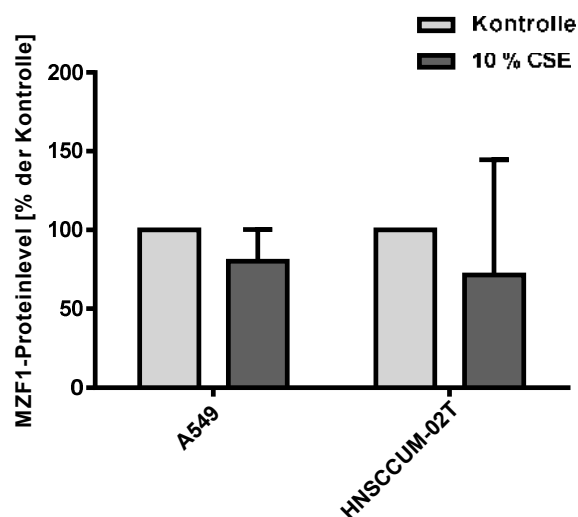
TF	Kontrolle	10% CSE	Änderung	TF	Kontrolle	10% CSE	Änderung
AP1	7,1	6,0	-15 %	NRF2(ARE)	6,8	1,1	-84 %
AP2	2,9	2,1	-28 %	NFAT	4,5	NN	-100 %
AP3	3,7	NN	-100 %	NF-E2	3,3	NN	-100 %
AP4	2,0	NN	-100 %	NFkB	2,4	NN	-100 %
AR	8,0	1,4	-83 %	Nkx2-5	11,7	NN	-100 %
ATF2	3,7	1,4	-62 %	Nkx3-2	19,6	NN	-100 %
Brn-3	2,2	1,2	-46 %	Oct-1	3,7	NN	-100 %
C/EBP	1,5	1,6	+7 %	OCT4	5,0	NN	-100 %
CAR	2,4	2,5	+4 %	Pax2	3,5	NN	-100 %
CBF	1,6	4,3	+169 %	Pax3	5,8	NN	-100 %
CDP	5,4	NN	-100 %	Pax5	7,7	NN	-100 %
COUP-TF	542,0	NN	-100 %	Pax8	6,4	NN	-100 %
CREB	2,4	NN	-100 %	Pbx1	4,5	NN	-100 %
E2F-1	853,0	2,1	-100 %	Pit	3,8	NN	-100 %
EGR	1,6	NN	-100 %	PIT1	18,3	NN	-100 %
ELK	5,6	NN	-100 %	PLAG1	6.205	1,1	-100 %
ER	24,7	NN	-100 %	PPAR	1.182	1,4	-100 %
Ets	1,2	2,1	+75 %	Prox1	11,5	NN	-100 %
FAST-1	2,7	NN	-100 %	PXR	60,2	NN	-100 %
FOXA1	4,5	NN	-100 %	Rb	1,1	NN	-100 %
FOXC1	3,1	NN	-100 %	RNUX	16,2	NN	-100 %
FOXD3	1,7	NN	-100 %	ROR (RZR)	18,5	NN	-100 %
FOXG1	2,0	NN	-100 %	RXR	8.510	3,8	-100 %
FOXO1	1,1	NN	-100 %	SATB1	37,0	NN	-100 %
FREAC-2	3,5	NN	-100 %	SF-1	279,5	NN	-100 %
GAS/ISRE	5,3	2,0	-62 %	SMAD	2,2	NN	-100 %
GATA	2,95	NN	-100 %	SMUC	659,5	NN	-100 %
Gfi-1	6,1	NN	-100 %	Snail	1.095,0	NN	-100 %
Gli-1	4.456,0	3,2	-100,0	SOX18	41,6	NN	-100 %
GR/PR	2,4	NN	-100 %	SOX2	21,4	7,1	-67 %
HEN(NSCL-1)	4,9	NN	-100 %	SOX9	10,2	2,0	-80 %
HIF	3,7	NN	-100 %	Sp1	3,6	NN	-100 %
HNF-1	51,5	NN	-100 %	SRY	5,7	NN	-100 %
HNF4	14,4	NN	-100 %	Stat1	5,1	NN	-100 %
HOX4C	29,5	NN	-100 %	Stat3	8,2	NN	-100 %
HoxA-5	1,3	NN	-100 %	Stat4	3,0	NN	-100 %
HSF	2,7	NN	-100 %	Stat5	3,4	NN	-100 %
IRF	3,3	NN	-100 %	Stat6	4,1	NN	-100 %
KLF4	5,3	NN	-100 %	TCF/LEF	9,3	NN	-100 %
MEF1	1.190	1,0	-100 %	TFE3	23,4	NN	-100 %
MEF2	2,1	NN	-100 %	TFIID	26,0	NN	-100 %
Myb	5,6	NN	-100 %	TR	53,8	NN	-100 %
Myc-Max	5,5	1,2	-78 %	USF-1	2,7	NN	-100 %
MyoD	1,8	NN	-100 %	VDR	993,5	NN	-100 %
MZF	30,7	NN	-100 %	XBP-1	4,3	NN	-100 %
NF-1	6,8	1,6	-77 %	YY1	2,0	NN	-100 %

AP1/2/3/4: activator protein; AR: Androgenrezeptor; ATF2: Activating transcription factor 2; Brn-3: POU domain, class 4, transcription factor 1; C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha; CAR: Constitutive androstane Rezeptor; CBF: CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), zeta; CDP: *Cut-like homeobox 1*; COUP-TF: *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor*; CREB: *cAMP response element-binding protein*; E2F-1: *E2F transkriptionsfaktor 1*; EGR: *Early growth response proteins*; ELK: *ETS domain-containing protein Elk*; ER: Estrogenrezeptoren; Ets: *v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*; FAST-1 (FOXH1): *Forkhead box protein H1*; FOXA1: *Forkhead box protein A1*; FOXC1/D3/G1/O1/FOX3: *Forkhead box protein C1/D3/G1/O1*; FREAC-2: *Forkhead-related activator 2*; GAS/ISRE: *IFN-stimulated response element*; Gfi-1: *Growth factor independent 1 transcription repressor*; Gli-1: GLI Zink-Finger-Transkriptionsfaktor; GR/PR: Glucocorticoid-/Progesteronrezeptor; HEN(NSCL-1): Basic Helix-Loop-Helix Protein 35; HIF: Hypoxie-induzierter Faktor; HNF1/4: *hepatocyte nuclear factor 1/4*; HOX4C/A-5: *HOX4C/A-5 homobox*;

HSF: Heat shock factor; IRF: interferon regulatory factor; KLF4: Kruppel-like factor 4; MEF1/2: myocyte enhancer factor 1/2; Myb: V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog; Myc-Max: V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog/myc-associated factor X; MyoD: Myogenic differentiation 1; MZF: Myeloid zinc finger; NF-1: nuclear factor 1; NFAT: nuclear factor of activated T-cells; NF-E2: Nuclear factor (erythroid-derived 2); NFkB: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; Nkx2-5/3-2: Homeobox protein Nkx-2.5/3.2; NRF1/2: nuclear respiratory factor 1/2; Oct-1: POU domain, class 2, transcription factor 1; OCT-4: Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor; Pax2/3/5/8: Pair box-2/3/5/8 protein; Pbx1: Pre-B cell leukemia transcription factor-1; Pit: Pituitary specific transcription factor 1; PIT1: POU class 1 homeobox 1; PLAG1: Pleiomorphic adenoma gene 1; PPAR: Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor; Prox1: Prospero homeobox protein 1; PXR: Pregnan-X-Rezeptor; Rb: Retinoblastomprotein; RNUX: SL3-3 enhancer factor 1; ROR (RZR): Retinoic acid receptor-related orphan; RXR: Retinoid-X-Rezeptor; SATB1: Special AT-rich sequence binding protein 1; SF-1: Splicing factor 1; SMUC: Snail-related transcription factor Smuc; Snail: Zink-Finger-Protein Snail; SOX18/2/9: Sox protein 18/2/9; Sp1: Sp1 Transkriptionsfaktor; SRY: sex-determining region Y; Stat1/3/4/5/6: Signal transducer and activator of transcription 1/3/4/5/6; TCF/LEF: Runt-related transcription factor 2; TFE3: Transkriptionsfaktor 3; TFIIID: Transkriptionsfaktor IID; TR: Thyroid hormone receptor; USF-1: Upstream stimulatory factor 1; VDR: Vitamin-D-Rezeptor; XBP-1: X-box binding protein 1; YY1: Yin Yang 1 transcription factor.

#### 4.1.6.2 Einfluss von CSE auf die MZF1-Proteinkonzentration

Zur Untersuchung des Einflusses des TF MZF1 auf Proteinebene wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Hierzu wurden die untersuchten Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T für 24 h mit 10 % CSE inkubiert, die Lysate der Zellen hergestellt und in die SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot eingesetzt. In Abbildung 47 ist die relative Proteinkonzentration im Bezug auf die unbehandelte Kontrolle nach Quantifizierung auf das *housekeeping* Gen  $\beta$ -Aktin dargestellt. Vergleichbar mit dem TF-Array konnte hierbei eine Hemmung nach einer Inkubation mit 10 % CSE beobachtet werden. Die relative Proteinkonzentration sinkt nach Inkubation der Zelllinie A549 auf 80 % ( $p > 0,05$ ) der Kontrolle, während in der Zelllinie eine Hemmung auf 71 % ( $p > 0,05$ ) beobachtet werden konnte.

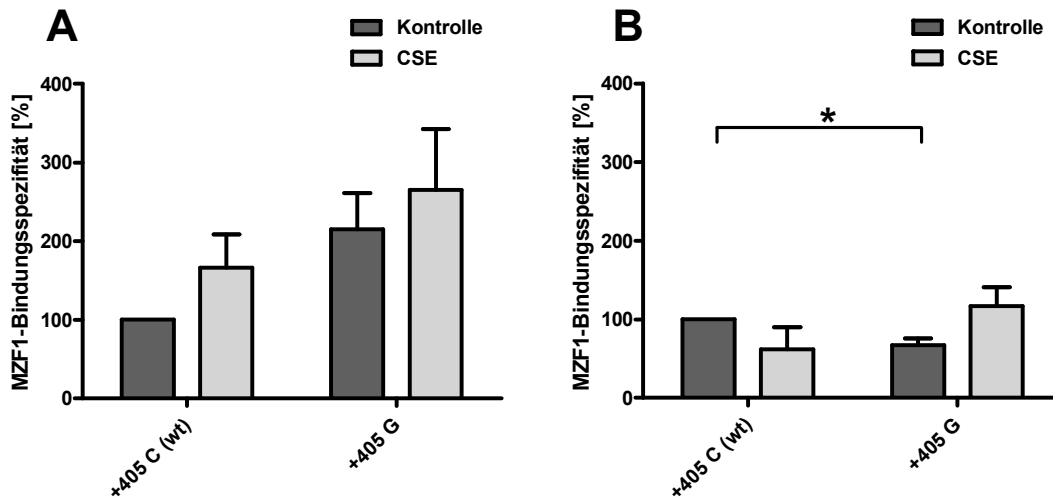


**Abbildung 47: Bestätigung des TF-Arrays für MZF1**

Zur Untersuchung des Einflusses des CSE auf die MZF1-Proteinkonzentration wurde nach Inkubation der verwendeten Zelllinien Lysate hergestellt und zur SDS-PAGE mit anschließendem MZF1-spezifischen Western Blot eingesetzt. Die aufgetragene Proteinmenge wurde anschließend auf das *housekeeping* Gen  $\beta$ -Aktin bezogen. In den Zelllinien konnte hierbei nach Inkubation mit 10 % CSE eine Hemmung des MZF1-Konzentration beobachtet werden ( $n=3$ ;  $p > 0,05$ ).

#### 4.1.6.3 SNP-abhängige Bindungsspezifität des MZF1

Auf Grund der beobachteten Hemmung der MZF1-Expression und der durch Datenbankrecherchen detektierten potenziellen Bindungsstelle im VEGF-Promotor am Locus des SNP +405 C/G, sollte im Folgenden die Relevanz dieses SNPs für die Bindung von MZF1 in Abhängigkeit von CSE evaluiert werden. Hierzu wurden die Zellen nach Transfektion mit den Konstrukten *wt* (+405 C) und +405 (+405 G) mit 10 % CSE inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen aufgeschlossen und die Protein/DNA-Bindungen mittels Formaldehyd fixiert. Nach Inkubation des Lysats mit einem gegen MZF1 gerichteten Antikörper wurde ein Co-ChIP durchgeführt. Zur Bestimmung des an die Plasmid-DNA gebundenen MZF1-Proteins wurde nach DNA-Isolation des Eluats sowie der Input-DNA eine GFP-spezifische qRT-PCR durchgeführt. Der GFP-Gehalt der Proben wurde mittels Kalibriergeraden bestimmt und zur Quantifizierung auf den DNA-*Input*-Gehalt der jeweiligen Probe bezogen. Der Quotient wird als Prozent der unbehandelten, mit dem *wt*-Konstrukt transfizierten Zellen angegeben. Die MZF1-Bindungsspezifität der unbehandelten Kontrollen steigt nach Transfektion des Promotor-SNPs +405 G auf 215 % des *wt*-Konstrukts (+405 C (*wt*);  $p > 0,05$ ; Abbildung 48, A). Nach Inkubation der transfizierten A549 mit 10 % CSE konnte eine gesteigerte Bindungsspezifität für den *wt* (+166 %) und den SNP +405 G (265 %) beobachtet werden. Die Zelllinie HNSCCUM-02T hingegen zeigt nach Transfektion der Zellen mit dem SNP-Reporterkonstrukt +405 G eine signifikant reduzierte MZF1-Bindungsspezifität auf 67 % des *wt* ( $p = 0,02$ ; Abbildung 48, B). Nach Inkubation der Zellen mit 10 % CSE wurde für das *wt*-Konstrukt eine Abnahme der Bindungsspezifität auf 62 % der unbehandelten Kontrolle beobachtet. Die Kapazität nach Transfektion des SNP-Konstruktes +405 G zeigt eine Erhöhung der Bindungsspezifität um +49 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

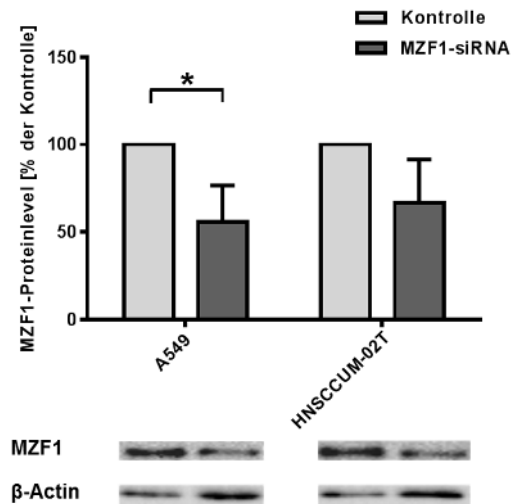


#### Abbildung 48: Messung der SNP-abhängigen Bindungsspezifität von MZF1

Nach Transfektion und Inkubation der Zelllinien A549 (A) und HNSCCUM-02T (B) mit 10 % CSE wurden die Zellen aufgeschlossen und die TF/DNA-Bindungen fixiert. Im Anschluss wurde ein MZF1-spezifischer Co-ChIP durchgeführt, die DNA isoliert und zur GFP-spezifischen pRT-PCR eingesetzt. Die GFP-Gehalte der Proben wurden mittels Kalibriergeraden bestimmt. Im Anschluss wurde der Gehalt der DNA des Eluats auf den Gehalt der Input DNA bezogen und als Prozent der unbehandelten *wt*-Kontrolle angegeben. Nach Inkubation der A549 (A) mit 10 % CSE konnte eine erhöhte Bindungsspezifität nach Transfektion beider SNP-Konstrukte beobachtet werden. Der Vergleich des *wt* und des SNP +405 zeigt eine erhöhte Bindungsspezifität des SNP +405-Konstrukts. Nach Transfektion der Zelllinie HNSCCUM-02T mit dem Reporterkonstrukt +405 zeigt sich eine signifikant reduzierte MZF1-Bindungskapazität von 30 % im Vergleich zum *wt* ( $p=0,02$ ). Nach Inkubation mit 10 % kommt es nach Transfektion des *wt*-Konstrukts zu einer reduzierten, nach Transfektion des +405-Konstrukts zu einer erhöhten Bindungsspezifität ( $n=3$ ;  $*=P<0,05$ ).

#### 4.1.6.4 Einfluss des MZF1 auf die CSE-abhängige VEGF-Promotoraktivität

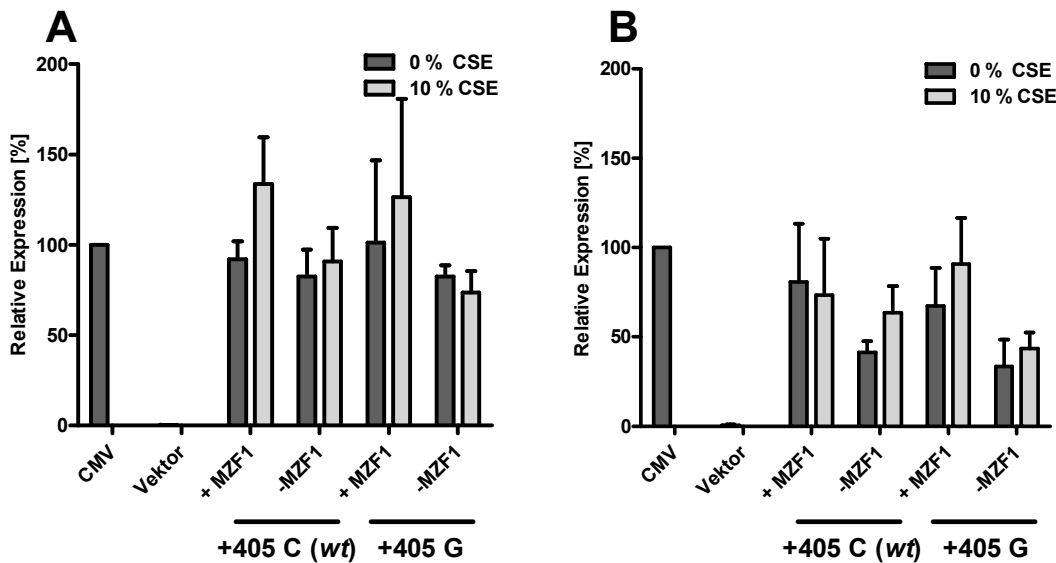
Nachdem mittels des MZF1-spezifischen Co-ChIPs eine SNP-abhängige Bindungsspezifität gezeigt werden konnte, sollte im Folgenden untersucht werden, ob der MZF1 einen relevanten TF der CSE-abhängigen VEGF-Promotoregulation darstellt. Hierzu wurde der MZF1 mittels siRNA Transfektion in den Zellen herabreguliert und anschließend die erfolgreiche Transfektion mit Hilfe des Western Blots nachgewiesen. Nach Transfektion der verwendeten Zelllinien mit MZF1-siRNA konnte in A549 eine Reduktion der MZF1-Proteinkonzentration um -41 % beobachtet werden. Die Transfektion der HNSCCUM-02T mit siRNA weist eine Reduktion um -33 % auf (Abbildung 49).



**Abbildung 49: Herabregulation des MZF1-TF durch siRNA**

Zur Überprüfung der erfolgreichen Hemmung der MZF1-Expression wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. In beiden Zelllinien konnte eine Hemmung des MZF1-Levels auf 56 % der A549 und 67 % der HNSCCUM-02T im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle gezeigt werden (n=3; \*=P<0,05).

Nach der Bestätigung des erfolgreichen siRNA-*knock downs* wurde mittels des GFP-Reporterassays die Promotoraktivität nach MZF1-*knock down* analysiert. Hierzu wurden die Zellen mit den Reporterkonstrukten des *wt* sowie des SNPs +405 G mit siRNA gegen MZF1 kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Ansätze mit 10 % CSE inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde analog des Reporterassays zur Bestimmung der Promotoraktivität vorgegangen und eine GFP-spezifische qRT-PCR durchgeführt. In der Lungenkarzinomzelllinie A549 konnte nach MZF1-*knock down* keine Änderung der Expression des Reportergens GFP gezeigt werden (Abbildung 50, A). Nach Transfektion und zusätzlicher Inkubation der Ansätze mit 10 % CSE wurde eine erhöhte VEGF-Promotoraktivität im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle beobachtet ( $p>0,05$ ). Nach MZF1-*knock down* der Zelllinie HNSCCUM-02T kann nach Transfektion des *wt* sowie des SNPs +405 G eine reduzierte VEGF-Promotoraktivität beobachtet werden (Abbildung 50, B). Die Transfektion des *wt*-Konstrukts (+405 C) und MZF1-*knock down* resultiert in einer Abnahme der VEGF-Promotoraktivität von 39 % im Vergleich zum nicht mit siRNA transfizierten Ansatz. Nach Transfektion beider Konstrukte konnte nach MZF1-*knock down* eine Abnahme um 34 % gezeigt werden ( $P>0,05$ ). Eine Zunahme der Promotoraktivität konnte nach Transfektion des SNP +405 G und MZF1-*knock down* bei zusätzlicher Inkubation mit 10 % CSE gezeigt werden.



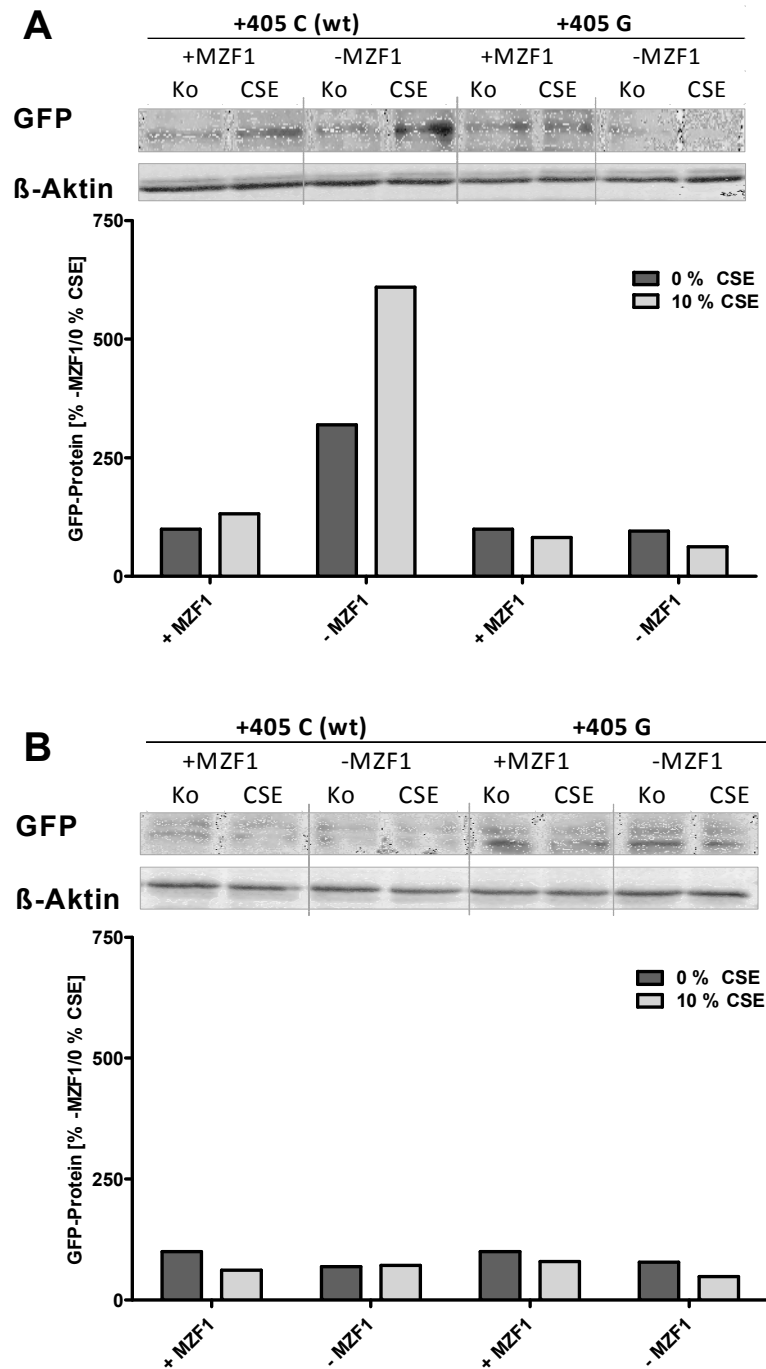
**Abbildung 50: Messung der VEGF-Promotoraktivität nach MZF1-knock down**

Zur Überprüfung eines potenziellen Einflusses des MZF1 auf die VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion mit unterschiedlichen SNP-Reporterkonstrukten wurde nach Transfektion und Herabregulation des MZF1 mittels siRNA eine GFP-spezifische RT-qPCR durchgeführt. In der Zelllinie A549 (A) konnte kein Unterschied einer Kotransfektion mit MZF1-siRNA beobachtet werden. Nach Inkubation mit 10 % CSE und Kotransfektion des *wt* und MZF1-siRNA wurde eine erhöhte VEGF-Promotoraktivität gezeigt ( $p > 0,05$ ). In der Zelllinie HNSCCUM-02T (B) konnte eine Hemmung der VEGF-Promotoraktivität nach *knock down* des MZF1 beobachtet werden ( $p > 0,05$ ). Die Kotransfektion des SNPs 405 G und MZF1-siRNA resultiert in einer erhöhten Promotoraktivität ( $p > 0,05$ ) (A549:  $n=3$ ; HNSCCUM-02T:  $n=3$ ;  $*=P < 0,05$ ).

Nach der Untersuchung der Änderung der Promotoraktivität nach MZF1-knock down auf mRNA-Ebene, wurde der Einfluss zusätzlich auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurden die Zellen analog der Untersuchung auf mRNA-Ebene transfiziert und behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zelllysate in die SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot eingesetzt. Nach Kotransfektion der A549 mit dem *wt*-Reporterkonstrukt sowie MZF1-siRNA konnte eine erhöhte GFP-Expression auf 319 % im Vergleich zum *wt* beobachtet werden. Die Kotransfektion der MZF1-siRNA sowie dem Reporterkonstrukt +405 G zeigte keine Änderung der Proteinkonzentration. Nach Inkubation mit 10 % CSE der mit dem *wt* transfizierten A549 konnte eine erhöhte GFP-Konzentration auf 132 % bzw. nach zusätzlicher Kotransfektion der MZF1-siRNA eine Zunahme auf 610 % beobachtet werden. Die Transfektion des SNP +405 G und anschließender Inkubation mit 10 % CSE resultiert in einer Abnahme der GFP-Konzentration auf 82 % der nicht inkubierten aber mit dem SNP +405 G transfizierten A549. Nach zusätzlicher Kotransfektion mit MZF1-siRNA konnte eine Hemmung auf 62 % gezeigt werden. In der Zelllinie HNSCCUM-02T wurde eine reduzierte GFP-Proteinkonzentration nach Kotransfektion der Konstrukte +405 C (*wt*) und +405 (G) mit

MZF1-siRNA beobachtet. Nach Kotransfektion des *wt* nimmt die Konzentration um 31 % im Vergleich zur nicht mit siRNA kotransfizierten Zellen ab. Nach Kotransfektion der siRNA mit +405 G wurde eine Abnahme der Proteinkonzentration um 22 % bezüglich der nicht kotransfizierten Zellen beobachtet. Nach zusätzlicher Inkubation der mit den Konstrukten *wt* und +405 G transfizierten HNSCCUM-02T wurde eine Abnahme der GFP-Proteinkonzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 39 % bzw. 21 % gezeigt. Die Kotransfektion der Konstrukte mit MZF1-siRNA resultiert nach Inkubation mit CSE in keiner Änderung der Proteinkonzentration im *wt*. Nach MZF1-*knock down* und Transfektion des Konstrukts +405 G wurde eine Abnahme der GFP-Proteinkonzentration um 30 % gezeigt.





**Abbildung 51: Messung der GFP-Proteinkonzentration nach MZF1-knock down und Inkubation mit CSE**

Nach Transfektion der Zelllinien A549 (A) und HNSCCUM-02T (B) mit den Reporterkonstrukten des *wt* sowie des SNP +405 G wurden die Zellen mit CSE inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit MZF1-siRNA zum *knock down* des TF MZF1 kotransfiziert und ebenfalls mit CSE inkubiert. In A549 konnte eine erhöhte GFP-Proteinkonzentration für den *wt* nach Kotransfektion der siRNA sowie nach Inkubation mit CSE beobachtet werden. In der Zelllinie HNSCCUM-02T konnte nach Transfektion des SNPs +405 G eine erhöhte GFP-Proteinkonzentration beobachtet werden. Nach Inkubation mit CSE nimmt die Proteinkonzentration nach Transfektion der verwendeten Konstrukte *wt* und SNP +405 G ab. Nach Kotransfektion der Zellen mit MZF1-siRNA konnte eine Hemmung der GFP-Proteinkonzentration gezeigt werden die nach Transfektion des Konstrukts +405 G abnimmt (A549: n=2; HNSCCUM-02T: n=1).

#### 4.1.6.5 Etablierung einer SNP +405 (wt)-A549-Zelllinie

Die Untersuchung der MZF1-Bindungsspezifität zeigte einen Effekt in Abhängigkeit des SNPs +405 C/G. Im Folgenden sollte dieser Zusammenhang in einer durch *Genome Editing* etablierten Zelllinie SNP +405 (wt)-A549 untersucht werden. Hierzu sollte die Zelllinie A549, die den SNP +405 GG-Genotyp besitzt, mittels des CRISPR/Cas9-Systems etabliert werden. Die Zelllinie A549 wurde im Folgenden mit den Vektoren sowie einer Donor-DNA, die als Template der homologen Rekombination dient, transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für jeweils 24 h mit Puromycin selektiert und anschließend für 7 Tage im Brutschrank belassen, wobei alle drei Tage das Medium gewechselt wurde. Im Anschluss konnten insgesamt 21 Zellklone (10 Klone wt; 11 Klone SNP +405) gepickt und kultiviert werden. Nach Konfluenz einer Zellkulturflasche pro Klon wurde zunächst RNA isoliert und zur GFP-spezifischen qRT-PCR eingesetzt. Unter den 21 gepickten und kultivierten Klonen konnte für neun Proben eine Expression des Reportergens GFP detektiert werden. Zur Verifizierung des erfolgreichen *Genome Editing* wurde die DNA der Klone mit GFP-Expression isoliert und nach VEGF-PCR (siehe 3.2.2.7.1) sequenziert. Im Rahmen dieser Sequenzierung konnte nur der homozygote SNP +405 GG, der in A549 bereits vorhanden war, detektiert werden. Eine erfolgreiche Etablierung des wt an der Stelle des SNPs +405 C/G konnte somit nicht erzielt werden. Eine anschließende mechanistische Untersuchung des Einflusses von CSE in Abhängigkeit des SNP-Genotyps sowie des TF MZF1 in +405 (wt)-A549 konnte somit nicht durchgeführt werden.

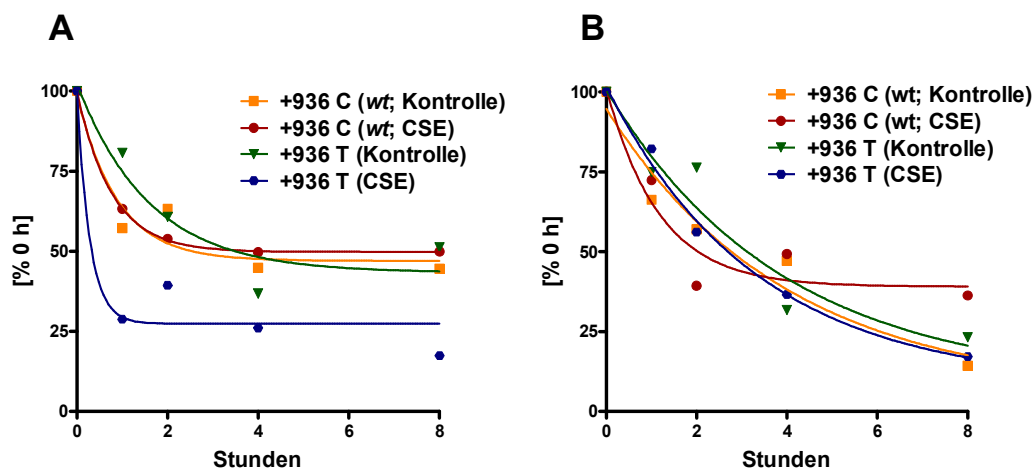
## 4.2 Untersuchung der mRNA-Stabilität

Neben der transkriptionellen Ebene wurde auch die translationale Regulation als wichtiger Mechanismus in der VEGF-Regulation beschrieben. Bei der translationalen Regulation spielt die 3'-UTR eine wichtige Rolle, welche durch die Bindung von Faktoren die Stabilität der mRNA-Transkripte beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des CSE sowie ein in der 3'-UTR lokalisierter SNP (+936 /T) hinsichtlich des Einflusses auf die mRNA-Stabilität untersucht. Neben der Analyse der mRNA-Stabilität mittels qRT-PCR soll auf proteinchemischer Ebene ein potenzieller Effekt der genetischen Variation +936 C/T untersucht werden.

### 4.2.1 Untersuchung der CSE- und SNP-abhängigen mRNA-Stabilität

Zur Untersuchung der SNP-/CSE-abhängigen mRNA-Stabilität wurden die Zellen mit den 3'-UTR Reporterkonstrukten transfiziert, inkubiert und die Transkription mittels Actinomycin D abgestoppt. Die RNA wurde nach 0, 1, 2, 4 und 8 h isoliert und nach

reverser Transkription zur GFP-spezifischen qRT-PCR (siehe 3.2.2.13) eingesetzt. Die ermittelte relative Expression wurde als Prozent der relativen Expression nach 0 h angegeben und die Halbwertszeiten (HWZ) durch nichtlineare Regression bestimmt. Nach Abstoppen der Transkription konnte eine Abnahme der mRNA-Transkripte in Abhängigkeit des 3'-UTR-SNPs +936 C/T sowie der Inkubation mit CSE beobachtet werden. Die GFP-Stabilität als Maß für die stabilisierende Wirkung der VEGF-3'-UTR zeigte nach Transfektion der Zellen mit dem *wt*-Konstrukt eine HWZ von 0,62 h (Abbildung 52, A). Die Transfektion der A549-Zellen mit dem SNP-Konstrukt +936 T resultiert in einer erhöhten Stabilität von 1,11 h. Nach Inkubation der beiden Ansätze mit 10 % CSE konnte nach Transfektion beider Konstrukte eine Abnahme der mRNA-Stabilität auf 0,53 h (+936 C; *wt*) bzw. 0,20 h (SNP +936 T) beobachtet werden. Nach Transfektion der Zelllinie HNSCCUM-02T mit den 3'-UTR-Reporterkonstrukten konnte eine vergleichbare HWZ beider Konstrukte beobachtet werden (2,75 h (+936 C; *wt*) bzw. 2,70 h (+936 T)) (Abbildung 52, B). Nach Inkubation der transfizierten Zellen mit 10 % CSE sinkt die HWZ der mRNA-Transkripte beider Konstrukte auf 0,81 h (+936 C; *wt*) bzw. 2,32 h (+936 T).

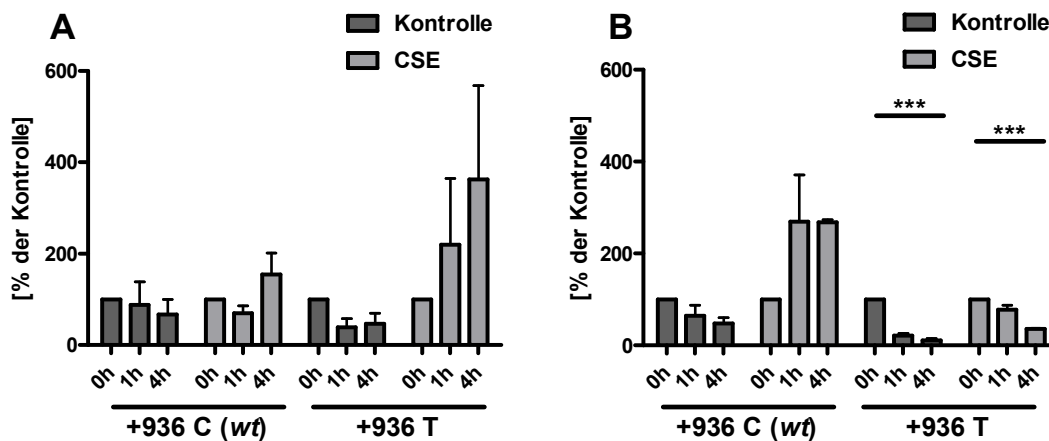


A549	HWZ	HNSCCUM-02T	HWZ
+936 C (wt; Kontrolle)	0,62 h	+936 C (wt; Kontrolle)	2,75 h
+936 C (wt; CSE)	0,53 h	+936 C (wt; CSE)	0,81 h
+936 T (wt; Kontrolle)	1,11 h	+936 T (wt; Kontrolle)	2,70 h
+936 T (wt; CSE)	0,20 h	+936 T (wt; CSE)	2,32 h

#### Abbildung 52: Messung der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität (qRT-PCR)

Zur Untersuchung der mRNA-Stabilität wurden die transfizierten Zelllinien A549 (A) und HNSCCUM-02T (B) mit CSE inkubiert und deren Transkription mittels Actinomycin D abgestoppt. Nach 0, 1, 2, 4 und 8 h wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und eine GFP-abhängige qRT-PCR durchgeführt. In beiden Zelllinien konnte hierbei ein exponentieller Zerfall des mRNA-Gehalts innerhalb von 8 h beobachtet werden (n=4).

Zur Untersuchung des Einflusses des 3'-UTR-SNPs auf die VEGF-mRNA-Stabilität auf Proteinebene wurde ein GFP-ELISA sowie eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Analog zu den bisherigen Versuchen sollte auch dieser SNP auf die Relevanz hinsichtlich einer CSE-abhängigen VEGF-Regulation untersucht werden. Nach Transfektion des *wt*-Konstrukts konnte für die Zelllinie A549 hierbei mittels GFP-ELISA eine Abnahme des GFP-Gehalts innerhalb von 4 h auf 67 % der Kontrolle (0 h) gezeigt werden ( $p > 0,05$ ; Abbildung 53). Eine zusätzliche Inkubation mit CSE resultiert nach 1 h ebenfalls in einer Abnahme (70 %), wobei der GFP-Gehalt nach 4 h auf 154 % der Kontrolle ansteigt. Nach Transfektion des SNPs +936 T sinkt der GFP-Gehalt nach 1 h bzw. 4 h auf 39 % bzw. 47 % der Kontrolle ( $p = 0,09$ ). Die CSE-Inkubation der mit dem SNP transfizierten A549-Zellen resultiert in der Zunahme des GFP-Gehalts auf bis zu 363 % des Gehalts nach 0 h ( $p > 0,05$ ). Nach Transfektion der Zelllinie HNSCCUM-02T mit dem *wt*-Konstrukt sinkt der GFP-Gehalt innerhalb des Messzeitraums ebenfalls zeitabhängig auf 47 % ( $p > 0,05$ ). Nach Inkubation der *wt*-transfizierten Zellen mit 10 % CSE konnte ein erhöhter GFP-Proteingehalt beobachtet werden, wobei der Gehalt nach 4 h auf 268 % der Kontrolle (0 h) ansteigt ( $p > 0,05$ ). Die Transfektion des SNP +936 T-Konstrukts resultiert in einer zeitabhängigen Abnahme auf 11 % des GFP-Gehalts 4 h nach Abstoppen der Transkription ( $p < 0,0001$ ). Die CSE-Inkubation der SNP +936 T transfizierten HNSCCUM-02T resultiert ebenfalls in einer signifikanten, zeitabhängigen Abnahme auf 36 % des Gehalts nach 0 h ( $p = 0,001$ ).

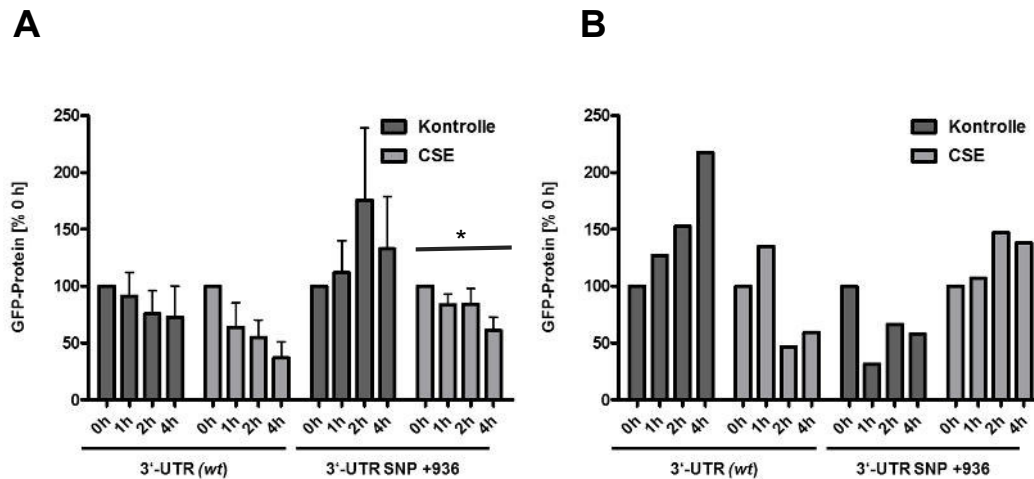


**Abbildung 53: Messung der GFP-Proteinkonzentration nach Transfektion und Inkubation mit CSE (GFP-ELISA)**

Zur Untersuchung der SNP +936 C/T-abhängigen mRNA-Stabilität der Reporterkonstrukte wurden die Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T transfiziert und inkubiert. Mittels Actinomycin D wurde im Anschluss die Transkription gestoppt und das Zelllysate nach 0, 1 und 4 h zur Bestimmung des GFP-Gehalts eingesetzt. Der GFP-Gehalt nach Abstoppen der Transkription und GFP-ELISA ist für die Zelllinie A549 (A) und HNSCCUM-02T (B) in Prozent des Gehalts nach 0 h dargestellt (n=3).

In der Annahme, dass eine erhöhte mRNA-Stabilität zu einer erhöhten Proteinmenge führt, wurde die mRNA-Stabilität mittels Western Blot untersucht, um eine funktionelle Relevanz zu erlangen. Die Zellen wurden transfiziert, inkubiert und 0, 1, 2 und 4 h nach Abstoppen der Transkription Zelllysate hergestellt. Die Lysate wurden in die SDS-PAGE eingesetzt und die mRNA-Stabilität mittels Proteingehalt des Reportergens GFP analysiert. Der GFP-Gehalt wurde mittels des *housekeeping* Gens  $\beta$ -Aktin quantifiziert und in Prozent der jeweiligen Kontrolle zum Zeitpunkt 0 h angegeben. Nach Transfektion der A549 mit dem 3'-UTR *wt*-Reporterkonstrukt sinkt der mRNA-Gehalt innerhalb des Messzeitraums bis zu 4 h nach Abstoppen der Transkription auf 73 % des Gehalts nach 0 h ( $p > 0,05$ ; Abbildung 54, A). Eine zusätzliche Inkubation der transfizierten A549 resultiert in einer zeitabhängigen Reduktion auf 37 % ( $p > 0,05$ ). Entgegen dieser Beobachtungen wurde nach Transfektion der A549 mit dem SNP +936 T-Konstrukt ein erhöhter mRNA-Gehalt detektiert. Die höchste mRNA-Konzentration konnte hierbei nach 2 h mit 176 % des Gehalts nach 0 h beobachtet werden. Nach Inkubation der mit dem SNP +936 T transfizierten A549 nimmt der mRNA-Gehalt zeitabhängig nach 4 h auf 61 % ab ( $p = 0,002$ ). In der Zelllinie HNSCCUM-02T wurde nach Transfektion des *wt* eine zeitabhängige Zunahme der GFP-Proteinkonzentration nach 4 h auf 218 % gezeigt. Nach CSE-Inkubation der mit dem *wt*-Konstrukt transfizierten HNSCCUM-02T steigt nach 1 h die GFP-Konzentration auf 135 % bezüglich der 0 h-Kontrolle. 2 h bzw. 4 h

nach Abstoppen der Transkription sinkt die GFP-Proteinkonzentration auf 47 % bzw. 59 % (Abbildung 54, B). Nach Transfektion des SNPs +936 T wurde eine reduzierte GFP-Proteinkonzentration auf 31 % beobachtet, bevor nach 2 h bzw. 4 h ein Anstieg der Proteinkonzentration auf 66 % bzw. 58 % gezeigt werden konnte. Nach zusätzlicher Inkubation der mit dem 3'-UTR-Konstrukt +936 T transfizierten HNSCCUM-02T steigt die GFP-Konzentration bis 2 h nach dem Abstoppen der Transkription auf 147 %. Nach 4 h sinkt die GFP-Proteinkonzentration auf 138 %.



**Abbildung 54: Messung der GFP-Proteinkonzentration nach Transfektion und Inkubation mit CSE (Western Blot)**

Zur Untersuchung der SNP-/CSE-abhängigen mRNA-Stabilität wurde nach Transfektion und Inkubation der A549 (A) und HNSCCUM-02T (B) die Transkription abgestoppt und nach 0, 1, 2 und 4 h Zelllysate hergestellt. Die Lysate wurden nach SDS-PAGE im Western Blot analysiert. Der GFP-Gehalt wurde nach Quantifizierung auf das *housekeeping* Gen  $\beta$ -Aktin als Prozent des Gehalts nach 0 h dargestellt. Nach Transfektion der Zelllinie A549 (A) mit dem *wt*-Konstrukt sinkt der GFP-Proteingehalt zeitabhängig, vergleichbare Beobachtungen konnten nach Inkubation mit CSE sowie Transfektion des SNP +936 T und zusätzlicher Inkubation gezeigt werden. Nach Transfektion des SNPs +936 T steigt die GFP-Proteinkonzentration. In der Zelllinie HNSCCUM-02T konnte nach Transfektion des *wt* sowie des SNPs +936 T und CSE-Inkubation eine zeitabhängige Zunahme der GFP-Proteinkonzentration beobachtet werden. Nach Inkubation der mit dem *wt* transfizierten HNSCCUM-02T konnte nach 2 h bzw. 4 h eine Abnahme des GFP-Gehalts beobachtet werden. Nach Transfektion des SNPs +936 T nimmt die GFP-Konzentration ab (A549: n=3; HNSCCUM-02T: n=2).

## 5 Diskussion

### 5.1 Einfluss von CSE auf die SNP-abhängige VEGF-Promotoraktivität

Die VEGF-Überexpression ist charakteristisch für zahlreiche Tumore und kann durch den Verlust oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, der Aktivierung von Onkogenen sowie externer Stimuli beeinflusst werden<sup>38</sup>. Zahlreiche Studien konnten zudem unterschiedliche VEGF-SNPs im Zusammenhang mit veränderten Plasmakonzentrationen beschreiben<sup>42,68,130</sup>. Neben den Beobachtungen hinsichtlich der veränderten VEGF-Plasmakonzentrationen wird ein Zusammenhang der VEGF-SNPs mit der Prognose der Patienten vermutet<sup>10,23</sup>. In Studien von Kämmerer *et al.* (2013) konnte ein potenzieller Zusammenhang des Überlebens sowie der Prognose von OSCC-Patienten in Abhängigkeit deren SNPs und Raucherstatus beobachtet werden<sup>97</sup>. Zusätzlich beobachteten Schneider *et al.* (2008) unter Rauchern einen Zusammenhang des SNP -460 C/T und dem Risiko an einem Ösophaguskarzinom zu erkranken<sup>91</sup>. Der Regulationsmechanismus hinter dem Zusammenhang des Raucherstatus der Patienten und deren SNP-Genotyp konnte bislang nicht beschrieben werden und wird im Rahmen dieser Arbeit analysiert. Hierzu wurde zunächst die SNP-abhängige VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion der Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T mit den SNP-Reporterkonstrukten untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss einer CSE-Inkubation auf eine SNP-abhängige Promotoraktivität analysiert. Im Anschluss wurde die VEGF-Expression der primären Nasenschleimhautzellen und der Zellkulturen nach Inkubation mit CSE in Abhängigkeit der VEGF-Promotor-SNPs untersucht.

#### 5.1.1 SNP-abhängige VEGF-Promotoraktivität

Zur Identifikation eines möglichen regulatorischen Mechanismus wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst der Einfluss von drei als krankheitsassoziiert beschriebenen SNPs sowie deren Kombinationen, auf die VEGF A-Promotoraktivität untersucht. Hierzu wurden die Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T mit den SNP-Reporterkonstrukten transfiziert und hinsichtlich deren Promotoraktivität untersucht. Im Anschluss erfolgte die SNP-abhängige Analyse der VEGF-Translation in primären Nasenschleimhautproben und Zelllinien. Analog wurden die Zelllinien HNSCCUM-02T und A549 ebenfalls hinsichtlich der VEGF-Translation untersucht.

### 5.1.1.1 Der Promotor-SNP -2578 A/C

Für den SNP -2578 C (CCC) konnte nach Transfektion eine geringere Promotoraktivität im Vergleich zum *wt* (ACC) gezeigt werden (Abbildung 31, A/B). Auf Grund der reduzierten Promotoraktivität des C-Allels wurde für dieses Allel eine geringere VEGF-Translation und damit eine reduzierte Plasmakonzentration vermutet. Nach Transfektion der Zelllinien konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine Änderung der VEGF-Translation gezeigt werden (Abbildung 34). In primären Nasenschleimhautzellen hingegen wurde für den heterogenen Genotyp AC eine im Vergleich zum Genotyp -2578 AA erhöhte VEGF-Proteinkonzentration beobachtet (Abbildung 37; B), die jedoch nicht mit der für das C-Allel einhergehenden reduzierten Promotoraktivität erklärt werden kann (Abbildung 31, B). Shahbazi *et al.* (2002) und Mohammadi *et al.* (2009) beobachteten dagegen in PBMC gesunder Probanden mit einem -2578 CC-Genotyp eine signifikant höhere VEGF-Produktion im Zellüberstand im Vergleich zum Genotyp AA<sup>130,131</sup>. Bei der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten reduzierten Promotoraktivität des C-Allels handelt es sich demnach nicht um den zugrunde liegenden Mechanismus der in epidemiologischen Studien für den CC-Genotyp beobachteten erhöhten Plasmakonzentration.

Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus der hier beobachteten reduzierten Promotoraktivität des C-Allels könnte auf transkriptioneller Ebene begründet liegen. Mit Hilfe computerbasierter TF-Datenbanken wurden potenzielle TF-Bindungsstellen in der Sequenz des SNP -2578 A/C untersucht<sup>99</sup>. Für das -2578 A-Allel konnten dabei zwei (RFX5 und NFIC), für das C-Allel drei (*E2F transcriptionfaktor 1* (E2F1), HIF1:ARNT (Hypoxie-induzierter Faktor: *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein*) und TAL1:TCF3 (TAL1: *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1*; TCF3: *Transcription factor 3*)) potenzielle Bindungsstellen identifiziert werden<sup>99</sup>. Trotz der computerbasierten Identifikation der potenziellen TF-Bindungsstellen wurden diese bislang nicht im Zusammenhang mit der VEGF-Regulation untersucht. Die Assoziation zwischen der hypoxievermittelten erhöhten VEGF-Expression und des HIF1:ARNT Dimers konnte bereits, unter Beteiligung zahlreicher anderer *cis*-Elemente des Promotors, gezeigt werden<sup>52,132</sup>. Die am SNP -2578 lokalisierte potenzielle Bindungsstelle wurde jedoch wie bereits erwähnt in diesem Zusammenhang bislang nicht beschrieben.

Nasr *et al.* (2008) konnten computerbasiert eine potenzielle Bindungsstelle des TF GATA-2 identifizieren, wobei eine geringere Bindungsspezifität in Gegenwart des -2578 A-Allels vermutet wird<sup>133</sup>. Ein direkter Zusammenhang der GATA-2-abhängigen VEGF-Genregulation wurde bislang nicht gezeigt. Weitere Hypothesen der potenziellen SNP -2578-abhängigen VEGF-Regulation auf transkriptioneller Ebene beziehen sich auf die Beobachtung der TNF $\alpha$ -vermittelten erhöhten VEGF-Produktion,



in Abhängigkeit einer AP1-Aktivierung<sup>130</sup>. Mohammadi *et al.* (2009) untersuchten hierbei die TNF $\alpha$ -induzierte VEGF-Produktion in Abhängigkeit der SNPs -2578 A/C und -1154 A/G<sup>130</sup>. Ein direkter Zusammenhang dieser Beobachtungen bezüglich der SNP -2578 A/C-abhängigen Regulation wurde dabei nicht gezeigt<sup>130</sup>.

Ein weiterer potenzieller Regulationsmechanismus kann durch die Verbindung zu einer zusätzlichen Sequenz (18 bp) in Gegenwart des -2578 A-Allels vermutet werden. Supic *et al.* (2012) postulierten hierbei einen möglichen Mechanismus und eine erhöhte VEGF-Produktion auf Grund des Vorhandenseins eines *upstream estrogen response elements* (ERE) nahe der 18 bp-Insertion<sup>14</sup>. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl in gesundem Gewebe als auch in Tumorgewebe unterschiedliche VEGF-Plasmakonzentrationen in Abhängigkeit des SNP -2578 A/C beobachtet werden konnten<sup>68,134,135</sup>. In der Literatur wurden zahlreiche Regulationsmechanismen postuliert, deren Zusammenhang mit dem VEGF-Promotor-SNP -2578 A/C bislang jedoch nicht bestätigt werden konnten. Die Beobachtung der Promotoraktivität im Rahmen dieser Arbeit schließt einen Regulationsmechanismus der in der Literatur beschriebenen veränderten Plasmakonzentrationen aus. Ein potenzieller transkriptioneller Mechanismus kann jedoch durch die 18 bp-Insertion in Gegenwart des A-Allels vermutet werden und sollte näher untersucht werden.

#### 5.1.1.2 Der Promotor-SNP -460 C/T

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein zelllinienabhängiger Unterschied der VEGF-Promotoraktivität in Abhängigkeit des SNPs -460 C/T beobachtet (Abbildung 31). Während nach Transfektion des SNPs -460 (ATC) in die Zelllinie A549 die VEGF-Promotoraktivität unverändert im Vergleich zum *wt* (ACC) bleibt (Abbildung 31, A), konnte in der Zelllinie HNSCCUM-02T eine reduzierte Aktivität beobachtet werden (Abbildung 31, B). Auf Grund der geringeren Promotoraktivität des -460-T-Allels in HNSCCUM-02T-Zellen wird eine geringere VEGF-Translation und damit verbundene gesenkte Plasmakonzentrationen vermutet. Die Beobachtungen der Zelllinie A549 für das T-Allel hingegen weisen auf eine unveränderte Plasmakonzentration durch die gleichbleibende Promotoraktivität hin. Nach Genotypisierung der Nasenschleimhautproben wurde die SNP -460-Genotypen CC und CT identifiziert (Abbildung 36, B). Für den Genotyp CT wurde hierbei eine erhöhte VEGF-Translation im Vergleich zum CC-Genotyp gezeigt. Diese Ergebnisse widersprechen der Vermutung der reduzierten bzw. unveränderten VEGF-Translation des T-Allels auf Grund der geringeren bzw. unveränderten Promotoraktivität. Im Gegensatz dazu geht die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete reduzierte Promotoraktivität des T-Allels in der Zelllinie HNSCCUM-02T mit der in der Literatur gezeigten gesenkten VEGF A-

Produktion in normalem kolorektalen Gewebe einher<sup>135</sup>. Zudem wurde in epidemiologischen Studien das -460 T-Allel in der asiatischen Bevölkerung als Risikofaktor für das Auftreten von OSCC identifiziert<sup>83,95</sup>. In einer Studie mit europäischen Patienten konnte hingegen kein Zusammenhang beobachtet werden<sup>67</sup>. Die heterogenen Beobachtungen in epidemiologischen Studien<sup>67,83,95</sup> hinsichtlich einer Assoziation des SNPs -460 und der Krankheitsentstehung gehen mit der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten zelllinienabhängigen Promotoraktivität einher, womit ein Zusammenhang mit weiteren genetischen sowie exogenen Faktoren vermutet werden könnte.

Neben einem Einfluss auf die Promotoraktivität wird die Hypermethylierung als potenzieller Regulationsmechanismus beschrieben. In der oralen Kanzerogenese spielt die Hypermethylierung von Promotoren eine wichtige Rolle, wobei die Hypermethylierung zur Hemmung der transkriptionellen Aktivität führen kann<sup>136,137</sup>. Lu *et al.* (2015) konnten in ihrer Studie nach Inkubation der Zungenkrebszelllinie SCC-4 mit dem Anästhetikum Sevofluran eine gesteigerte VEGF-Promotormethylierung detektieren<sup>138</sup>. Eine von Lu *et al.* (2015) identifizierte potenzielle Methylierungsstelle ist der SNP -460 C/T. Bislang konnte jedoch für den VEGF-Promotor kein epigenetischer Mechanismus über die Methylierung beobachtet werden<sup>139</sup>.

Generell wurden in der Literatur für den Promotor-SNP -460 C/T heterogene Beobachtungen hinsichtlich der VEGF-Plasmagehalte und dem Zusammenhang mit der Krankheitsentstehung gemacht. Ein potenzieller regulatorischer Zusammenhang mit der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Promotoraktivität kann weder ausgeschlossen noch bestätigt werden, da eine Assoziation weiterer Faktoren auf Grund der beobachteten Zelllinienabhängigkeit vermutet wird.

#### 5.1.1.3 Der Promotor-SNP +405

Nach Transfektion der Zelllinie A549 mit dem Reporterkonstrukt des Promotor-SNPs +405 G (ACG) konnte im Vergleich zum *wt* eine geringere VEGF-Promotoraktivität beobachtet werden (Abbildung 31, A). Nach Transfektion der Zelllinie HNSCCUM-02T hingegen wurde keine Änderung der Aktivität gezeigt (Abbildung 31, B). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde somit eine vergleichbare bzw. reduzierte Plasmakonzentration in Gegenwart des SNPs +405 G vermutet. Durch die Genotypisierung der isolierten primären Nasenschleimhautzellen konnte lediglich der Genotyp GG identifiziert werden, womit keine Rückschlüsse auf eine genotypspezifische VEGF-Expression gezogen werden konnten. Im Gegensatz zur vermuteten vergleichbaren bzw. reduzierten Plasmakonzentration in Gegenwart des SNPs +405 G konnten Watson *et al.* (2000) für den SNP +405 GG-Genotyp die höchsten VEGF-Konzentrationen beobachten<sup>42</sup>.

Während in epidemiologischen Studien das C-Allel häufiger in NSCLC-Patienten beobachtet werden konnte<sup>23</sup>, wiesen OSCC-Patienten mit diesem Allel ein signifikant besseres Überleben sowie ein höheres krankheitsfreies Überleben auf<sup>97</sup>.

Auf Grund der Lokalisation des SNPs +405 C/G im Promotor könnte ein Regulationsmechanismus auf transkriptioneller Ebene durch veränderte Bindungscharakteristika von TF vorliegen. Neben der Identifikation der potenziellen TF-Bindungsstellen der TFs ELK4 und IRF2 des C-Allels, konnten für das G-Allel potenzielle Bindungsstellen für die Faktoren *PR domain zinc finger protein 1* (PRDM1), *hepatocyte nuclear factor 4 gamma* (HNF4G) und *nuclear respiratory factor 1* (NRF1) beobachtet werden<sup>99</sup>. Weitere Studien zeigten potenzielle Bindungsstellen der TFs GABP $\alpha$  und IF1 für das C-Allel und SP1 für das G-Allel<sup>87</sup>. Bisher konnte hinsichtlich der computergestützten Identifikation potenzieller TF-Bindungsstellen kein Zusammenhang hinsichtlich der VEGF-Expression beobachtet werden.

Des Weiteren wird eine Interaktion des SNPs +405 C/G und einem weiteren, im Rahmen dieser Studie nicht untersuchten, Promotor-SNP -1154 A/G vermutet<sup>140</sup>. Bei der Untersuchung des -1154//+405 Haplotyps konnten Awata *et al.* (2005) in einem Reporterassay eine erhöhte VEGF-Promotoraktivität des -1154 G//+405 C Haplotyps beobachten<sup>141</sup>. Prior *et al.* (2006) vermuten hierbei einen möglichen Einfluss von HRE und dessen Interaktion mit dem *upstream* gelegenen AP-1 sowie des *downstream* gelegenen AP-2 $\alpha$ . Die Bindungssequenz des AP-2 $\alpha$  liegt innerhalb des SNP -1154, wobei ein Zusammenhang mit dem SNP +405 bei diesem potenziellen Regulationsmechanismus vermutet wird<sup>140</sup>. Ein weiterer potenzieller Mechanismus des SNP +405 stellt der TF MZF1 dar, der in den letzten Jahren auch im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs analysiert wurde. Watson *et al.* (2000) vermuten hierbei einen möglichen SNP-abhängigen Einfluss der Bindungsspezifität des MZF1<sup>42</sup>. Diese Interaktion wird in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

#### 5.1.1.4 Analyse des SNP-Haplotyps

In Studien zur Untersuchung des Einflusses mehrerer SNPs in Kombination mit der VEGF-Expression und deren Zusammenhang mit unterschiedlichen Erkrankungen wurde beobachtet, dass die untersuchten SNPs bevorzugt in bestimmter Kombination vorliegen<sup>142</sup>. Chen *et al.* (2012) beobachteten hierbei vor allem die Haplotypen der SNPs -2578// -460//+405 ACG (48,1 %), CTC (29,6 %) und CTG (18,7 %)<sup>142</sup>, die auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. In beiden Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T wurde nach Transfektion der untersuchten Kombinationen (-460//+405 (ATG), -2578//+405 (CCG), -2578// -460 (CTC) und -2578// -460//+405 (CTG)) eine im Vergleich zum *wt* verminderte Promotoraktivität beobachtet (Abbildung 31, A/B). Diese

Beobachtungen lassen geringere Plasmakonzentrationen in Gegenwart dieser Haplotypen vermuten. Bei der Untersuchung des Einflusses des CC-Haplotyps der SNPs -460 C/T und +405 C/G beobachteten Stevens *et al.* (2003) eine erhöhte VEGF-Expression, wobei in gesunden Kontrollen der Haplotyp CG am häufigsten beobachtet wurde<sup>48,83,143</sup>. In der vorliegenden Arbeit liegt dieser Haplotyp sowohl im Konstrukt des *wt* (ACC) sowie bei der Untersuchung des SNP -2578 A/C (CCC) vor. Nach Transfektion beider Konstrukte liegt die Promotoraktivität über der durchschnittlichen Promotoraktivität nach Transfektion der Zelllinien. Der Haplotyp ACC weist dabei eine geringere Promotoraktivität auf als CCC, wodurch im Rahmen dieser Arbeit eine Beteiligung des SNPs -2578 in Gegenwart des -460//+405 CC-Haplotyps an der transkriptionellen VEGF-Regulation vermutet wird.

In weiteren Studien wurde die VEGF-Expression bzw. -Promotoraktivität zusätzlich in Abhängigkeit des oftmals als krankheitsassoziiert beschriebenen SNPs -1154 A/G untersucht<sup>140,144</sup>. Der Promotor-SNP -1154 A/G liegt ebenfalls in der in das Reporterkonstrukt inklinierten Sequenz (-1154 A)<sup>140,145</sup>. Studien von Prior *et al.* (2006) zeigen in Myoblasten mit Hilfe eines Reporterassays eine erhöhte durch Hypoxie induzierte VEGF-Expression der Haplotypen -2578// -1154//+405 AAG und CGC im Vergleich zu AGG und CGG. Unter normoxischen Bedingungen weist der Haplotyp CGG die höchste Reporteraktivität auf, wobei sich die Aktivität der anderen Haplotypen auf ähnlichem Niveau befinden<sup>140</sup>. In epidemiologischen Studien wurde der Haplotyp CAG mit einer erhöhten, der Haplotyp CGG mit einem geringeren OSCC-Risiko in Verbindung gebracht<sup>14</sup>. Awata *et al.* (2005) beobachteten in einer Gliomzelllinie nach Transfektion des Konstrukts -1154 G//+405 G die höchste VEGF-Promotoraktivität<sup>141</sup>. Wie bereits erwähnt wurde der SNP -1154 A/G im Rahmen dieser Arbeit nicht explizit untersucht liegt jedoch als -1154 A in der in den Vektor inklinierten Sequenz vor. Die Beobachtungen der genannten Studien erfordern eine zusätzliche Untersuchung des SNPs -1154 A/G<sup>14,140,141,145</sup>.

Im Rahmen dieser Studie wurde beobachtet, dass die VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion der A549 Zellen mit den Promotorkonstrukten *wt* (ACC) sowie -460 (ATC) am höchsten ist. Mittlere Aktivitäten konnten für die Konstrukte -2578 (CCC) und -2578// -460 (CTC) sowie -2578//+405 (CCG) und -2578// -460//+405 (CTG) beobachtet werden. Die geringste Promotoraktivität zeigt sich nach Transfektion der A549 Zellen für die Konstrukte +405 (ACG) und -460//+405 (ATG). Diese Beobachtung lässt einen regulatorischen Mechanismus unabhängig des Promotor-SNPs -460 C/T in der Zelllinie A549 vermuten. In der OSCC-Zelllinie weisen die Haplotypen in Gegenwart des SNP -460 T eine geringere VEGF-Promotoraktivität im Vergleich zu den Haplotypen mit dem SNP -460 C auf. Entgegen des vermuteten -460-unabhängigen Mechanismus

durch die Beobachtung in der Zelllinie A549 kann hiermit für die OSCC-Zelllinie HNSCCUM-02T eine Beteiligung des SNPs -460 C/T an der Regulation der VEGF-Promotoraktivität nicht ausgeschlossen werden.

Zur Untersuchung eines zelllinienspezifischen Effekts wurde zusätzlich die Zervixkarzinomzelllinie HeLa untersucht. Hierbei konnte einhergehend mit den Beobachtungen der Zelllinie A549 für die Haplotypen *wt* (ACC) und -460 (ATC) sowie +405 (ACG) und -460//+405 (ATG) eine -460-abhängige Abnahme der VEGF-Promotoraktivität in Gegenwart des SNP -460 T beobachtet werden. Für die Haplotypen -2578 (CCC) und -2578//+405 (CTC) sowie -2578//+405 (CCG) und -2578//+405 (CTG) wurde, vergleichbar der Beobachtungen der HNSCCUM-02T, keine Änderung der VEGF-Promotoraktivität in Abhängigkeit des SNP -460 C/T beobachtet.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie demnach eine zelllinienabhängige Regulation der VEGF-Promotoraktivität im Zusammenhang mit dem SNP -460 C/T gezeigt. Die Ergebnisse dieser potenziellen Assoziation lassen eine Erklärung für die bislang in epidemiologischen Studien beobachteten heterogenen Zusammenhänge vermuten (siehe 5.1.1.2), wobei in diesen Studien kein haplotypspezifischer Effekt analysiert wurde<sup>67,83,95</sup>. Die Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigen die Vermutung eines potenziellen Regulationsmechanismus auf transkriptioneller Ebene in Abhängigkeit des Haplotyps.

### 5.1.2 Einfluss von CSE auf die SNP-abhängige VEGF A-Promotoraktivität

In epidemiologischen Studien konnte neben dem Einfluss spezifischer SNPs auch der Zusammenhang mit Umweltfaktoren beobachtet werden<sup>96,97,142,146</sup>. Genetische Polymorphismen könnten auch eine Rolle in der Frage spielen wie Individuen auf zellulärer Ebene auf unterschiedliche Umweltfaktoren reagieren<sup>142,146</sup>. Die VEGF-Promotoraktivität wurde nach Transfektion der Zellkulturmodelle mit den Promotorkonstrukten und Inkubation der Zellen mit der Noxe Zigarettenrauch untersucht. Im Anschluss wurden die primären Nasenschleimhautzellen hinsichtlich der SNP-abhängigen VEGF-Expression nach CSE-Inkubation analysiert.

#### 5.1.2.1 Promotor-SNP -2578 A/C und Inkubation mit CSE

Nach Inkubation der transfizierten Zelllinien mit dem Reporterkonstrukt -2578 (ACC) konnte keine Änderung der VEGF-Promotoraktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 32). Auf mRNA-Ebene wurde in primären Nasenschleimhautzellen eine erhöhte VEGF-Expression für den AC-Genotyp gezeigt, womit eine erhöhte VEGF-Translation vermutet wird (Abbildung 36, B). Auf

Proteinebene wurde für diesen Genotyp hingegen keine Änderung beobachtet, wohingegen für den Genotyp AA nach CSE-Inkubation eine reduzierte VEGF-Translation gezeigt wurde. Der Regulationsmechanismus der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten veränderten VEGF-Translation ist hierbei nicht durch die ebenfalls gezeigte unveränderte Promotoraktivität nach CSE-Inkubation zu erklären. In der Literatur konnten keine Studien identifiziert werden, die die VEGF-Expression bzw. die VEGF-Promotoraktivität in Abhängigkeit des SNPs -2578 A/C und der Noxe CSE bzw. eines Zigarettenrauchinhaltsstoffs untersuchen. Kämmerer *et al.* (2013) beobachten in OSCC-Patienten mit Nikotinabusus und dem Vorhandensein des -2578 AC-Genotyps ein erhöhtes OSCC-Risiko<sup>97</sup>. In Lungenkrebspatienten wurde für Raucher mit dem A-Allel ein erhöhtes Risiko beobachtet<sup>92</sup>. Chen *et al.* (2012) zeigen eine geringere Krankheitsaktivität in rheumatischer Arthritis in Nicht-Rauchern mit dem Genotyp AA, während diese Assoziation nicht für Raucher bestätigt wurde<sup>142</sup>. Die Zusammenhänge des SNPs, dem Raucherstatus der Patienten und dem Auftreten von OSCC und Lungenkrebs, kann im Rahmen der Untersuchung der SNP -2578 A/C abhängigen Promotoraktivität nicht erklärt werden.

Als ein weiterer Regulationsmechanismus auf transkriptioneller Ebene ist die Ausbildung alternativer Sekundärstrukturen denkbar, die jedoch im Rahmen dieses Reporterassays nicht untersucht werden konnte. Die polypurin-/polypyrimidinreiche Region des VEGF-Promotors wurde in der Literatur bereits mit der Bildung von alternativen Sekundärstrukturen, sogenannten G-Quadruplexen, in Verbindung gebracht<sup>147,148</sup>. Diese atypischen Sekundärstrukturen wiederum werden durch kleine Moleküle stabilisiert, wodurch eine Hemmung der VEGF-Expression vermutet wird<sup>38,147-149</sup>. Heterozyklische Amine, wie Quindoline-Derivate, sind im Zusammenhang mit der Regulation der VEGF-Quadruplexe des Promotors beschrieben<sup>149</sup>. Quindoline wurden zudem als Inhaltsstoffe des Zigarettenrauchs<sup>150</sup> beschrieben, wobei ein möglicher Zusammenhang hypothetisiert werden kann. Des Weiteren können einige TFs diese Strukturen erkennen, binden und dadurch die Genexpression beeinflussen (z. B. Sp1)<sup>147,151</sup>. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine Änderung der VEGF-Translation in Abhängigkeit des SNPs -2578 C/A und CSE gezeigt. Der genaue Regulationsmechanismus kann dabei nur weiter vermutet werden, da keine Änderung der Promotoraktivität gezeigt werden konnte.

#### 5.1.2.2 Promotor-SNP -460 C/T und Inkubation mit CSE

Nach Inkubation des SNP -460 T-Reporterkonstrukts mit CSE wurde in beiden untersuchten Zelllinien eine Zunahme der VEGF-Promotoraktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle des Konstrukts beobachtet (Abbildung 32). Nach

Genotypisierung der Nasenschleimhautproben wurden die SNP -460-Genotypen CC und CT identifiziert (Abbildung 36, B). Für den CC-Genotyp wurde hierbei eine erhöhte VEGF-Expression nach Inkubation mit 10 % CSE beobachtet, während die Expression sowie die VEGF-Proteinkonzentration für den CT Genotyp unverändert bleiben (Abbildung 36, B). Auf Proteinebene wurde nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen ebenfalls keine Veränderung beobachtet, wobei ein Zusammenhang der erhöhten Promotoraktivität auf Proteinebene nicht bestätigt werden konnte. Durch die Vielzahl der im Zigarettenrauch vorkommenden Verbindungen wird eine Beteiligung zahlreicher Mechanismen an der CSE-abhängigen Regulation der VEGF-Promotoraktivität vermutet. Wie bereits erwähnt, konnten in Patientenstudien hinsichtlich der Betrachtung der -460 C/T-abhängigen VEGF-Plasmakonzentrationen nur heterogene Beobachtungen gemacht werden<sup>67,83,95</sup>. Neben einem zelllinienabhängigen Einfluss (vgl. 5.1.1.4) kann eine weitere mögliche Erklärung der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Einfluss des CSE darstellen, da die meisten epidemiologischen Studien keine Unterscheidung hinsichtlich des Tabakkonsums der Patienten treffen. Nach Unterscheidung der Patienten in Abhängigkeit des Tabakkonsums wurde ein erhöhtes OSCC-Risiko für Patienten mit Tabakabusus und dem Vorliegen des heterogenen Genotyps CT gezeigt<sup>97</sup>. Lin *et al.* (2013) beobachteten in einer Metaanalyse, dass das -460 T-Allel möglicherweise als schützender Faktor einer Lungenkreberkrankung unter Nichtrauchern dient<sup>92</sup>. Zhai *et al.* (2008) zeigten unter Rauchern ein erhöhtes Risiko eines Ösophaguskarzinoms in Gegenwart des Genotyps -460 CT+CC, wobei dieser Genotyp unter Nichtrauchern mit einem geringeren Erkrankungsrisiko assoziiert wurde<sup>96</sup>. Die epidemiologischen Daten, wie heterogene Beobachtungen der VEGF-Plasmakonzentrationen ohne Unterscheidung des Raucherstatus, weisen auf einen potenziellen Zusammenhang dieses SNPs, der Krankheitsentstehung und dem Rauchverhalten der Patienten hin.

#### 5.1.2.3 Promotor-SNP +405 C/G und Inkubation mit CSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine CSE-abhängige Promotoraktivität für den SNP +405 C/G beobachtet, sodass ein Einfluss dieses SNPs in der genotypspezifischen, CSE-abhängigen VEGF-Regulation möglicherweise ausgeschlossen werden kann. Bei der Untersuchung der SNP-abhängigen VEGF-Expression/-Translation in primären Nasenschleimhautzellen konnte nur der Genotyp GG identifiziert werden, womit keine Aussage über einen potenziellen Einfluss gemacht werden konnte. Vergleichbar mit den Promotor-SNPs -2578 und -460 konnten auch für diesen SNP keine Literatur hinsichtlich der SNP- und CSE-abhängigen VEGF-Plasmakonzentration bzw. Promotoraktivität gefunden werden. Einhergehend mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten Kämmerer

*et al.* (2013) keinen Zusammenhang des SNPs +405, dem Rauchverhalten der OSCC-Patienten und der Krankheitsentstehung<sup>97</sup>. Des Weiteren beobachteten Zhai *et al.* (2008) und Lin *et al.* (2013) keinen Zusammenhang des SNPs +405 hinsichtlich des Rauchverhaltens und der Erkrankung an Ösophaguskarzinomen bzw. Lungenkrebs<sup>92,96</sup>. Zusammenfassend wurde in epidemiologischen Studien kein Zusammenhang des SNPs +405 und dem Rauchverhalten der Patienten hinsichtlich der Krankheitsentstehung identifiziert. Diese Beobachtungen konnten auch im Rahmen dieser Arbeit auf Grund der unveränderten VEGF-Promotoraktivität bestätigt werden.

#### 5.1.2.4 Analyse des Haplotyps der Promotor-SNPs nach Inkubation mit CSE

Auch im Zusammenhang mit Umweltfaktoren spielt nicht der einzelne SNP, sondern der Haplotyp eine entscheidende Rolle in der transkriptionellen Regulation des VEGF-Gens. Die Untersuchung der haplotypabhängigen VEGF-Promotoraktivität konnte eine zelllinienabhängige Regulation zeigen. Bislang wurden keine Beobachtungen des Haplotyps hinsichtlich der durch CSE beeinflussten VEGF-Expression bzw. -Plasmakonzentration in Krebspatienten gemacht. Chen *et al.* (2012) beobachteten lediglich bei Patienten mit rheumatischer Arthritis und dem Haplotyp ACG tendenziell niedrigere Plasmalevel, konnten jedoch keinen Unterschied der VEGF-Konzentration in Abhängigkeit des Rauchverhaltens der Patienten machen<sup>142</sup>. Zusätzlich beobachteten Zhai *et al.* (2008), unter Einbeziehung des SNPs +936, in Patienten mit Ösophaguskarzinom keine Assoziation der Haplotypen -460//+405//+936 und dem Raucherstatus der Patienten<sup>96</sup>. Zusammenfassend zeigt die Untersuchung der haplotypabhängigen Promotoraktivität im Rahmen dieser Arbeit deutliche Unterschiede in Abhängigkeit einer CSE-Inkubation, wobei ein Zusammenhang der Haplotypen ATC, CTC, ACC und CCG mit der CSE-abhängigen Regulation der VEGF-Promotoraktivität gezeigt wurde.

#### 5.1.3 Einfluss von CSE auf Zellen des Atemtrakts

Das Auftreten von Tumoren des oberen und unteren Atemtrakts wird, wie bereits erwähnt, häufig mit dem Rauchverhalten von Patienten assoziiert. Nikotin wurde in zahlreichen Studien als „aktivste“ und süchtig machende Komponente eingehend auf deren toxischen Effekt untersucht<sup>152–155</sup>. Studien mit Gesamtextrakt aus Zigaretten konnten nicht so häufig identifiziert werden wie Studien mit Nikotin und geben auf Grund der Vielzahl der Komponenten keinen abschließenden Aufschluss über potenzielle additive Schädigungsmechanismen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der zytotoxische Einfluss des verwendeten CSE in den Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T untersucht.



Neben der Untersuchung des Einflusses auf Zelllinien wurde der Einfluss auf primäre Nasenschleimhautzellen untersucht.

#### 5.1.3.1 Zytotoxischer Einfluss von CSE auf Zellen des respiratorischen Epithels

Die Untersuchung des zytotoxischen Effekts auf die verwendeten Zelllinien des Atemtrakts zeigt nach 24-stündiger Inkubation mit CSE einen zelllinienabhängigen Einfluss. Nach Inkubation mit CSE konnte in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 keine konzentrationsabhängige, auf die Lebendzellzahl bezogene, Viabilität der Zellen gezeigt werden (Abbildung 39). Die Lebendzellzahl nimmt sowohl nach Färbung mit Kristallviolett (Abbildung 43) als auch mittels des LIVE/DEAD®-Assays (Abbildung 41) zu. Studien von Yamadori *et al.* (2012) konnten vergleichbar mit den Ergebnissen der Zelllinie A549 keine Änderung der metabolischen Aktivität in den niedrigsten untersuchten Konzentrationen (0,005-0,1 % CSE) beobachten<sup>156</sup>. Kaushik *et al.* (2008) beobachteten in der Zelllinie A549, ebenfalls keine Änderung der metabolischen Aktivität<sup>157</sup>. Unter Verwendung höherer Konzentrationen zeigen Das *et al.* (2009) eine konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität nach 24-stündiger Inkubation mit CSE<sup>76</sup>. Entgegen der Ergebnisse der Zelllinie A549 konnte im Rahmen dieser Arbeit in der Zelllinie HNSCCUM-02T bis zu einer 5 %-igen CSE-Konzentration im Medium eine Zunahme der metabolischen Aktivität auf 130 % der unbehandelten Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 39). Die Betrachtung der Lebendzellzahl nach Kristallviolettfärbung (Abbildung 43) sowie LIVE/DEAD®-Assay (Abbildung 41) zeigt eine konzentrationsabhängige Abnahme der Lebendzellzahl. In Übereinstimmung der Lebendzellzahl konnte bei der Untersuchung der toten Zellen im LIVE/DEAD®-Assay eine geringe konzentrationsabhängige Zunahme gezeigt werden. Silva *et al.* (2012) beobachteten vergleichbar mit den Ergebnissen der Zelllinie HNSCCUM-02T nach Inkubation von in geringeren Konzentrationen eine leichte Zunahme und in höheren Konzentrationen eine Abnahme der metabolischen Aktivität<sup>154</sup>. Neben Nikotin wurden zahlreiche weitere Zigarettenrauchinhaltsstoffe und deren Einfluss auf die metabolische Aktivität und Vitalität der Zellen analysiert<sup>152,154,155,158</sup>. Auf Grund der Vielzahl der im Zigarettenrauch enthaltenen Verbindungen werden additive, molekulare Regulationsmechanismen der Proliferation und gesteigerten metabolischen Aktivität vermutet, die bislang noch nicht aufgeklärt werden konnten.

Die Untersuchung des zytotoxischen Einflusses des CSE auf die untersuchten Karzinomzelllinien ist zelllinienabhängig. Puliyappadamba *et al.* (2010) beobachteten in den Lungenkarzinomzelllinien H1299 (p53 -/-) und A549 (p53 +/-) eine unterschiedliche Proliferation der Zelllinien nach Inkubation mit Nikotin in Abhängigkeit des p53-Status. Hierbei konnte nach Inkubation der p53 -/- Zelllinie H1299 eine gesteigerte Proliferation

im Vergleich zur Zelllinie A549 gezeigt werden<sup>159</sup>. Die im Rahmen dieser Studie verwendete Zelllinie HNSCCUM-02T besitzt eine homozygote *missense*-Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch am Codon 205 führt. Aufgrund der dennoch bestehenden Expression des mut-p53 kann eine *Gain-of-Function*-Mutation vermutet werden. Die beobachtete zelllinienabhängige Proliferation und metabolische Aktivität könnte daher auf der unterschiedlichen p53-Funktion der verwendeten Zelllinien basieren. Hierdurch kann eine fehlende Induktion der Apoptose und eine resultierende erhöhte Proliferation der HNSCCUM-02T verursacht werden. Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um Tumorzelllinien, wobei diese bereits Veränderungen und/oder eine veränderte Genexpression verschiedener Gene aufweisen<sup>4,5</sup>. Zur weiteren Untersuchung der zelllinienabhängigen, zytotoxischen Wirkung nach Inkubation mit CSE wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zervixkarzinomzelllinie HeLa ebenfalls hinsichtlich des Effekts nach Inkubation mit CSE untersucht (Anhang VIII). Die Bestimmung der metabolischen Aktivität nach Inkubation mit CSE zeigte in A549 keine konzentrationsabhängige Änderung, während für HNSCCUM-02T eine Zunahme beobachtet werden konnte. In HeLa hingegen wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme der metabolischen Aktivität auf 74 % nach Inkubation mit 10 % CSE gezeigt. Nach Inkubation der Zelllinien mit CSE und der Untersuchung der Vitalität sinkt die lebende Zellzahl der Zelllinie HNSCCUM-02T, wobei der Anteil der toten Zellen steigt. In den Zelllinien A549 und HeLa hingegen konnte keine Änderung bei der Betrachtung der lebenden und toten Zellen beobachtet werden. Die Lebendzellzahl sinkt in der Zelllinie HNSCCUM-02T, wohingegen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zelllinien A549 und HeLa beobachtet werden konnte. Diese zusätzliche Betrachtung der Zelllinie HeLa bekräftigt die Hypothese eines zelllinienabhängigen Einfluss auf die metabolische Aktivität und die Proliferation nach Inkubation mit CSE. Zusammenfassend konnte somit bei der Untersuchung des CSE-abhängigen zytotoxischen Effekts ein zelllinienabhängiger Einfluss in den Zelllinien A549, HNSCCUM-02T und HeLa gezeigt werden.

#### 5.1.4 Einfluss von CSE auf die Migration/Invasion von Tumorzelllinien

Die Metastasierung von Primärtumoren ist ein Indiz für die schlechte Prognose sowie eines der Hauptprobleme bei der Behandlung von Tumoren<sup>125</sup>. Der VEGF spielt bei der Metastasierung von Tumoren eine Schlüsselrolle. In Patienten mit Ösophaguskarzinom konnte die Metastasierung der Lunge mit dem Raucherstatus der Patienten assoziiert werden<sup>160</sup>, wodurch ein Zusammenhang des Rauchverhaltens der Patienten und der Lokalisation des Sekundärtumors vermutet wird<sup>160</sup>. In der Literatur werden zahlreiche Modelle der Tumormetastasierung postuliert<sup>125,161</sup>. Der multifaktorielle Prozess der

Metastasierung besteht vereinfacht aus der Ablösung der Zellen, der lokalen Invasion, dem Eindringen in das Blut- oder Lymphsystem, Extravasation und schließlich dem erneuten Wachstum in entfernten Organen/Gewebe<sup>162</sup>. Die Voraussetzungen die eine Tumorzelle zur Metastasierung benötigt, sind Teilungsfähigkeit, Anpassung an veränderte Mikroumgebungen, Bewegungsfähigkeit sowie die Apoptoseresistenz<sup>163</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Beobachtung des CSE-abhängigen Migrationsverhaltens der verwendeten Zelllinien ein Scratch-Assay durchgeführt. Nach Aussaat der Zellen und anschließender Inkubation (1-10 % CSE) wurde die Migration in einen zuvor zellfreien Spalt beobachtet. In A549 konnte nach Inkubation mit 1-5 % CSE eine umgekehrt konzentrationsabhängige Migration beobachtet werden (Abbildung 45, A/B). In der höchsten untersuchten Konzentration (10 % CSE) wurde ein mit der unbehandelten Kontrolle vergleichbares Migrationsverhalten gezeigt. Untersuchungen des zugrunde liegenden Mechanismus zeigten eine erhöhte CSE-induzierte Zellinvasion nach Stimulation mit VEGF, wobei nach Hemmung des nAChR die nikotin- sowie VEGF-induzierte Migration der Zellen reduziert wurde<sup>164</sup>. Das *et al.* (2009) konnten eine Hemmung der Migration nach CSE-Inkubation der Zelllinie A549 zeigen, wobei höhere CSE-Konzentrationen als in dieser Arbeit verwendet wurden<sup>76</sup>. Durch die Untersuchung der partikulären Stoffe des Zigarettenrauchs konnte eine Abnahme der Migration beobachtet werden<sup>165</sup>. Entgegen der gesteigerten Migration nach Inkubation der Zelllinie A549 mit CSE konnte für HNSCCUM-02T Zellen kein Einfluss beobachtet werden (Abbildung 45, C/D). Grund des potenziellen Mechanismus der zelllinienabhängigen Migration wird wie erwähnt eine veränderte p53-Funktion in der Zelllinie HNSCCUM-02T vermutet. Bei der Beobachtung anderer *Gain-of-Function*-Mutationen des p53 Gens wurde bereits ein Einfluss auf die Migration und Invasion gezeigt<sup>166</sup>. Des Weiteren geht die erhöhte Migrationsgeschwindigkeit der HNSCCUM-02T mit der erhöhten VEGF-Expression im Vergleich zur Zelllinie A549 einher.

Wie bereits erwähnt, ist neben der Fähigkeit der Migration für die Metastasierung, die Überwindung der Basalmembran (Invasion) nötig, um in das Blut-/Lymphsystem oder angrenzende Gewebe zu gelangen<sup>125</sup>. Die Invasion der untersuchten Zelllinien wurde dabei mittels des Invasionsassays untersucht, wobei das invasive Verhalten nach Inkubation mit CSE durch eine mit Matrigel beschichtete Membran beobachtet wurde. Das Matrigel entspricht in dessen Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Nach 24-stündiger Inkubation konnte in beiden untersuchten Zelllinien eine reduzierte Zahl invasiver Zellen beobachtet werden (Abbildung 46). Zusammenfassend wurde somit für die Zelllinie A549 eine gesteigerte CSE-abhängige Migration, jedoch eine gehemmte Invasion beobachtet. In der Zelllinie HNSCCUM-02T hingegen konnte kein Effekt der CSE-Inkubation auf die Migration, jedoch eine ebenfalls gehemmte Invasion

gezeigt werden. Die Beobachtungen lassen vermuten, dass Inhaltsstoffe des CSE Mechanismen hemmen, die für die Invasion der Zellen essenziell sind und für die Migration von Tumorzellen nicht benötigt werden. Vergleichbar mit den Untersuchungen der Migration wurde die Abhängigkeit der Invasion von Nikotin bereits in zahlreichen Studien untersucht<sup>154,167,168,168,169</sup>. Xu *et al.* (2011) zeigten eine Zunahme der invasiven Zellen nach Inkubation mit CSE<sup>170</sup>. Grund für diesen Unterschied wird in der Herstellung des CSE vermutet. Xu *et al.* (2011) verwenden eine wesentlich höhere CSE-Konzentration sowie filterlose Zigaretten<sup>170</sup>.

Migration und Invasion sind die beiden essenziellen Prozesse der Metastasierung, wobei der VEGF einen Schlüsselregulator der Prozesse darstellt. Die im Rahmen dieser Studie beobachtete gesteigerte Migration in A549 sowie die verringerte Zahl der invasiven Zellen nach Inkubation mit CSE lässt vermuten, dass die Fähigkeit der Invasion durch eine extrazelluläre Matrix durch Inkubation mit CSE nicht induziert wird.

### 5.1.5 CSE-abhängige Regulation der TF-Aktivität

Im Rahmen dieser Studie wurde gezeigt, dass neben einer SNP-abhängigen Regulation der VEGF-Promotoraktivität ein möglicher Effekt von Umwelteinflüssen wie Zigarettenrauch eine Rolle spielt. Durch die Lokalisation zahlreicher potenziell krankheitsassoziiertes SNPs im VEGF-Promotor wird u.a. ein transkriptioneller Mechanismus hinter diesem Zusammenhang vermutet<sup>42,90,140</sup>. Die Expression einzelner TFs konnte bereits in Abhängigkeit mit der Inkubation mit CSE/CSC, Zigarettenrauch oder Nikotin beobachtet werden<sup>74,171-174</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von CSE als extrinsischer Faktor auf die TF-Expression untersucht. Hierzu wurde die Zelllinie A549 mit 10 % CSE inkubiert und das Kernlysate zur Bestimmung der TF-Expression in einen TF-Array eingesetzt. Die Untersuchung des Einflusses des CSE auf die TF-Expression zeigte eine gehemmte TF-Expression in zahlreichen TFs. Im Folgenden soll ausschließlich auf die TFs eingegangen werden, die bereits im Zusammenhang mit dem VEGF-Gen beschrieben wurden.

Als erste mit dem VEGF-Gen assoziierte TFs wurden HIF1 und AP1 identifiziert<sup>46,174</sup>. Die Analyse des Einflusses von CSE auf die TF-Aktivität zeigt keine Änderung für den TF AP1. Entgegen dieser Beobachtung konnten Swensen *et al.* (2011) nach Inkubation mit CSC eine erhöhte AP1-Aktivität beobachten. Der HIF1 $\alpha$  spielt in der Induktion der VEGF-Expression unter hypoxischen Bedingungen eine wichtige Rolle<sup>37,175</sup>, wobei im Rahmen dieser Arbeit eine Hemmung nach CSE-Inkubation gezeigt werden konnte. Zhang *et al.* (2007) konnten in A549 eine erhöhte HIF1 $\alpha$ -Expression nach Inkubation mit Nikotin in einem Konzentrationsbereich von 0,5-10  $\mu$ M beobachten<sup>176</sup>. Michaud *et al.* (2003) zeigten in humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (engl.: *human umbilical*

*vein endothelial cells*; HUVEC) nach Inkubation mit CSE eine reduzierte HIF1 $\alpha$ -Stabilität, die zu einer geringeren VEGF-Expression führt<sup>173</sup>. Neben der VEGF-Regulation in Abhängigkeit der TFs AP1 und HIF wurde auch eine Bindungsstelle des E2F1 im VEGF-Promotor lokalisiert<sup>177</sup>. Bezüglich des VEGF-Gens konnte neben einer vermuteten Assoziation des SNPs -2578 A/C eine Hemmung der VEGF-Expression durch eine gehemmte p53/E2F1 Wechselwirkung beschrieben werden<sup>177</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine hohe E2F-1-Aktivität in der unbehandelten Kontrolle beobachtet. Die Inkubation der A549 mit 10 % CSE resultiert in einer Abnahme der E2F1-Aktivität. Die Inkubation mit Nikotin von glatten Muskelzellen aus den Atemwegen von Ratten resultiert in einer Dissoziation des E2F1 vom Rb<sup>178</sup>, wodurch der E2F1 an die Promotorregionen der Zielgene binden kann<sup>179</sup>. In der Literatur wurden keine Studien zum Zusammenhang der CSE-Inkubation und der E2F-1-assoziierten Änderung der VEGF-Expression identifiziert.

Der TF Sp1, der bereits im Zusammenhang mit der VEGF-Regulation beschrieben wurde, zeigte im Rahmen dieser Arbeit nach Inkubation mit CSE eine reduzierte Expression. Entgegen dieser Beobachtung konnten Di *et al.* (2012) nach Inkubation mit CSE eine erhöhte Sp1-Expression zeigen, wobei eine filterlose Zigarette sowie eine geringere CSE-Konzentration verwendet wurde<sup>180</sup>. Zudem wurde eine erhöhte Sp1-Lokalisation im Kern sowie eine erhöhte Bindungsaktivität nach Inkubation mit CSE beobachtet<sup>180</sup>. Abdelrahim *et al.* (2004) zeigen in der Zelllinie Panc 1 eine wichtige Rolle der Sp-Proteine in der VEGF-Regulation nach Wechselwirken mit GC-reichen Motiven des VEGF-Promotors<sup>51</sup>.

Der Sp1 wurde weiter in zahlreichen Studien mit weiteren TFs interagierend beschrieben. Unter den interagierenden Faktoren befindet sich der Androgenrezeptor (AR), wobei Eisermann *et al.* (2013) eine Hemmung der hormoninduzierten VEGF-Expression durch Wechselwirkung mit dem AR beobachten konnten<sup>181</sup>. Die AR-Expression wurde im Rahmen dieser Studie ebenfalls durch CSE gehemmt. Neben der beschriebenen Interaktion des Sp1 und des AR konnten Safe *et al.* (2005) zahlreiche weitere TFs und deren Wechselwirkung mit dem Sp1 identifizieren. Unter anderem konnten Interaktionen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten TFs AP2, der GATA-Familie, *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), p53, SMAD-Familie, *Myogenic differentiation 1* (MyoD), *POU domain, class 2, transcription factor 1* (Oct-1), Rb und des *Yin Yang 1 transcription factor* (YY1) beobachtet werden<sup>50</sup>.

Für den TF AP2 wurde nach Inkubation der A549 mit CSE keine Änderung der TF-Aktivität beobachtet. Eine Abnahme auf weniger als 50 % der Kontrolle wurde für die TFs E2F1, GATA, NFAT, SMAD-Familie, Myo D, Oct-1, Rb und YY1 nach Inkubation mit CSE gezeigt.

Nach Inkubation von Zigarettenrauch einer filterlosen Zigarette beobachteten Zhao *et al.* (2007) in A549 eine Induktion des TF GATA<sup>182,183</sup>. Die TF-Familie GATA reguliert u.a. durch Interaktion mit dem Sp1 die Expression zahlreicher Gene in unterschiedlichen Zelltypen<sup>184</sup>. In Studien zum Zusammenhang der nikotinabhängigen  $\alpha 7$ -nAChR-Expression wurde nach Inkubation von oralen Kreatinozyten mit Nikotin und Zigarettenrauch eine erhöhte GATA-Bindungsspezifität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gezeigt<sup>184</sup>. Zudem beobachteten Arredondo *et al.* (2007) nach Inkubation mit Nikotin und GATA2-*knock down* eine Hemmung der  $\alpha 7$ -nAChR-Überexpression<sup>184</sup>. Studien von Brown *et al.* (2013) zeigten eine stabile Interaktion der TFs Sp1 und GATA 4 und GATA 6 nach Inkubation mit Nikotin<sup>185</sup>. In Folge dieser Interaktion wurde zudem eine erhöhte Bindungsaktivität der SP1/GATA 4/GATA 6-Komplexe an den  $\alpha 7$ -nAChR-Promotor beobachtet<sup>185</sup>. Durch die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Regulation TFs der GATA-Familie durch CSE sowie der Identifikation einer potenziellen Bindungsstelle am SNP -2578 A/C wird ein potenzieller Zusammenhang des Faktors mit einem möglichen CSE-/SNP-abhängigen Regulationsmechanismus vermutet.

Für das Mitglied NFATC2 der NFAT-Familie wurde in einer computerbasierten Analyse eine Bindungsstelle in der mit dem SNP -2578 A/C in Verbindung gebrachten Insertion -2549 identifiziert<sup>99</sup>. NFAT wurde bereits als wichtiger Faktor in der Proliferation, Angiogenese, Migration und Invasion beschrieben<sup>186</sup>. Untersuchungen mit dem in Zigarettenrauch vorkommenden  $\alpha, \beta$ -ungesättigten Aldehyd Acrolein zeigt keinen Effekt hinsichtlich der NFAT/DNA-Bindungsaktivität<sup>187</sup>. Zur weiteren Untersuchung sollte dieser TF, durch die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete CSE-abhängige reduzierte Expression, hinsichtlich dessen Interaktion und potenziellen Zusammenhangs mit der VEGF-Regulation untersucht werden.

Eine Hemmung der Smad3-Expression wurde gezeigt, indem A549 Zellen über einen Zeitraum von 300 Tagen mit CSC inkubiert wurden<sup>188</sup>. Nach 48-stündiger Inkubation von A549 konnten Springer *et al.* (2004) in einem Konzentrationsbereich, vergleichbar mit dieser Arbeit, eine Hemmung von Smad6 und 7 zeigen<sup>189</sup>. Zhao *et al.* (2007) beobachteten nach Inkubation von A549 mit Zigarettenrauch eine erhöhte DNA-Bindungsaktivität der TF Smad3/4<sup>182,183</sup>. Auf Grund des beobachteten CSE-Einflusses im Rahmen dieser Arbeit auf die Smad-Regulation sowie die in der Literatur beobachtete veränderte DNA-Bindungsaktivität stellt die Smad-Familie, neben den bereits erwähnten TFs, ebenfalls einen möglichen CSE-abhängigen Regulationsmechanismus dar.

Zu einem der am häufigsten untersuchten Tumorsuppressorgene zählt der Rb, wobei eine gehemmte Expression für zahlreiche Tumore gezeigt werden konnte<sup>178</sup>. In oralen Karzinomen konnten Xu *et al.* (1998) jedoch widersprüchliche Beobachtungen hinsichtlich der fehlenden Rb Expression machen<sup>190</sup>. Pande *et al.* (1998) beobachteten

in 66 % der untersuchten OSCC-Proben eine fehlende Rb-Expression<sup>191</sup>. Hinsichtlich eines potenziellen Zusammenhangs des Rb mit der VEGF-Expression wurde in NSCLC eine schwache Korrelation der VEGF-Expression mit dem Apoptoseregulator Rb beobachtet<sup>192</sup>. Zudem wurde ein Zusammenhang mit dem Rauchverhalten vermutet<sup>191</sup>. Wie bereits erwähnt konnte in Ratten nach Inkubation mit Nikotin eine Dissoziation des E2F1 vom Rb und einer daraus resultierenden, gesteigerten Phosphorylierung des Rb beobachtet werden<sup>178</sup>. Das Verständnis des genauen Regulationsmechanismus und der Interaktion mit CSE kann zum Verständnis der CSE-abhängigen VEGF-Regulation beitragen.

Der YY1 TF ist an der Regulation vieler biologischer Prozesse beteiligt und mit der Metastasierung zahlreicher Tumoren assoziiert<sup>193</sup>. Der YY1 bindet an die Promotoren zahlreicher Gene, wobei dessen Beteiligung an der Zytokinexpression bislang nicht *in vivo* aufgeklärt wurde<sup>194</sup>. In *in vivo* Studien an Mäusen nach Inkubation mit Zigarettenrauch wurde eine erhöhte transkriptionelle Aktivität des YY1 beobachtet<sup>195</sup>. Im Rahmen dieser Studie konnte nur eine geringe YY1-Aktivität der unbehandelten A549 Zellen detektiert werden. Nach Inkubation mit 10 % CSE sinkt die Aktivität hierbei unter die Nachweisgrenze. In der Literatur konnte bislang kein Zusammenhang des YY1 und der direkten VEGF-Regulation beschrieben werden. Ein Zusammenhang des YY1 mit der CSE-abhängigen VEGF-Regulation in A549 Zellen gilt daher als unwahrscheinlich. Neben der Interaktion des TF Sp1 mit zahlreichen Faktoren und die daraus resultierende potenzielle Beeinflussung zahlreicher Signalwege konnte eine Konkurrenz des Sp1 mit dem TF KLF4 um die Bindungsstelle im VEGF-Promotor beobachtet werden<sup>196</sup>. Der KLF4 wurde bereits als Repressor der VEGF-Expression charakterisiert<sup>196</sup> und wird im Rahmen dieser Arbeit nach Inkubation der Zelllinien mit CSE ebenfalls gehemmt. Zusammenfassend kann durch die Interaktion des Sp1 mit zahlreichen TFs sowie dessen Konkurrenz mit KLF4 um die Bindungsstelle eine Schlüsselrolle in der CSE-abhängigen VEGF-Regulation vermutet werden.

Der Stammzellmarker Oct4 wird in NSCLC überexprimiert und geht mit einer schlechten Differenzierung sowie mit einem schlechteren Gesamtüberleben in NSCLC einher<sup>197</sup>. Chen *et al.* (2012) konnten in diesem Zusammenhang bei schwacher VEGF-induzierter Angiogenese und der Überexpression des Oct4 eine maligne Proliferation in NSCLC beobachten<sup>197</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in der Kontrolle nur eine geringe Oct4-Aktivität beobachtet werden, die nach Inkubation mit 10 % CSE unter der Nachweisgrenze liegt. Diese Beobachtung deutet auf einen CSE-unabhängigen Mechanismus der gezeigten Überexpression in NSCLC hin.

Der E2F-1 sowie der Sp1 stellen u.a. durch deren Interaktion mit weiteren TFs einen komplexen Zusammenhang mit der VEGF-Regulation dar. Diese Tatsache erschwert die Charakterisierung des Mechanismus hinter einer potenziellen CSE-abhängigen VEGF-Regulation und der potenziellen Assoziation mit SNPs. Am Beispiel der beobachteten stabilen Sp1/GATA 4 und GATA 6 Interaktion nach Inkubation mit CSE und einer daraus resultierenden erhöhten Bindungsaktivität an den  $\alpha 7$ -nAChR-Promotor wird die Komplexität der CSE-abhängigen VEGF-Regulation deutlich. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der in der Literatur beobachteten Assoziation mit der VEGF-Regulation und der im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Beeinflussung durch CSE v.a. der E2F-1 näher untersucht werden sollte.

### 5.1.6 Zusammenhang des Promotor-SNPs +405 und dem TF MZF1

In Studien von Watson *et al.* (2000) konnte eine erhöhte Bindungsaffinität des MZF1 in Gegenwart des SNP +405 G-Allels beschrieben werden<sup>42,65</sup>. In Studien zur Untersuchung der SNP-abhängigen VEGF-Expression wird oftmals ein potenzieller Einfluss des MZF1 im Hinblick auf den Einfluss des SNP +405 C/G vermutet, wobei ein regulatorischer Zusammenhang des MZF1 mit der VEGF-Expression sowie einen Einfluss von CSE bislang nicht gezeigt wurde.

#### 5.1.6.1 Einfluss auf die MZF1-Bindungsspezifität

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der SNP +405 C/G-abhängigen MZF1-Bindungsspezifität ein Co-ChIP durchgeführt. In der Zelllinie A549 wurde nach Durchführung des Co-ChIPs eine erhöhte Bindungsspezifität in Gegenwart des +405 G-Allels beobachtet (Abbildung 48, A). Diese Beobachtung geht mit den Studien von Watson *et al.* (2000) einher<sup>42</sup>. Im Gegensatz dazu zeigte die Untersuchung der HNSCCUM-02T nach Transfektion der Reporterkonstrukte +405 C (*wt*) und +405 G eine reduzierte Bindungsspezifität für das G-Allel (Abbildung 48, B). Ursprünglich ist der MZF1 vor allem im Zusammenhang mit der Blutbildung (Hämatopoese) beschrieben, wobei der Forschungsschwerpunkt v.a. auf dessen Einfluss auf die myeloide Differenzierung sowie Leukämien liegt<sup>198,199</sup>. Nachdem der MZF1 u.a. in kolorektalen Zellkulturmodellen als überexprimiert beschrieben wurde<sup>203,200</sup> richtet sich das Augenmerk heute vermehrt auf den Zusammenhang des Faktors in der Ätiologie solider Tumore der Lunge, der Brust und des Darms. In epidemiologischen Studien mit OSCC-Patienten wurde ein Verlust der MZF1-Expression mit einem fortgeschrittenen klinischen Stadium und einer größeren Tumorgroße assoziiert<sup>201</sup>. Die beobachteten tumorspezifischen Expressionsmuster stellen eine Erklärung der zelllinienspezifischen Bindungsspezifität dar. Nach den Ergebnissen des TF-Arrays hinsichtlich des Einflusses



einer CSE-Inkubation auf die MZF1-Aktivität wurde die Bindungsspezifität zusätzlich nach Inkubation mit 10 % CSE untersucht. In der Zelllinie A549 konnte in diesem Zusammenhang, in beiden untersuchten Reporterkonstrukten, eine Zunahme der MZF1 Bindungsspezifität beobachtet werden. Diese Beobachtung der gesteigerten Bindung des MZF1 an den VEGF-Promotor nach CSE-Inkubation deutet neben der Hemmung der MZF1-Aktivität, auf eine veränderte Bindungsspezifität in Gegenwart von CSE hin. In HNSCCUM-02T konnte nach Transfektion des *wt* und Inkubation mit CSE eine gehemmte Bindungsspezifität beobachtet werden. Die Transfektion des SNPs +405 G-Reporterkonstrukts resultiert hingegen, nach Inkubation mit CSE, in einer gesteigerten MZF1-Bindungsaktivität. Der zelllinienabhängige Unterschied der verwendeten Zellkulturmodelle verdeutlicht die Notwendigkeit einer tumorspezifischen Untersuchung des Einflusses des MZF1 hinsichtlich dessen Bindungsspezifität sowie dem Zusammenhang mit endogenen Faktoren (z. B. Tabakkonsum).

#### 5.1.6.2 Einfluss von MZF1 auf SNP-abhängige VEGF-Promotoraktivität

Der MZF1 konnte in einigen Studien im Zusammenhang mit der Kanzerogenese sowie als Effektor der Genexpression beschrieben werden. Hiermit wurde der MZF1 bereits als ein Repressor von CD34- und *c-myc*-Promotoren charakterisiert<sup>200</sup>. In *in vitro* Studien wurde ein Einfluss des MZF1 auf die Migration sowie die Invasion beobachtet<sup>200</sup>. Zudem konnte eine MZF1-Überexpression in Zusammenhang mit einer induzierten Metastasierung beschrieben werden<sup>202</sup>. In Studien von Gaboli *et al.* (2001) wurde ein Zusammenhang mit der Proliferation sowie der Tumorgenese gezeigt<sup>98</sup>. Auf Grund dieser beobachteten Zusammenhänge in den u.a. von VEGF regulierten Prozessen wird Assoziation des MZF1 und der VEGF-Expression vermutet. Zur Untersuchung eines potenziellen Einflusses des MZF1 auf die VEGF-Expression wurden die Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T mit den Reporterkonstrukten des Promotor-SNPs +405 sowie MZF1-siRNA zum *knock down* des MZF1 kotransfiziert und auf mRNA- sowie Proteinebene untersucht. Nach Transfektion der A549 mit den Reporterkonstrukten des SNPs +405 C/G und *knock down* des MZF1 wurde keine Änderung der VEGF-Promotoraktivität gezeigt (Abbildung 50, A). Auf Proteinebene resultiert der *knock down* des MZF1 und die Transfektion des Reporterkonstrukts +405 C (*wt*) in einer erhöhten GFP-Proteinkonzentration (Abbildung 50, A). Entgegen dieser Vermutung wurde für die Zelllinie HNSCCUM-02T auf RNA-Ebene nach qRT-PCR eine Hemmung der VEGF-Promotoraktivität nach MZF1-*knock down* und Transfektion der Konstrukte +405 C und +405 G beobachtet. Die Ergebnisse der qRT-PCR konnten auf Proteinebene bestätigt werden wobei ebenfalls eine Hemmung nach MZF1-*knock down* gezeigt werden konnte. In Studien von Noll *et al.* (2008) konnte ein Zusammenhang des MZF1 mit der VEGF-

Regulation über den Zinkfingerfaktor ZNF24 gefunden werden. Der ZNF24 wiederum konnte als negativer Regulator der VEGF-Expression beschrieben werden<sup>199,203</sup>. In einem Luciferase-Assay nach Kotransfektion des VEGF-Promotors und ZNF24 wurde eine signifikante Hemmung der VEGF-Promotoraktivität beobachtet<sup>203</sup>. Nach *knock down* des ZNF24, wurde eine signifikant reduzierte Migration und Invasion gezeigt<sup>204</sup>. Zudem konnte ein Regulationsmechanismus über eine direkte Interaktion mit dem VEGF-Promotor identifiziert werden<sup>205</sup>. Das Verständnis des MZF1/ZNF24-Heterodimers scheint eine wichtige Rolle bei der Untersuchung der negativen VEGF-Regulation zu spielen<sup>199</sup>. Die Beobachtung einer reduzierten GFP-Proteinkonzentration nach MZF1-*knock down* in HNSCCUM-02T zeigt eine Beteiligung des MZF1 in der Regulation der VEGF-Promotoraktivität. In der Zelllinie A549 konnte für den MZF1 hingegen kein Zusammenhang hinsichtlich der VEGF-Regulation gezeigt werden.

Nach den Beobachtungen des zelllinienabhängigen Einflusses des MZF1 hinsichtlich dessen Zusammenhangs mit der VEGF-Promotoraktivität, wurde eine Assoziation mit der Noxe CSE untersucht. Die verwendeten Zelllinien wurden nach Kotransfektion der SNP-Promotorkonstrukte und MZF1-siRNA mit CSE inkubiert und die VEGF-Promotoraktivität sowie die -Translation analysiert. Im Gegensatz zur unveränderten VEGF-Promotoraktivität der Kontrolle konnte nach Inkubation der mit dem C-Allel transfizierten A549 Zellen sowie MZF1-*knock down* eine erhöhte Promotoraktivität beobachtet werden. In der Zelllinie HNSCCUM-02T hingegen konnte nach Inkubation mit 10 % CSE und Transfektion mit dem Reporterkonstrukt +405 G eine erhöhte Promotoraktivität gezeigt werden (Abbildung 50, B). Die Kotransfektion der Konstrukte mit MZF1-siRNA und anschließender Inkubation führt ebenfalls zu einer gesteigerten Promotoraktivität. Auf Proteinebene konnten diese Beobachtungen nicht bestätigt werden. In der Literatur konnten bislang keine Studien beschrieben werden die den Einfluss von CSE/Zigarettenrauch oder Verbindungen des Zigarettenrauchs hinsichtlich der MZF1-Regulation zeigen. Auch Studien des in der VEGF-Regulation mit dem MZF1 assoziierten ZNF24 konnten nicht identifiziert werden.

Der MZF1 wurde im Zusammenhang mit der Kanzerogenese beschrieben, wobei in OSCC-Patienten eine größere Tumorgöße mit einem Verlust der MZF1-Expression assoziiert wurde. Zusammenfassend zeigt die Untersuchung der SNP-abhängigen MZF1-Bindungsspezifität einen zelllinienabhängigen Unterschied zwischen den Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T. Ein zelllinienabhängiger Unterschied wurde zudem nach MZF1-*knock down* hinsichtlich der VEGF-Promotoraktivität beobachtet. Neben der Zelllinienabhängigkeit wurde in beiden untersuchten Zelllinien ein Zusammenhang der Bindungsspezifität und Promotoraktivität nach Inkubation mit CSE gezeigt. Die Beobachtungen im Rahmen dieser Studien zeigen eine MZF1-abhängige

VEGF-Regulation der Zelllinie HNSCCUM-02T, während ein solcher Zusammenhang in A549 Zellen nicht beobachtet werden konnte.

## 5.2 SNP-abhängige Regulation der mRNA-Stabilität

Neben der Regulation des VEGF-Gens auf transkriptioneller Ebene, konnten Levy *et al.* (1996) eine Regulation durch Variation der mRNA-Stabilität beschreiben<sup>40</sup>. Der SNP +936 C/T wird mit dem Auftreten und der Prognose unterschiedlicher Krankheiten assoziiert. Durch die Lokalisation des SNP +936 C/T in der 3'-UTR des VEGF-Gens wird ein Regulationsmechanismus durch Veränderung der mRNA-Stabilität vermutet. Die verwendeten Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T wurden im Folgenden mit den VEGF-Reporterkonstrukten der 3'-UTR *wt* und +936 transfiziert, bevor nach Inkubation mit CSE die mRNA-Stabilität analysiert wurde. In A549 Zellen wurde hierbei mittels qRT-PCR eine SNP-abhängige Halbwertszeit (HWZ) beobachtet, wobei in HNSCCUM-02T diese Beobachtung nicht bestätigt werden konnte. Auf Proteinebene konnten hingegen heterogene Beobachtungen gemacht werden, wobei der Zusammenhang auf Proteinebene weiter untersucht werden muss. Die in der Zelllinie A549 beobachtete geringere HWZ in Gegenwart des T-Allels, lässt eine erhöhte Plasmakonzentration vermuten. Renner *et al.* (2000) sowie Yapijakis *et al.* (2007) konnten jedoch für das +936 T-Allel ein geringeres VEGF-Plasmalevel beobachten<sup>85,102</sup>. Kämmerer *et al.* (2010) und Yapijakis *et al.* (2007) konnten ein häufigeres Auftreten des T-Allels in OSCC-Patienten zeigen<sup>67,102</sup>. Diese Beobachtungen wurden in einer Metaanalyse von Mandal *et al.* (2013) bestätigt<sup>103</sup>. In NSCLC wurde für Träger des SNPs +936 T-Allels ein verbessertes Überleben beobachtet<sup>206</sup>. Als ein potenzieller Mechanismus wird die Bindung zahlreicher RNA-Bindungsproteine (RBP) an die in der 3'-UTR lokalisierten AU-reichen Elemente postuliert, die die mRNA-Stabilität beeinflussen<sup>13,14,33,34,52,54,207,208</sup>. Claffey *et al.* (1998) konnten unter hypoxischen Bedingungen eine Zunahme der mRNA-Stabilität von 1,6 h auf 2,75 h beobachten<sup>52</sup>. Levy *et al.* (1996) beobachteten eine Zunahme der mRNA-HWZ bei Hypoxie von 0,7 h auf 1,7 h<sup>40</sup>. Unter hypoxischen Bedingungen wurde eine Stabilisierung der mRNA-Stabilität durch HuR<sup>208</sup>, PTB<sup>209</sup> sowie hnRNP L<sup>210</sup> gezeigt. Bei HuR handelt es sich um ein 36 kDa großes RBP, das über drei RNA-Erkennungssequenzen verfügt und an AU-reiche Elemente der 3'-UTR bindet<sup>211</sup>. Neben Faktoren, die die VEGF-mRNA stabilisieren, konnten auch Faktoren charakterisiert werden, die die 3'-UTR destabilisieren. Das Zinkfingerprotein TIS11b interagiert mit der 3'-UTR des VEGF-Gens und destabilisiert die mRNA, wobei die HWZ des VEGF sinkt<sup>44,225</sup>. Ein weiteres Protein, das mit der Destabilisierung der VEGF-3'-UTR assoziiert ist, ist Tristetraprolin (TTP), ein weiteres Mitglied der TIS11-Familie<sup>212</sup>.

Hierbei konnten Essafi-Benkhadir *et al.* (2007) eine Beteiligung anderer Sequenzen als ARE zeigen<sup>212</sup>.

Neben der Untersuchung des 3'-UTR-SNP-abhängigen Einflusses auf die mRNA-Stabilität, wurde der Zusammenhang mit CSE untersucht. Die Transfektion und Inkubation der Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T führt bei beiden Reporterkonstrukten (*wt* und +936) zur Abnahme der HWZ im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. Auf Proteinebene konnten konträre Ergebnisse des ELISAs und der Western Blot Analyse nach Inkubation mit 10 % CSE beobachtet werden. Die beobachtete mRNA-Stabilität nach Inkubation mit 10 % CSE lässt eine reduzierte Plasmakonzentration in Rauchern vermuten. In gesunden Probanden konnten Renner *et al.* (2000), wie bereits erwähnt, ein geringeres Plasmalevel in Gegenwart des +936 T-Allels zeigen, wobei diese Beobachtung unabhängig vom Raucherstatus der Probanden ist<sup>85</sup>. In der Literatur konnten keine mit dieser Arbeit vergleichbaren *in vitro* Studien identifiziert werden, die den Zusammenhang von CSE mit der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität bzw. der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität untersuchen. Mittels Computeranalyse konnte bei Vorhandensein des +936 T-Allels der Verlust der AP4 Bindungsstelle beobachtet werden, wobei bislang kein experimenteller Zusammenhang beobachtet wurde<sup>85,106,213</sup>. Im Rahmen des TF-Arrays wurde der AP4 hinsichtlich des Einflusses von CSE untersucht und zeigte eine Hemmung der Aktivität. Diese Beobachtung könnte einen potenziellen Mechanismus der gesenkten mRNA-Stabilität darstellen, wobei die stabilisierende Wirkung des AP4 durch dessen Hemmung nach Inkubation mit CSE reduziert wird. Ein SNP-abhängiger Einfluss des AP4 auf die mRNA-Stabilität auf Grund einer potenziellen Bindungsspezifität in Gegenwart des T-Allels muss daher untersucht werden. Neben dem Einfluss von stabilisierenden bzw. destabilisierenden Faktoren durch Wechselwirkung mit der 3'-UTR könnten auch miRNAs eine potenzielle Rolle im Regulationsmechanismus der mRNA-Stabilität spielen. In OSCC konnte hierbei eine erhöhte Plasmakonzentration für miRNA-31 beobachtet werden<sup>214</sup>. Zudem wurde bei oralen Tumoren eine veränderte Expression der miRNAs 21, 24, 125b und 100 gezeigt<sup>214</sup>. Unter den im Zusammenhang mit OSCC beschriebenen miRNAs wurden bei Rauchern erhöhte Expressionen der miRNAs 21 und 24 im Vergleich zu Nichtrauchern gezeigt<sup>215</sup>. Neben OSCC wurde auch ein verändertes miRNA-Expressionsmuster in Lungenkrebs beobachtet, wobei eine Überexpression u.a. für die miRNAs 21, 93 und 128b beobachtet werden konnte. Unter Rauchern konnte eine veränderte Expression für die miRNAs 21, 93 und 26a gezeigt werden<sup>215</sup>. Die Rolle der miRNAs in der Regulation der mRNA-Stabilität sowie deren Beeinflussung durch endogene Faktoren wie beispielsweise Zigarettenrauch könnte einen möglichen Mechanismus der Regulation darstellen. Eine weitere Komplexitätsstufe stellt die

Wechselwirkung der miRNAs mit Proteinen dar, die wiederum durch den Raucherstatus der Patienten ebenfalls beeinflusst werden könnte. Hua *et al.* (2006) und Arcondeguy *et al.* (2013) konnten, innerhalb der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten 3'-UTR-Sequenz, zahlreiche miRNA-Bindungsstellen identifizieren<sup>13,216</sup>. Ein möglicher regulatorischer Mechanismus der beobachteten CSE-abhängigen Regulation könnte daher im Zusammenhang mit miRNAs stehen. Diese Hypothese könnte zugleich den zelllinienabhängigen Beobachtungen erklären, wobei die Zelllinien unterschiedliche miRNA-Expressionsmuster aufweisen. Eine potenzielle miRNA- oder Proteinbindungsstelle am Locus des SNP +936 C/T konnte nicht identifiziert werden. Allgemein wurde nach den Beobachtungen der erhöhten VEGF-Plasmakonzentration in Gegenwart des 3'-UTR-SNP +936 T-Allels eine Erhöhung der mRNA-Stabilität vermutet. Im Rahmen dieser Studie wurde jedoch eine geringere mRNA-Stabilität nach Transfektion der Tumorzelllinien A549 und HNSCCUM-02T beobachtet. Die Beobachtung der durch CSE-beeinflussten mRNA-Stabilität in Abhängigkeit des 3'-UTR SNPs lässt zum einen die Interaktion von Verbindungen des Zigarettenrauchs mit stabilisierenden oder destabilisierenden RBP, ein verändertes miRNA-Expressionsmuster oder die Beeinflussung der Wechselwirkung dieser Verbindungen mit der RNA vermuten.



## 6 Fazit und Ausblick

Die Untersuchung des molekularen Mechanismus der SNP-abhängigen Regulation des VEGF-Gens sowie das Verständnis des Einflusses exogener Faktoren stellen eine wichtige Grundlage der Weiterentwicklung angiogener Therapien und für die Prognosestellung dar.

In Gegenwart des SNPs -460 konnte ein zelllinienabhängiger Einfluss nach Inkubation mit CSE gezeigt werden, wobei eine erhöhte VEGF-Promotoraktivität sowie eine erhöhte VEGF-Expression gezeigt werden konnten. Nach diesen Ergebnissen stellt die transkriptionelle Regulation in Gegenwart des SNP -460 T-Allels einen Mechanismus einer erhöhten VEGF-Expression und möglicherweise auch einer oftmals einhergehenden schlechteren Prognose dar.

Die Ergebnisse einer reduzierten VEGF-Promotoraktivität in Gegenwart des SNP -2578 C-Allels geht nicht mit der beobachteten erhöhten VEGF-Translation einher. Diese Ergebnisse schließen einen Einfluss des SNP -2578 in Abhängigkeit der VEGF-Promotoraktivität aus.

CSE-abhängige Unterschiede der Promotoraktivität wurden in Abhängigkeit der Haplotypen CTC und CCG gezeigt. Die Beobachtung der haplotypspezifischen Regulation der VEGF-Promotoraktivität macht eine Untersuchung der Prognose und Therapie in Abhängigkeit des Haplotyps nötig.

Hinsichtlich des Einflusses des SNPs +405 konnten zelllinienabhängige Änderungen der Promotoraktivität und der VEGF-Translation beobachtet werden, wobei in der Literatur ein Zusammenhang des SNPs +405 mit dem Transkriptionsfaktor (TF) MZF1 postuliert wird. Neben der zelllinienabhängigen Bindungsspezifität des MZF1 an den VEGF-Promotor in Gegenwart des SNPs +405, wurde weiter ein Zusammenhang mit der VEGF-Promotoraktivität in Abhängigkeit der Zelllinie und der Inkubation mit CSE beobachtet. Es kann somit ein MZF1-abhängiger Mechanismus der VEGF-Regulation in Abhängigkeit des Raucherstatus der Patienten und des Tumors gezeigt werden. Der MZF1 stellt somit einen möglichen Angriffspunkt der anti-Angiogenesetherapie dar, durch dessen Hemmung die VEGF-induzierte Angiogenese beeinflusst werden könnte. Neben einer Regulation auf transkriptioneller Ebene wurde eine SNP- und zelllinienabhängige Veränderung der mRNA-Stabilität in Abhängigkeit des SNPs +936 C/T-Allel gezeigt. Zukünftig sollte die *in vitro* beobachtete SNP-spezifische mRNA-Stabilität *in vivo* näher untersucht werden, um ein prognostische Relevanz dieses SNPs hinsichtlich einer VEGF-Überexpression und einem damit möglicherweise verbundenen schlechteren Krankheitsverlauf zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde *in vitro* eine Assoziation der SNP- und CSE-abhängigen VEGF-Promotoraktivität bzw. VEGF-mRNA-Stabilität in Gegenwart der SNPs -460 C/T und +936 C/T gezeigt. Da *in vivo* ein potenzieller Zusammenhang des SNPs -460 C/T und dem Raucherstatus der Patienten sowie dem SNP +936 C/T mit der Krebsentstehung beobachtet werden konnte, könnten die Beobachtungen in einem ursächlichen Zusammenhang mit den SNPs stehen. Entgegen dieser Beobachtung konnte für die Promotor-SNPs -2578 A/C und +405 C/G keine CSE-abhängige Regulation der VEGF-Promotoraktivität gezeigt werden, wobei die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten *in vitro* Daten gegen eine Relevanz dieser SNPs in der Tumorgenese sprechen. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der SNPs -460 C/T und +936 C/T dieser Arbeit die Daten epidemiologischer Studien einer Assoziation mit dem Auftreten von Tumoren.



## 7 Referenzen

1. Kaatsch, P., Spix, C., Hentschel, S., Katalinic, A., Luttmann, S. und Stegmaier, C. *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010*. 10th ed. (Robert Koch-Institut, Berlin, 2015).
2. Kaatsch, P., Spix, C., Hentschel, S., Katalinic, A., Luttmann, S. und Stegmaier, C. *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9th ed. (Robert Koch-Institut, Berlin, 2013).
3. Lord Akryl. Conducting passages of the human respiratory system. unter: <http://cancer.gov>. (Datum: 26.04.2016).
4. Bühling, K. J., Lepenies, J. und Witt, K. *Intensivkurs: Allgemeine und Spezielle Pathologie*. 4th ed. (Urban & Fischer in Elsevier, München, 2008).
5. Bubendorf, L., Feichter, G., Klöppel, G. und Remmele, W. *Pathologie. Ein Lehr- und Nachschlagebuch*. 3rd ed. (Springer, Berlin, 2011).
6. Kabat, G. C. und Wynder, E. L. Lung cancer in nonsmokers. *Cancer* **53**, 1214–1221 (1984).
7. Boyle, P. und Levin, B. *World Cancer Report* (IARC Press, Lyon, 2008).
8. Krams, M. und Frahm, S. O. *Kurzlehrbuch Pathologie*. 2nd ed. (Thieme, Stuttgart, 2013).
9. Nennstiel, S. *Basics allgemeine Pathologie*. 2nd ed. (Elsevier, Urban & Fischer, München, 2013).
10. Aggarwal, S., Devaraja, K., Sharma, S. C. und Das, S. N. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with oral squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Clin Chim Acta* **436**, 35–40 (2014).
11. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. und Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**, 69–90 (2011).
12. Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C. und Williams, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* **133**, 275–288 (1971).
13. Arcondeguy, T., Lacazette, E., Millevoi, S., Prats, H. und Touriol, C. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation

- of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res*, 1–14 (2013).
14. Supic, G., Jovic, N., Zeljic, K., Kozomara, R. und Magic, Z. Association of VEGF-A genetic polymorphisms with cancer risk and survival in advanced-stage oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* **48**, 1171–1177 (2012).
  15. Jousen, A., Kirchhof, B. und Gottstein, C. Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. *Der Ophthalmologe* **100**, 284–291 (2003).
  16. Kristensen, T., Knutsson, M., Wehland, M., Laursen, B., Grimm, D., Warnke, E. und Magnusson, N. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Breast Cancer. *IJMS* **15**, 23024–23041 (2014).
  17. Chang, S.-H. und Hla, T. Gene regulation by RNA binding proteins and microRNAs in angiogenesis. *Trends Mol Med* **17**, 650–658 (2011).
  18. Patan, S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neuro-Oncol* **50**, 1–15 (2000).
  19. unter: [http://www.uniklinik-duesseldorf.de/fileadmin/Datenpool/einrichtungen/institut\\_fuer\\_molekulare\\_medicin\\_id55/dateien/mol\\_ther\\_vorlesung\\_2007.pdf](http://www.uniklinik-duesseldorf.de/fileadmin/Datenpool/einrichtungen/institut_fuer_molekulare_medicin_id55/dateien/mol_ther_vorlesung_2007.pdf). (Datum: 21.04.2016).
  20. Jaffe, E. A. *Biology of endothelial cells*. 1st ed. (Nijhoff, Boston, 1984).
  21. Adams, R. H. und Alitalo, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 464–478 (2007).
  22. Otrrock, Z., Mahfouz, R., Makarem, J. und Shamseddine, A. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cell Mol Dis* **39**, 212–220 (2007).
  23. Jain, L., Vargo, C. A., Danesi, R., Sissung, T. M., Price, D. K., Venzon, D. und Venitz, J. *et al.* The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther* **8**, 2496–2508 (2009).

24. Johnstone, S. und Logan, R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Max Surg* **36**, 263–266 (2007).
25. Mărgăritescu, C., Pirici, D., Stîngă, A., Simionescu, C., Raica, M., Mogoantă, L. und Stepan, A. *et al.* VEGF expression and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical and morphometric study. *Clin Exp Med* **10**, 209–214 (2010).
26. Wobser, M., Siedel, C., Kneitz, H., Broecker, E., Goebeler, M., Houben, R. und Geissinger, E. Microvessel Density and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors in Different Subtypes of Primary Cutaneous B-cell Lymphoma. *Acta Derm Venerol* **93**, 656–662 (2013).
27. Ferrara, N. und Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* **18**, 4–25 (1997).
28. Ferrara, N. und Henzel, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Co* **425**, 540–547 (2012).
29. Lohela, M., Bry, M., Tammela, T. und Alitalo, K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 154–165 (2009).
30. Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T. und De Bruijn, E. A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* **56**, 549–580 (2004).
31. Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M. und Persico, M. G. Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene to Human Chromosome 6p21.3. *Circulation* **93**, 1493–1495 (1996).
32. Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C. und Abraham, J. A. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* **266**, 11947–11954 (1991).

33. Bastide, A., Karaa, Z., Bornes, S., Hieblot, C., Lacazette, E., Prats, H. und Touriol, C. An upstream open reading frame within an IRES controls expression of a specific VEGF-A isoform. *Nucleic Acids Res* **36**, 2434–2445 (2008).
34. Harper, S. J. und Bates, D. O. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* **8**, 880–887 (2008).
35. Bates, D. O., Cui, T.-G., Doughty, J. M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J. D. und Peat, D. *et al.* VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* **62**, 4123–4131 (2002).
36. Akiri, G., Nahari, D., Finkelstein, Y., Le, S. Y., Elroy-Stein, O. und Levi, B. Z. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* **17**, 227–236 (1998).
37. Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D. und Semenza, G. L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16**, 4604–4613 (1996).
38. Agrawal, P., Hatzakis, E., Guo, K., Carver, M. und Yang, D. Solution structure of the major G-quadruplex formed in the human VEGF promoter in K<sup>+</sup>: insights into loop interactions of the parallel G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res* **41**, 10584–10592 (2013).
39. Levy, N. S., Goldberg, M. A. und Levy, A. P. Sequencing of the human vascular endothelial growth factor (VEGF) 3' untranslated region (UTR): conservation of five hypoxia-inducible RNA-protein binding sites. *Biochim Biophys Acta* **1352**, 167–173 (1997).
40. Levy, A., Levy, N. und Goldberg, M. Post-transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Hypoxia. *J Biol Chem* **271**, 2746–2753 (1996).
41. Dibbens, J. A., Miller, D. L., Damert, A., Risau, W., Vadas, M. A. und Goodall, G. J. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements. *Mol Biol Cell* **10**, 907–919 (1999).

42. Watson, C. J., Webb, N. J., Bottomley, M. J., Brenchley, P. und Brenchley, E. Identification of polymorphisms within the Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* **12**, 1232–1235 (2000).
43. Stein, I., Itin, A., Einat, P., Skaliter, R., Grossman, Z. und Keshet, E. Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol* **18**, 3112–3119 (1998).
44. Ciaïa, D., Cherradi, N., Bailly, S., Grenier, E., Berra, E., Pouyssegur, J. und LaMarre, J. *et al.* Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b. *Oncogene* **23**, 8673–8680 (2004).
45. Pagès, G. und Pouyssegur, J. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene—a concert of activating factors. *Cardiovas Res* **65**, 564–573 (2005).
46. Shih, S.-C. und Claffey, K. P. Role of AP-1 and HIF-1 Transcription Factors in TGF- $\beta$  Activation of VEGF Expression. *Growth Factors* **19**, 19–34 (2001).
47. Shi, Q., Le, X., Abbruzzese, J. L., Peng, Z., Qian, C. N., Tang, H. und Xiong, Q. *et al.* Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **61**, 4143–4154 (2001).
48. Churchill, A. J., Carter, J. G., Lovell, H. C., Ramsden, C., Turner, S. J., Yeung, A. und Escardo, J. *et al.* VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* **15**, 2955–2961 (2006).
49. Bae, W.-Y., Choi, J.-S., Kim, J.-E. und Jeong, J.-W. Cinnamic aldehyde suppresses hypoxia-induced angiogenesis via inhibition of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression during tumor progression. *Biochem Pharmacol* **98**, 41–50 (2015).
50. Safe, S. und Abdelrahim, M. Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* **41**, 2438–2448 (2005).
51. Abdelrahim, M., Smith, R., Burghardt, R. und Safe, S. Role of Sp proteins in regulation of vascular endothelial growth factor expression and proliferation of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* **64**, 6740–6749 (2004).

52. Claffey, K. P., Shih, S.-C., Mullen, A., Dziennis, S., Cusick, J. L., Abrams, K. R. und Lee, S. W. *et al.* Identification of a Human VPF/VEGF 3' Untranslated Region Mediating Hypoxia-induced mRNA Stability. *Mol Biol Cell* **9**, 469–481 (1998).
53. Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J. und Di Padova, F. *et al.* Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* **120**, 623–634 (2005).
54. Eberhardt, W., Doller, A., Akool, E.-S. und Pfeilschifter, J. Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Therapeut* **114**, 56–73 (2007).
55. Vempati, P., Popel, A. S. und Mac Gabhann, F. Formation of VEGF isoform-specific spatial distributions governing angiogenesis: computational analysis. *BMC Syst Biol* **5**, 59 (2011).
56. Miller, D. L., Dibbens, J. A., Damert, A., Risau, W., Vadas, M. A. und Goodall, G. J. The vascular endothelial growth factor mRNA contains an internal ribosome entry site. *FEBS Lett* **434**, 417–420 (1998).
57. Huez, I., Créancier, L., Audigier, S., Gensac, M. C., Prats, A. C. und Prats, H. Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Cell Biol* **18**, 6178–6190 (1998).
58. Bergers, G. und Hanahan, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* **8**, 592–603 (2008).
59. Christopoulos, A., Ahn, S. M., Klein, J. D., Kim, S. und Myers, J. N. Biology of vascular endothelial growth factor and its receptors in head and neck cancer: Beyond angiogenesis. *Head Neck* **33**, 1220–1229 (2011).
60. Di Lauro, R., de Ruggiero, P., Di Lauro, R., Di Lauro, M. T. und Romano, M. R. Intravitreal bevacizumab for surgical treatment of severe proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **248**, 785–791 (2010).
61. Vassilakopoulou, M., Psyrris, A. und Argiris, A. Targeting angiogenesis in head and neck cancer. *Oral Oncol* **51**, 409–415 (2015).

62. Roy, S., Narang, B., Rastogi, S. und Rawal, R. A Novel Multiple Tyrosine-kinase Targeted Agent to Explore the Future Perspectives of Anti-Angiogenic Therapy for the Treatment of Multiple Solid Tumors: Cabozantinib. *ACAMC* **15**, 37–47 (2014).
63. Lauro, S., Onesti, C. E., Righini, R. und Marchetti, P. The use of bevacizumab in non-small cell lung cancer: an update. *Anticancer Res* **34**, 1537–1545 (2014).
64. Chen, Y.-J., Chang, J. T.-C., Liao, C.-T., Wang, H.-M., Yen, T.-C., Chiu, C.-C. und Lu, Y.-C. *et al.* Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer Science* **99**, 1507–1514 (2008).
65. Resende, C., Ristimäki, A. und Machado, J. C. Genetic and Epigenetic Alteration in Gastric Carcinogenesis. *Helicobacter* **15**, 34–39 (2010).
66. Jin, Q., Hemminki, K., Enquist, K., Lenner, P., Grzybowska, E., Klaes, R. und Hendriksson, R. *et al.* Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. *Clin Cancer Res* **11**, 3647–3663 (2005).
67. Kämmerer, P. W., Toyoshima, T., Eletr, S., Kämmerer, P., Kuhr, K., Al-Nawas, B. und Brieger, J. Single nucleotide polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene associated with incidence of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **39**, 786–792 (2010).
68. Koukourakis, M. I., Papazoglou, D., Giatromanolaki, A., Bougioukas, G., Maltezos, E. und Siviridis, E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **46**, 293–298 (2004).
69. Tzanakis, N., Gazouli, M., Rallis, G., Giannopoulos, G., Papaconstantinou, I., Theodoropoulos, G. und Pikoulis, E. *et al.* Vascular endothelial growth factor polymorphisms in gastric cancer development, prognosis, and survival. *J Surg Oncol* **94**, 624–630 (2006).

70. McCarron, S., Edwards, S., Evans, P. R., Gibbs, R., Dearnaley, D. P. und Dowe, A. Influence of Cytokine Gene Polymorphisms on the Development of Prostate Cancer. *Cancer Res* **62**, 3369–3372 (2002).
71. Kataoka, N., Cai, Q., Wen, W., Shu, X.-O., Jin, F., Gao, Y.-T. und Zheng, W. Population-Based Case-Control Study of VEGF Gene Polymorphisms and Breast Cancer Risk among Chinese Women. *Cancer Epidem Biomar* **15**, 1148–1152 (2006).
72. Egleton, R. D., Brown, K. C. und Dasgupta, P. Angiogenic activity of nicotinic acetylcholine receptors: Implications in tobacco-related vascular diseases. *Pharmacol Therapeut* **121**, 205–223 (2009).
73. *Tobacco smoke and involuntary smoking / IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* (IARC Press, Lyon, 2004).
74. Müller, T. und Hengstermann, A. Nrf2: Friend and Foe in Preventing Cigarette Smoking-Dependent Lung Disease. *Chem Res Toxicol* **25**, 1805–1824 (2012).
75. Sdralia, N. D., Patmanidi, A. L., Velentzas, A. D., Margaritis, L. H., Baltatzis, G. E., Hatzinikolaou, D. G. und Stavridou, A. The mode of lymphoblastoid cell death in response to gas phase cigarette smoke is dose-dependent. *Respir Res* **10**, 82 (2009).
76. Das, A., Bhattacharya, A. und Chakrabarti, G. Cigarette smoke extract induces disruption of structure and function of tubulin-microtubule in lung epithelium cells and in vitro. *Chem Res Toxicol* **22**, 446–459 (2009).
77. Moserová, M., Kotrbová, V., Aimová, D., Sulc, M., Frei, E. und Stiborová, M. Analysis of benzo[a]pyrene metabolites formed by rat hepatic microsomes using high pressure liquid chromatography: optimization of the method. *Interdiscip toxicol* **2**, 239–244 (2009).
78. Bernhard, D. Cigarette smoke metal-catalyzed protein oxidation leads to vascular endothelial cell contraction by depolymerization of microtubules. *The FASEB J* **19**, 1096–1107 (2005).
79. Warren, G. und Singh, A. Nicotine and lung cancer. *J Carcinog* **12**, 1 (2013).



80. Nennstiel, S. *Basics allgemeine Pathologie*. 2nd ed. (Elsevier, Urban & Fischer, München, 2013).
81. Homann, N., Tillonen, J., Meurman, J. H., Rintamäki, H., Lindqvist, C., Rautio, M. und Jousimies-Somer, H. *et al.* Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis* **21**, 663–668 (2000).
82. Morita, M., Kumashiro, R., Kubo, N., Nakashima, Y., Yoshida, R., Yoshinaga, K. und Saeki, H. *et al.* Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: epidemiology, clinical findings, and prevention. *Int J Clin Oncol* **15**, 126–134 (2010).
83. Borase, A. P., Ganvir, S. M., Hazarey, V. K., Gosavi, S. R., Mohatta, A. A. und Singh, J. Estimation of vascular endothelial growth factor gene -460 C/T polymorphism as a biomarker in oral squamous cell carcinoma patients from the Indian subcontinent. *J Investig Clin Dent* **5**, 1–6 (2014).
84. Balasubramanian, S. P., Brown, N. J. und Reed, M. W. R. Role of genetic polymorphisms in tumour angiogenesis. *Br J Cancer* **87**, 1057–1065 (2002).
85. Renner, W., Kotschan, S., Hoffmann, C., Obermayer-Pietsch, B. und Pilger, E. A Common 936 C/T Mutation in the Gene for Vascular Endothelial Growth Factor Is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor Plasma Levels. *J Vasc Res* **37**, 443–448 (2000).
86. Ponomarenko, J. V., Orlova, G. V., Merkulova, T. I., Gorshkova, E. V., Fokin, O. N., Vasiliev, G. V. und Frolov, A. S. *et al.* rSNP\_Guide: an integrated database-tools system for studying SNPs and site-directed mutations in transcription factor binding sites. *Hum Mutat* **20**, 239–248 (2002).
87. Buroker, N. E., Ning, X., Zhou, Z., Li, K., Cen, W., Wu, X. und Zhu, W. *et al.* SNPs and TFBS Associated with High Altitude Sickness. *OJBD* **03**, 85–93 (2013).
88. Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Howells, K., Phillips, A. D., Thomas, N. S. T. und Cooper, D. N. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Med* **1**, 13 (2009).

89. Wray, G. A. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nat Rev Genet* **8**, 206–216 (2007).
90. Buroker, N. E., Ning, X.-H., Zhou, Z.-N., Li, K., Cen, W.-J., Wu, X.-F. und Zhu, W.-Z. *et al.* VEGFA SNPs and transcriptional factor binding sites associated with high altitude sickness in Han and Tibetan Chinese at the Qinghai-Tibetan Plateau. *J Physiol Sci* **63**, 183–193 (2013).
91. Schneider, B. P., Wang, M., Radovich, M., Sledge, G. W., Badve, S., Thor, A. und Flockhart, D. A. *et al.* Association of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Genetic Polymorphisms With Outcome in a Trial of Paclitaxel Compared With Paclitaxel Plus Bevacizumab in Advanced Breast Cancer: ECOG 2100. *J Clin Oncol* **26**, 4672–4678 (2008).
92. Lin, L., Cao, K., Chen, W., Pan, X., Zhao, H. und Ahmad, S. Four Common Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms (-2578C>A, -460C>T, +936C>T, and +405G>C) in Susceptibility to Lung Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* **8**, e75123 (2013).
93. Brogan, I. J., Khan, N., Isaac, K., Hutchinson, J. A., Pravica, V. und Hutchinson, I. V. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol* **60**, 1245–1249 (1999).
94. Maeda, A. Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on non-small cell lung cancer tumor angiogenesis. *Oncol Rep*, 39–44 (2013).
95. Ku, K.-T., Wan, L., Peng, H.-C., Tsai, M.-H., Tsai, C.-H. und Tsai, F.-J. Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for oral cancer. *Oral Oncol* **41**, 497–502 (2005).
96. Zhai, R., Liu, G., Asomaning, K., Su, L., Kulke, M. H., Heist, R. S. und Nishioka, N. S. *et al.* Genetic polymorphisms of VEGF, interactions with cigarette smoking exposure and esophageal adenocarcinoma risk. *Carcinogenesis* **29**, 2330–2334 (2008).
97. Kämmerer, P. W., Koch, F. P., Schiegnitz, E., Kumar, V. V., Berres, M., Toyoshima, T. und Al-Nawas, B. *et al.* Associations between single-nucleotide

- polymorphisms of the VEGF gene and long-term prognosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **42**, 374–381 (2013).
98. Gaboli, M. Mzf1 controls cell proliferation and tumorigenesis. *Gene Dev* **15**, 1625–1630 (2001).
99. Metzger, C. S., Koutsimpelas, D. und Brieger, J. Transcriptional regulation of the VEGF gene in dependence of individual genomic variations. *Cytokine* **76**, 519–526 (2015).
100. Bae, S. J., Ahn, D. H., Hong, S. P., Kang, H., Hwang, S. G., Oh, D. und Kim, N. K. Gender-specific association between polymorphism of vascular endothelial growth factor (VEGF 936 C>T) gene and patients with stomach cancer. *Yonsei Med J* **49**, 783–791 (2008).
101. Lin, Y.-C., Yeh, C.-J., Wang, L.-H., Lee, C.-W. und Chen, C.-H. The effect of CCND1 +870AG and VEGF +936CT polymorphisms on oral cancer development and disease-free survival in a Taiwan population. *Oral Oncol* **48**, 535–540 (2012).
102. Yapijakis, C., Vairaktaris, E., Vassiliou, S., Vylliotis, A., Nkenke, E., Nixon, A. M. und Derka, S. *et al.* The low VEGF production allele of the +936C/T polymorphism is strongly associated with increased risk for oral cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **133**, 787–791 (2007).
103. Mandal, R. K., Yadav, S. S., Panda, A. K. und Khattri, S. Vascular endothelial growth factor 936 C>T polymorphism increased oral cancer risk: evidence from a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers* **17**, 543–547 (2013).
104. Krippel, P., Langsenlehner, U., Renner, W., Yazdani-Biuki, B., Wolf, G., Wascher, T. C. und Paulweber, B. *et al.* A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer* **106**, 468–471 (2003).
105. Cheng, C.-Y., Chang, C.-S., Liu, C.-J. und Kao, S.-Y. Vascular endothelial growth factor 936 C/T polymorphism is associated with vascular invasion in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med O* **106**, 79–84 (2008).

106. Wróbel, T., Mazur, G., Dziętczenia, J., Gebura, K., Kuliczkowski, K. und Bogunia-Kubik, K. VEGF and bFGF gene polymorphisms in Polish patients with B-CLL. *Med Oncol* **30**, 456 (2013).
107. Welkoborsky, H.-J., Jacob, R., Riazimand, S. H., Bernauer, H. S. und Mann, W. J. Molecular Biologic Characteristics of Seven New Cell Lines of Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck and Comparison to Fresh Tumor Tissue. *Oncology* **65**, 60–71 (2003).
108. pGlow TOPO® TA Expression Kit. unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K483001>. (Datum: 21.01.2016).
109. pCas-Guide-EF1a-GFP. unter: <http://www.origene.com/CRISPR-CAS9/Detail.aspx?sku=GE100018>. (Datum: 26.01.2016).
110. Gebäck, T., Schulz, M. M. P., Koumoutsakos, P. und Detmar, M. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *BioTechniques* **46**, 265–274 (2009).
111. GeneRuler™ and O'GeneRuler™ DNA Ladders. unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-nucleic-acid-electrophoresis-purification/dna-electrophoresis-thermo-scientific/dna-ladders-thermo-scientific/generuler-dna-ladders.html>. (Datum: 21.04.2016).
112. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T. und Mullis, K. B. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491 (1988).
113. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**, 263–273 (1986).
114. Radovich, M., Hancock, B. A., Kassem, N., Mi, D., Skaar, T. C. und Schneider, B. P. Resequencing of the vascular endothelial growth factor promoter reveals haplotype structure and functional diversity. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **13**, 211–218 (2010).

115. Makarova, K. S., Aravind, L., Wolf, Y. I. und Koonin, E. V. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biology direct* **6**, 38 (2011).
116. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. und Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U.S.A. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)* **109**, E2579-86 (2012).
117. Hermanns, V. Untersuchungen zur Funktion des CRISPR/Cas Systems von *E. coli*: Isolierung und Charakterisierung spezifischer Komponenten des Cascade-Komplexes und Aufbau eines Systems zur Spacer Integration. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität. Düsseldorf, 2014.
118. CRISPR/Cas9. unter: [http://pnabio.com/products/CRISPR\\_Cas9.htm](http://pnabio.com/products/CRISPR_Cas9.htm). (Datum: 21.04.2016).
119. A Cartoon Showing Biodegradation of PolyJet™ DNA Transfection Reagent After Endocytosis of Transfection Complex. unter: <http://signagen.com/In-Vitro-DNA-Transfection-Reagents/SL100688/PolyJet-DNA-In-Vitro-Transfection-Reagent>. (Datum: 21.04.2016).
120. Su, Y., Han, W., Giraldo, C., De Li, Y. und Block, E. R. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**, 819–825 (1998).
121. Kim, D., Kwon, E., Hong, G., Lee, Y., Lee, S.-H. und Ro, J. Cigarette smoke exacerbates mouse allergic asthma through Smad proteins expressed in mast cells. *Respir Res* **12**, 49 (2011).
122. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. und Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267**, 5421–5426 (2000).
123. Yikrazuul. Reduktion von Resazurin zu Resorufin in lebenden Zellen. unter: <https://de.wikipedia.org/wiki/Resazurin>. (Datum: 21.04.2016).
124. Gillies, R. J., Didier, N. und Denton, M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* **159**, 109–113 (1986).

125. Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M. und Dolznig, H. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res* **752**, 10–24 (2013).
126. Boyden, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* **115**, 453–466 (1962).
127. Benno, R. *Mikroskopische Techniken*. 17th ed. (Urban & Fischer, München, 2001).
128. abcam. GFP SimpleStep ELISA® Kit. unter:  
[http://www.abcam.com/ps/products/171/ab171581/documents/ab171581\\_GFP\\_12%20Oct%2015%20%28website%29.pdf](http://www.abcam.com/ps/products/171/ab171581/documents/ab171581_GFP_12%20Oct%2015%20%28website%29.pdf). (Datum: 19.01.2016).
129. Dahl, J. A. und Collas, P. A rapid micro chromatin immunoprecipitation assay (ChIP). *Nat Protoc* **3**, 1032–1045 (2008).
130. Mohammadi, M., Bazrafshani, M. R. und Day, P. Vascular Endothelial Growth Factor Production is Regulated by Gene Polymorphisms. *Iran J Immunol* **6**, 119–129 (2009).
131. Shahbazi, M., Fryer, A. A., Pravica, V., Brogan, I. J., Ramsay, H. M., Hutchinson, I. V. und Harden, P. N. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* **13**, 260–264 (2002).
132. Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S. und Goldberg, M. A. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* **270**, 13333–13340 (1995).
133. Nasr, H. B., Chahed, K., Bouaouina, N. und Chouchane, L. Functional vascular endothelial growth factor -2578 C/A polymorphism in relation to nasopharyngeal carcinoma risk and tumor progression. *Clin Chim Acta* **395**, 124–129 (2008).
134. Minami, T., Murakami, T., Horiuchi, K., Miura, M., Noguchi, T., Miyazaki, J.-i. und Hamakubo, T. *et al.* Interaction between hex and GATA transcription factors in vascular endothelial cells inhibits flk-1/KDR-mediated vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem* **279**, 20626–20635 (2004).

135. Hansen, T. F., Spindler, K.-L. G., Lorentzen, K. A., Olsen, D. A., Andersen, R. F., Lindebjerg, J. und Brandslund, I. *et al.* The importance of -460 C/T and +405 G/C single nucleotide polymorphisms to the function of vascular endothelial growth factor A in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **136**, 751–758 (2010).
136. Kato, K., Hara, A., Kuno, T., Mori, H., Yamashita, T., Toida, M. und Shibata, T. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol* **132**, 735–743 (2006).
137. Ping, S.-Y., Shen, K.-H. und Yu, D.-S. Epigenetic regulation of vascular endothelial growth factor a dynamic expression in transitional cell carcinoma. *Mol Carcinog* **52**, 568–579 (2013).
138. Lu, Y., Wang, J., Yan, J., Yang, Y., Sun, Y., Huang, Y. und Hu, R. *et al.* Sevoflurane attenuate hypoxia-induced VEGF level in tongue squamous cell carcinoma cell by upregulating the DNA methylation states of the promoter region. *Biomed Pharmacother* **71**, 139–145 (2015).
139. Suzuki, M., Shinohara, F. und Rikiishi, H. Zebularine-induced reduction in VEGF secretion by HIF-1 $\alpha$  degradation in oral squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* **1**, 465–471 (2008).
140. Prior, S. J., Hagberg, J. M., Paton, C. M., Douglass, L. W., Brown, M. D., McLenithan, J. C. und Roth, S. M. DNA sequence variation in the promoter region of the VEGF gene impacts VEGF gene expression and maximal oxygen consumption. *AM J Physiol-Heart C* **290**, H1848 (2006).
141. Awata, T., Kurihara, S., Takata, N., Neda, T., Iizuka, H., Ohkubo, T. und Osaki, M. *et al.* Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. *Biochem Bioph Res Co* **333**, 679–685 (2005).
142. Chen, Y., Dawes, P. T. und Matthey, D. L. Polymorphism in the vascular endothelial growth factor A (VEGFA) gene is associated with serum VEGF-A level and disease activity in rheumatoid arthritis: Differential effect of cigarette smoking. *Cytokine* **58**, 390–397 (2012).

143. Stevens, A., Soden, J., Brenchley, P. E., Ralph, S. und Ray, D. W. Haplotype Analysis of the Polymorphic Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene Promoter. *Cancer Res* **63**, 812–816 (2003).
144. Jacobs, E. J., Feigelson, H., Bain, E. B., Brady, K. A., Rodriguez, C., Stevens, V. L. und Patel, A. V. *et al.* Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer in the Cancer Prevention Study II cohort. *Breast Cancer Res* **8**, R22 (2006).
145. Lambrechts, D., Storkebaum, E., Morimoto, M., Del-Favero, J., Desmet, F., Marklund, S. L. und Wyns, S. *et al.* VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* **34**, 383–394 (2003).
146. Chen, Y., Dawes, P. T., Packham, J. C. und Matthey, D. L. Interaction Between Smoking and Polymorphism in the Promoter Region of the VEGFA Gene Is Associated with Ischemic Heart Disease and Myocardial Infarction in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* **38**, 802–809 (2011).
147. Uribe, D. J., Guo, K., Shin, Y.-J. und Sun, D. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K and Nucleolin as Transcriptional Activators of the Vascular Endothelial Growth Factor Promoter through Interaction with Secondary DNA Structures. *Biochemistry* **50**, 3796–3806 (2011).
148. Sun, D., Liu, W.-J., Guo, K., Rusche, J. J., Ebbinghaus, S., Gokhale, V. und Hurley, L. The proximal promoter region of the human vascular endothelial growth factor gene has a G-quadruplex structure that can be targeted by G-quadruplex-interactive agents. *Mol Cancer Ther* **7**, 880–889 (2008).
149. Wu, Y., Zan, L.-P., Wang, X.-D., Lu, Y.-J., Ou, T.-M., Lin, J. und Huang, Z.-S. *et al.* Stabilization of VEGF G-quadruplex and inhibition of angiogenesis by quindoline derivatives. *BBA-Gen Subjects* **1840**, 2970–2977 (2014).
150. Counts, M., Morton, M., Laffoon, S., Cox, R. und Lipowicz, P. Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes smoked with three machine-smoking conditions. *Regul Toxicol Pharm* **41**, 185–227 (2005).



151. Clark, D. W., Phang, T., Edwards, M. G., Geraci, M. W. und Gillespie, M. N. Promoter G-quadruplex sequences are targets for base oxidation and strand cleavage during hypoxia-induced transcription. *Free Radical Bio Med* **53**, 51–59 (2012).
152. Shi, D., Guo, W., Chen, W., Fu, L., Wang, J., Tian, Y. und Xiao, X. *et al.* Nicotine Promotes Proliferation of Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Regulating  $\alpha$ 7AChR, ERK, HIF-1 $\alpha$  and VEGF/PEDF Signaling. *PLoS ONE* **7**, e43898 (2012).
153. Shin, V. Y., Wu, W. K., Chu, K.-M., Wong, H. P., Lam, E. K., Tai, E. K. und Koo, M. W. *et al.* Nicotine induces cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 in association with tumor-associated invasion and angiogenesis in gastric cancer. *Mol Cancer Res* **3**, 607–615 (2005).
154. Silva, D., Cáceres, M., Arancibia, R., Martínez, C., Martínez, J. und Smith, P. C. Effects of cigarette smoke and nicotine on cell viability, migration and myofibroblastic differentiation. *J Periodontal Res* **47**, 599–607 (2012).
155. Chernyavsky, A. I., Shchepotin, I. B. und Grando, S. A. Mechanisms of growth-promoting and tumor-protecting effects of epithelial nicotinic acetylcholine receptors. *Int Immunopharmacol* **29**, 36–44 (2015).
156. Yamadori, T., Ishii, Y., Homma, S., Morishima, Y., Kurishima, K., Itoh, K. und Yamamoto, M. *et al.* Molecular mechanisms for the regulation of Nrf2-mediated cell proliferation in non-small-cell lung cancers. *Oncogene* **31**, 4768–4777 (2012).
157. Kaushik, G., Kaushik, T., Khanduja, S., Pathak, C. M. und Khanduja, K. L. Cigarette smoke condensate promotes cell proliferation through disturbance in cellular redox homeostasis of transformed lung epithelial type-II cells. *Cancer Lett* **270**, 120–131 (2008).
158. Shin, V. Y. und Cho, C.-H. Nicotine and gastric cancer. *Alcohol* **35**, 259–264 (2005).
159. Puliappadamba, V. T., Cheriyan, V. T., Thulasidasan, A. K., Bava, S. V., Vinod, B. S., Prabhu, P. R. und Varghese, R. *et al.* Nicotine-induced survival

- signaling in lung cancer cells is dependent on their p53 status while its down-regulation by curcumin is independent. *Mol Cancer* **9**, 220 (2010).
160. Abrams, J. A., Lee, P. C., Port, J. L., Altorki, N. K. und Neugut, A. I. Cigarette smoking and risk of lung metastasis from esophageal cancer. *Cancer Epidem Biomar* **17**, 2707–2713 (2008).
  161. Seyfried, T. N. und Huysentruyt, L. C. On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncogenesis* **18**, 43–73 (2013).
  162. Yasui, W., Oue, N., Aung, P. P., Matsumura, S., Shutoh, M. und Nakayama, H. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* **8**, 86–94 (2005).
  163. Hurst, D. R. und Welch, D. R. Metastasis suppressor genes at the interface between the environment and tumor cell growth. *Int Rev Cel Mol Bio* **286**, 107–180 (2011).
  164. Ng, M. K., Wu, J., Chang, E., Wang, B.-y., Katzenberg-Clark, R., Ishii-Watabe, A. und Cooke, J. P. A Central Role for Nicotinic Cholinergic Regulation of Growth Factor-Induced Endothelial Cell Migration. *Arterioscl Throm Vas* **27**, 106–112 (2007).
  165. Fearon, I. M., Acheampong, D. O. und Bishop, E. Modification of smoke toxicant yields alters the effects of cigarette smoke extracts on endothelial migration: an in vitro study using a cardiovascular disease model. *Int J Toxicol* **31**, 572–583 (2012).
  166. Muller, Patricia A J, Vousden, K. H. und Norman, J. C. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol* **192**, 209–218 (2011).
  167. Dasgupta, P., Rizwani, W., Pillai, S., Kinkade, R., Kovacs, M., Rastogi, S. und Banerjee, S. *et al.* Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer* **124**, 36–45 (2009).
  168. Sun, H. und Ma, X.  $\alpha$ 5-nAChR modulates nicotine-induced cell migration and invasion in A549 lung cancer cells. *Exp Toxicol Pathol* **67**, 477–482 (2015).

169. Yoneyama, R., Aoshiba, K., Furukawa, K., Saito, M., Kataba, H., Nakamura, H. und Ikeda, N. Nicotine enhances hepatocyte growth factor-mediated lung cancer cell migration by activating the  $\alpha 7$  nicotine acetylcholine receptor and phosphoinositide kinase-3-dependent pathway. *Oncol Lett* **11**, 673–677 (2016).
170. Xu, L., Mao, X.-y., Fan, C.-f. und Zheng, H.-c. MTA1 expression correlates significantly with cigarette smoke in non-small cell lung cancer. *Virchows Arch* **459**, 415–422 (2011).
171. Yin, Y., Hou, G., Li, E.-r., Wang, Q.-y. und Kang, J. Regulation of cigarette smoke-induced toll-like receptor 4 expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in bronchial epithelial cells. *Respirology* **18**, 30–39 (2013).
172. Chen, G.-q., Lin, B., Dawson, M. I. und Zhang, X.-k. Nicotine modulates the effects of retinoids on growth inhibition and RAR? Expression in lung cancer cells. *Int J Cancer* **99**, 171–178 (2002).
173. Michaud, S.-E., Menard, C., Guy, L.-G., Gennaro, G. und Rivard, A. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway. *FASEB J* **17**, 1150–1152 (2003).
174. Swenson, W. G., Wuertz, B. R. und Ondrey, F. G. Tobacco carcinogen mediated up-regulation of AP-1 dependent pro-angiogenic cytokines in head and neck carcinogenesis. *Mol Carcinog* **50**, 668–679 (2011).
175. Damert, A., Ikeda, E. und Risau, W. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-induciblefactor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem J* **327**, 419–423 (1997).
176. Zhang, Q., Tang, X., Zhang, Z.-F., Velikina, R., Shi, S. und Le, A. D. Nicotine Induces Hypoxia-Inducible Factor-1 Expression in Human Lung Cancer Cells via Nicotinic Acetylcholine Receptor Mediated Signaling Pathways. *Clin Cancer Res* **13**, 4686–4694 (2007).
177. Qin, G., Kishore, R., Dolan, C. M., Silver, M., Wecker, A., Luedemann, C. N. und Thorne, T. *et al.* Cell cycle regulator E2F1 modulates angiogenesis via

- p53-dependent transcriptional control of VEGF. *Proc Natl Acad Sci* **103**, 11015–11020 (2006).
178. He, F., Li, B., Zhao, Z., Zhou, Y., Hu, G., Zou, W. und Hong, W. *et al.* The proliferative effects of nicotine and its underlying mechanism on rat airway smooth muscle cells. *PLoS ONE* **9**, e93508 (2014).
179. Schaal, C. und Chellappan, S. P. Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. *Molecular cancer research : MCR* **12**, 14–23 (2014).
180. Di, Y. P., Zhao, J. und Harper, R. Cigarette smoke induces MUC5AC protein expression through the activation of Sp1. *J Biol Chem* **287**, 27948–27958 (2012).
181. Eisermann, K., Broderick, C. J., Bazarov, A., Moazam, M. M. und Fraizer, G. C. Androgen up-regulates vascular endothelial growth factor expression in prostate cancer cells via an Sp1 binding site. *Mol Cancer* **12**, 7 (2013).
182. Zhao, J., Harper, R., Barchowsky, A. und Di, Y. Identification of multiple MAPK-mediated transcription factors regulated by tobacco smoke in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L480-90 (2007).
183. Gonçalves, R. B., Coletta, R. D., Silvério, K. G., Benevides, L., Casati, M. Z., da Silva, J. S. und Nociti, F. H. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res* **60**, 409–424 (2011).
184. Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., Jolkovsky, D. L., Pinkerton, K. E. und Grando, S. A. Receptor-mediated tobacco toxicity: acceleration of sequential expression of 5 and 7 nicotinic receptor subunits in oral keratinocytes exposed to cigarette smoke. *The FASEB Journal* **22**, 1356–1368 (2007).
185. Brown, K. C., Perry, H. E., Lau, J. K., Jones, D. V., Pulliam, J. F., Thornhill, B. A. und Crabtree, C. M. *et al.* Nicotine induces the up-regulation of the  $\alpha 7$ -nicotinic receptor ( $\alpha 7$ -nAChR) in human squamous cell lung cancer cells via the Sp1/GATA protein pathway. *J Biol Chem* **288**, 33049–33059 (2013).
186. Shou, J., Jing, J., Xie, J., You, L., Jing, Z., Yao, J. und Han, W. *et al.* Nuclear factor of activated T cells in cancer development and treatment. *Cancer Lett* **361**, 174–184 (2015).

187. Lambert, C., Li, J., Jonscher, K., Yang, T.-C., Reigan, P., Quintana, M. und Harvey, J. *et al.* Acrolein inhibits cytokine gene expression by alkylating cysteine and arginine residues in the NF-kappaB1 DNA binding domain. *J Biol Chem* **282**, 19666–19675 (2007).
188. Samanta, D., Kaufman, J., Carbone, D. P. und Datta, P. K. Long-term Smoking Mediated Down-regulation of Smad3 Induces Resistance to Carboplatin in Non-Small Cell Lung Cancer. *Neoplasia* **14**, 644–IN23 (2012).
189. Springer, J., Scholz, F. R., Peiser, C., Groneberg, D. A. und Fischer, A. SMAD-signaling in chronic obstructive pulmonary disease: transcriptional down-regulation of inhibitory SMAD 6 and 7 by cigarette smoke. *Biological chemistry* **385**, 649–653 (2004).
190. Xu, J., Gimenez-Conti, I. B., Cunningham, J. E., Collet, A. M., Luna, M. A., Lanfranchi, H. E. und Spitz, M. R. *et al.* Alterations of p53, cyclin D1, Rb, and H-ras in human oral carcinomas related to tobacco use. *Cancer* **83**, 204–212 (1998).
191. Pande, P., Mathur, M., Shukla, N. K. und Ralhan, R. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol* **34**, 396–403 (1998).
192. Ludovini, V., Gregorc, V., Pistola, L., Mihaylova, Z., Floriani, I., Darwish, S. und Stracci, F. *et al.* Vascular endothelial growth factor, p53, Rb, Bcl-2 expression and response to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **46**, 77–85 (2004).
193. Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H. und Bonavida, B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* **25**, 1125–1142 (2006).
194. Karatzanis, A. D., Samara, K. D., Antoniou, K. M., Lymbouridou, R., Chatzakis, N., Spandidos, D. A. und Velegarakis, G. A. *et al.* Investigation of angiogenetic pathways in nasal polyposis. *Mol Med Rep* **5**, 1158–1162 (2012).
195. Cabanski, M., Fields, B., Boue, S., Boukharov, N., DeLeon, H., Dror, N. und Geertz, M. *et al.* Transcriptional profiling and targeted proteomics reveals common molecular changes associated with cigarette smoke-induced lung

- emphysema development in five susceptible mouse strains. *Inflamm Res* **64**, 471–486 (2015).
196. Ray, A., Alalem, M. und Ray, B. K. Loss of Epigenetic Kruppel-like Factor 4 Histone Deacetylase (KLF-4-HDAC)-mediated Transcriptional Suppression Is Crucial in Increasing Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Breast Cancer. *J Biol Chem* **288**, 27232–27242 (2013).
197. Chen, Z., Wang, T., Cai, L., Su, C., Zhong, B., Lei, Y. und Xiang, A. Clinicopathological significance of non-small cell lung cancer with high prevalence of Oct-4 tumor cells. *J Exp Clin Cancer Res* **31**, 10 (2012).
198. Lenny, N., Westendorf, J. J. und Hiebert, S. W. Transcriptional regulation during myelopoiesis. *Mol Biol Rep* **24**, 157–168 (1997).
199. Noll, L., Peterson, F. C., Hayes, P. L., Volkman, B. F. und Sander, T. Heterodimer formation of the myeloid zinc finger 1 SCAN domain and association with promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Leukemia Res* **32**, 1582–1592 (2008).
200. Eguchi, T., Prince, T., Wegiel, B. und Calderwood, S. K. Role and Regulation of Myeloid Zinc Finger Protein 1 in Cancer. *J Cell Biochem* **116**, 2146–2154 (2015).
201. Ko, C.-P., Yang, L.-C., Chen, C.-J., Yeh, K.-T., Lin, S.-H., Yang, S.-F. und Chen, M.-K. *et al.* Expression of myeloid zinc finger 1 and the correlation to clinical aspects of oral squamous cell carcinoma. *Tumour Biol (Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine)* **36**, 7099–7105 (2015).
202. Mudduluru, G., Vajkoczy, P. und Allgayer, H. Myeloid zinc finger 1 induces migration, invasion, and in vivo metastasis through Axl gene expression in solid cancer. *Mol Cancer Res* **8**, 159–169 (2010).
203. Harper, J., Yan, L., Loureiro, R. M., Wu, I., Fang, J., D'Amore, P. A. und Moses, M. A. Repression of vascular endothelial growth factor expression by the zinc finger transcription factor ZNF24. *Cancer Res* **67**, 8736–8741 (2007).

204. Jia, D., Huang, L., Bischoff, J. und Moses, M. A. The endogenous zinc finger transcription factor, ZNF24, modulates the angiogenic potential of human microvascular endothelial cells. *The FASEB Journal* **29**, 1371–1382 (2015).
205. Jia, D., Hasso, S. M., Chan, J., Filingeri, D., D'Amore, P. A., Rice, L. und Pampo, C. *et al.* Transcriptional repression of VEGF by ZNF24: mechanistic studies and vascular consequences in vivo. *Blood* **121**, 707–715 (2013).
206. Heist, R. S., Zhai, R., Liu, G., Zhou, W., Lin, X., Su, L. und Asomaning, K. *et al.* VEGF polymorphisms and survival in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **26**, 856–862 (2008).
207. Fan, X. C. und Steitz, J. A. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *The EMBO Journal* **17**, 3448–3460 (1998).
208. Levy, N. S., Chung, S., Furneaux, H. und Levy, A. P. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* **273**, 6417–6423 (1998).
209. Coles, L. S., Bartley, M. A., Bert, A., Hunter, J., Polyak, S., Diamond, P. und Vadas, M. A. *et al.* A multi-protein complex containing cold shock domain (Y-box) and polypyrimidine tract binding proteins forms on the vascular endothelial growth factor mRNA. Potential role in mRNA stabilization. *Eur J Biochem* **271**, 648–660 (2004).
210. Jafarifar, F., Yao, P., Eswarappa, S. M. und Fox, P. L. Repression of VEGFA by CA-rich element-binding microRNAs is modulated by hnRNP L. *The EMBO Journal* **30**, 1324–1334 (2011).
211. Gorospe, M., Tominaga, K., Wu, X., Föhling, M. und Ivan, M. Post-Transcriptional Control of the Hypoxic Response by RNA-Binding Proteins and MicroRNAs. *Front Mol Neurosci* **4**, 7 (2011).
212. Essafi-Benkhadir, K., Onesto, C., Stebe, E., Moroni, C. und Pagès, G. Tristetraprolin inhibits Ras-dependent tumor vascularization by inducing vascular endothelial growth factor mRNA degradation. *Mol Biol Cell* **18**, 4648–4658 (2007).

213. Sa-nguanraksa, D. und O-charoenrat, P. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor A Polymorphisms in Breast Cancer. *IJMS* **13**, 14845–14864 (2012).
214. Li, Z.-D., Liu, L.-Z., Shi, X., Fang, J. und Jiang, B.-H. Benzo[a]pyrene-3,6-dione inhibited VEGF expression through inducing HIF-1 $\alpha$  degradation. *Biochem Bioph Res Co* **357**, 517–523 (2007).
215. Takahashi, K., Yokota, S.-I., Tatsumi, N., Fukami, T., Yokoi, T. und Nakajima, M. Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. *Toxicol Appl Pharm* **272**, 154–160 (2013).
216. Hua, Z., Lv, Q., Ye, W., Wong, C.-K. A., Cai, G., Gu, D. und Ji, Y. *et al.* MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS ONE* **1**, e116 (2006).



## Anhang I: Ergebnisse und statistische Auswertung der zytotoxischen Versuche

**Tabelle 31: Messung der metabolischen Aktivität nach Inkubation der Zelllinien mit CSE**

<b>A549</b>		<b>Viabilität [% der Kontrolle]</b>							<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0 % CSE</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>1 % CSE</b>	67,2	68,6	118,8	85,1	136,5	102,9	137,6	151,2	<b>108,5</b>	<b>32,6</b>
<b>2,5 % CSE</b>	47,6	75,7	63,4	46,2	172,9	72,2	97,6	198,6	<b>96,8</b>	<b>57,7</b>
<b>5 % CSE</b>	32,7	65,0	53,3	58,4	189,5	110,2	120,6	192,0	<b>102,7</b>	<b>61,7</b>
<b>10 % CSE</b>	34,0	57,1	53,5	50,4	134,7	107,9	142,0	113,9	<b>86,7</b>	<b>42,5</b>
<b>HNSCCUM-02T</b>		<b>Viabilität [% der Kontrolle]</b>							<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0 % CSE</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0			<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>1 % CSE</b>	137,6	151,2	100,9	95,3	87,2	81,5			<b>109,0</b>	<b>28,6</b>
<b>2,5 % CSE</b>	97,6	198,6	111,4	112,2	112,7	88,8			<b>120,2</b>	<b>39,6</b>
<b>5 % CSE</b>	120,6	192,0	89,7	107,1	159,1	109,8			<b>129,7</b>	<b>38,3</b>
<b>10 % CSE</b>	142,0	113,9	91,2	135,8	81,3	111,5			<b>112,6</b>	<b>23,8</b>

**Tabelle 32: Statistische Analyse der metabolischen Aktivität nach Inkubation der Zelllinien mit CSE**

<b>A549</b>				
<b>One-way analysis of variance</b>				
P value				0,9004
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,0291
<b>Bonferroni's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95 % CI</b>	<b>signifikant?</b>	<b>Summary</b>
0 % CSE vs. 1 % CSE	-8,500	-67,38-50,38	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	3,236	-55,65-56,17	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	-2,717	-61,60-56,17	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	13,32	-45,56-72,21	nein	ns
<b>HNSCCUM-02T</b>				
<b>One-way analysis of variance</b>				
P value				0,4990
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,1215
<b>Bonferroni's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95 % CI</b>	<b>signifikant?</b>	<b>Summary</b>
0 % CSE vs. 1 % CSE	-8,958	-55,17-37,25	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-20,22	-66,43-25,99	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	-29,74	-75,95-16,46	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	-12,63	-58,84-33,57	nein	ns

Tabelle 33: Messung der Vitalität nach Inkubation der Zelllinien mit CSE

<b>A549</b>					
	<b>lebende Zellen [% der Kontrolle]</b>			<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0 % CSE</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>1 % CSE</b>	91,8	116,1	103,4	<b>103,8</b>	<b>12,2</b>
<b>2,5 % CSE</b>	95,8	122,1	106,7	<b>108,2</b>	<b>13,2</b>
<b>5 % CSE</b>	87,0	120,8	103,2	<b>103,7</b>	<b>16,9</b>
<b>10 % CSE</b>	60,5	131,5	129,1	<b>107,0</b>	<b>40,3</b>
	<b>tote Zellen [% der Totkontrolle]</b>			<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>Totkontrolle</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>0 % CSE</b>	52,7	25,2	22,6	<b>33,5</b>	<b>16,7</b>
<b>1 % CSE</b>	49,3	22,1	19,4	<b>30,3</b>	<b>16,5</b>
<b>2,5 % CSE</b>	46,8	22,0	22,5	<b>30,4</b>	<b>14,2</b>
<b>5 % CSE</b>	64,6	23,8	22,9	<b>37,1</b>	<b>23,8</b>
<b>10 % CSE</b>	56,2	24,6	24,6	<b>35,1</b>	<b>18,3</b>
	<b>Gesamtzellzahl [% der Kontrolle]</b>			<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0 % CSE</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>1 % CSE</b>	99,8	102,1	101,6	<b>101,2</b>	<b>1,2</b>
<b>2,5 % CSE</b>	105,0	105,7	92,5	<b>101,1</b>	<b>7,4</b>
<b>5 % CSE</b>	84,9	102,9	95,3	<b>94,4</b>	<b>9,0</b>
<b>10 % CSE</b>	89,0	100,1	89,1	<b>92,7</b>	<b>6,4</b>
<b>HNSCCUM-02T</b>					
	<b>lebende Zellen [% der Kontrolle]</b>			<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0 % CSE</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>1 % CSE</b>	98,9	113,3	109,8	<b>107,3</b>	<b>7,5</b>
<b>2,5 % CSE</b>	93,8	113,2	100,9	<b>102,6</b>	<b>9,8</b>
<b>5 % CSE</b>	78,2	114,4	114,4	<b>102,3</b>	<b>20,9</b>
<b>10 % CSE</b>	78,6	102,4	80,9	<b>87,3</b>	<b>13,1</b>
	<b>tote Zellen [% der Totkontrolle]</b>			<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>Totkontrolle</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>0 % CSE</b>	15,1	26,3	45,4	<b>28,9</b>	<b>15,3</b>
<b>1 % CSE</b>	17,8	29,9	48,2	<b>32,0</b>	<b>15,3</b>
<b>2,5 % CSE</b>	14,9	27,1	50,6	<b>30,9</b>	<b>18,2</b>
<b>5 % CSE</b>	16,0	37,6	54,0	<b>35,9</b>	<b>19,1</b>
<b>10 % CSE</b>	16,5	48,2	54,0	<b>39,6</b>	<b>20,2</b>
	<b>Gesamtzellzahl [% der Kontrolle]</b>			<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0 % CSE</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>1 % CSE</b>	98,3	109,2	89,6	<b>99,1</b>	<b>9,8</b>
<b>2,5 % CSE</b>	99,6	101,7	86,0	<b>95,8</b>	<b>8,5</b>
<b>5 % CSE</b>	110,7	90,4	85,0	<b>95,4</b>	<b>13,6</b>
<b>10 % CSE</b>	103,9	80,6	78,7	<b>87,7</b>	<b>14,0</b>

**Tabelle 34: Statistische Analyse der Vitalität nach Inkubation der Zelllinien mit CSE**

<b>A549</b>				
<b>lebende Zellen</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,9898
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,0270
Bonferroni`s multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	-3,755	-56,21-48,70	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-8,177	-60,63-44,28	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	-3,671	-56,13-48,78	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	-7,019	-59,48-45,44	nein	ns
<b>tote Zellen</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,9866
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				
R square				0,0311
Bonferroni`s multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	3,219	-41,89-48,32	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	3,056	-42,05-48,16	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	-3,633	-48,74-41,47	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	-1,638	-46,74-43,47	nein	ns
<b>Gesamtzellzahl</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,3189
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,3501
Bonferroni`s multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	-1,167	-16,01-13,68	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-1,067	-15,91-13,78	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	5,633	-9,21-20,48	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	7,267	-7,58-22,11	nein	ns

**Fortsetzung Tabelle 34: Statistische Analyse der Vitalität nach Inkubation der Zelllinien mit CSE**

<b>HNSCCUM-02T</b>				
<b>lebende Zellen</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,3995
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,3097
Bonferroni`s multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	-7,345	-37,95-23,26	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-2,595	-33,20-28,01	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	-2,299	-32,90-28,31	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	12,72	-17,89-43,32	nein	ns
<b>tote Zellen</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,9469
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,0650
Bonferroni`s multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	-3,069	-47,05-40,91	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-1,983	-45,97-42,00	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	-6,985	-50,97-37,00	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	-10,66	-54,65-33,32	nein	ns
<b>Gesamtzellzahl</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,6489
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,2026
Bonferroni`s multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	0,9667	-25,04-26,98	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	4,233	-21,78-30,24	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	4,633	-21,38-30,64	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	12,27	-13,74-38,28	nein	ns

Tabelle 35: Messung der Lebendzellzahl nach Inkubation der Zelllinien mit CSE

<b>A549</b>	<b>Zellzahl [% der Kontrolle]</b>								<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0 % CSE</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>1 % CSE</b>	131,4	153,2	112,5	137,9	80,7	65,0	63,7	74,5	<b>102,4</b>	<b>35,7</b>
<b>2,5 % CSE</b>	189,0	104,1	202,9	230,8	77,2	139,5	76,3	54,8	<b>134,3</b>	<b>66,4</b>
<b>5 % CSE</b>	208,6	111,9	213,9	181,9	62,5	81,3	71,7	61,5	<b>124,1</b>	<b>66,5</b>
<b>10 % CSE</b>	153,5	171,4	201,8	183,7	84,9	90,7	42,7	84,0	<b>126,6</b>	<b>58,0</b>
<b>HNSCCUM-02T</b>	<b>Zellzahl [% der Kontrolle]</b>								<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0 % CSE</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>1 % CSE</b>	63,8	74,5	101,7	75,9	99,1	111,8			<b>87,8</b>	<b>18,9</b>
<b>2,5 % CSE</b>	76,3	54,9	90,8	69,5	77,9	98,2			<b>77,9</b>	<b>15,4</b>
<b>5 % CSE</b>	71,7	61,5	106,2	95,7	58,6	81,2			<b>79,1</b>	<b>19,0</b>
<b>10 % CSE</b>	42,7	84,0	93,1	76,3	96,4	88,9			<b>80,3</b>	<b>19,7</b>

Tabelle 36: Statistische Analyse der Lebendzellzahl nach Inkubation der Zelllinien mit CSE

<b>A549</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,5962
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,0742
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	-2,361	-70,70-65,98	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-34,32	-102,7-34,01	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	-24,14	-92,48-44,2	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	-26,57	-94,91-41,77	nein	ns
<b>HNSCCUM-02T</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,1423
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,2329
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	12,21	-13,25-37,68	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	22,06	-3,41-47,53	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	20,88	-4,59-46,35	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	19,75	-5,72-45,22	nein	ns

Tabelle 37: Messung der Migration nach Inkubation der Zelllinien mit CSE

<b>A549</b>		<b>zellfreie Fläche [% 0 h]</b>			<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0 % CSE</b>	<b>0h</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	<b>4h</b>	85,8	95,5	108,1	<b>96,4</b>	<b>11,2</b>
	<b>8h</b>	82,5	87,1	92,8	<b>87,5</b>	<b>5,2</b>
	<b>12h</b>	68,2	82,7	110,8	<b>87,2</b>	<b>21,6</b>
	<b>24h</b>	57,8	60,2	84,8	<b>67,6</b>	<b>15,0</b>
<b>1 % CSE</b>	<b>0h</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	<b>4h</b>	83,9	91,8	95,4	<b>90,4</b>	<b>5,9</b>
	<b>8h</b>	78,8	91,4	77,5	<b>82,6</b>	<b>7,7</b>
	<b>12h</b>	72,1	93,0	66,1	<b>77,1</b>	<b>14,1</b>
	<b>24h</b>	43,2	39,3	29,9	<b>37,5</b>	<b>6,8</b>
<b>2,5 % CSE</b>	<b>0h</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	<b>4h</b>	96,3	96,5	92,4	<b>95,1</b>	<b>2,3</b>
	<b>8h</b>	84,3	88,6	86,1	<b>86,3</b>	<b>2,2</b>
	<b>12h</b>	90,5	89,1	80,9	<b>86,8</b>	<b>5,2</b>
	<b>24h</b>	50,6	62,2	46,8	<b>53,2</b>	<b>8,0</b>
<b>5 % CSE</b>	<b>0h</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	<b>4h</b>	86,9	103,1	91,7	<b>93,9</b>	<b>8,4</b>
	<b>8h</b>	75,6	89,6	84,7	<b>83,3</b>	<b>7,1</b>
	<b>12h</b>	73,8	93,1	85,0	<b>84,0</b>	<b>11,3</b>
	<b>24h</b>	46,5	68,8	58,9	<b>58,1</b>	<b>11,2</b>
<b>10 % CSE</b>	<b>0h</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	<b>4h</b>	94,8	100,1	92,9	<b>95,9</b>	<b>3,7</b>
	<b>8h</b>	86,8	105,2	92,9	<b>95,0</b>	<b>9,36</b>
	<b>12h</b>	82,9	93,7	89,6	<b>88,7</b>	<b>5,5</b>
	<b>24h</b>	54,0	64,4	65,1	<b>61,2</b>	<b>6,2</b>
<b>HNSCCUM-02T</b>		<b>zellfreie Fläche [% 0 h]</b>			<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0 % CSE</b>	<b>0h</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	<b>4h</b>	95,1	91,2	92,0	<b>92,8</b>	<b>2,0</b>
	<b>8h</b>	80,9	77,4	71,1	<b>76,4</b>	<b>5,0</b>
	<b>12h</b>	45,8	27,4	3,7	<b>25,6</b>	<b>21,1</b>
	<b>24h</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<b>1 % CSE</b>	<b>0h</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	<b>4h</b>	89,8	91,2	91,0	<b>90,6</b>	<b>0,7</b>
	<b>8h</b>	79,5	66,3	72,1	<b>72,6</b>	<b>6,6</b>
	<b>12h</b>	52,6	10,3	16,4	<b>26,4</b>	<b>22,8</b>
	<b>24h</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<b>2,5 % CSE</b>	<b>0h</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	<b>4h</b>	95,4	92,6	91,0	<b>93,0</b>	<b>2,2</b>
	<b>8h</b>	79,4	75,1	61,8	<b>72,1</b>	<b>9,2</b>
	<b>12h</b>	43,8	19,5	0,0	<b>21,1</b>	<b>22,0</b>
	<b>24h</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<b>5 % CSE</b>	<b>0h</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	<b>4h</b>	96,9	98,0	98,7	<b>97,9</b>	<b>0,9</b>
	<b>8h</b>	82,7	80,3	59,1	<b>74,1</b>	<b>13,0</b>
	<b>12h</b>	43,5	37,8	4,8	<b>28,7</b>	<b>20,9</b>
	<b>24h</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<b>10 % CSE</b>	<b>0h</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	<b>4h</b>	91,9	99,0	98,2	<b>96,3</b>	<b>3,9</b>
	<b>8h</b>	73,2	87,9	75,4	<b>78,8</b>	<b>8,0</b>
	<b>12h</b>	22,5	47,8	40,4	<b>36,9</b>	<b>13,0</b>
	<b>24h</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>

**Tabelle 38: Statistische Analyse der Migration nach Inkubation der Zelllinien mit CSE**

<b>A549</b>					
One-way analysis of variance					
	P value				0,7222
	P value summary				ns
	Are differences among means statistically significant?				nein
<b>4 h</b>	R square				0,1727
	<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95 %CI</b>	<b>signifikant?</b>	<b>summary</b>
	0 % CSE vs. 1 % CSE	0,2600	-14,33-14,85	nein	ns
	0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-3,810	-18,40-10,78	nein	ns
	0 % CSE vs. 5 % CSE	-3,280	-17,87-11,31	nein	ns
	0 % CSE vs. 10 % CSE	-5,100	-17,90-9,279	nein	ns
One-way analysis of variance					
	P value				0,2068
	P value summary				ns
	Are differences among means statistically significant?				nein
<b>8 h</b>	R square				0,4177
	<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95 %CI</b>	<b>signifikant?</b>	<b>summary</b>
	0 % CSE vs. 1 % CSE	2,260	-13,88-18,40	nein	ns
	0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-2,540	-18,68-13,60	nein	ns
	0 % CSE vs. 5 % CSE	1,490	-14,65-17,63	nein	ns
	0 % CSE vs. 10 % CSE	-10,17	-26,31-5,960	nein	ns
One-way analysis of variance					
	P value				0,4407
	P value summary				ns
	Are differences among means statistically significant?				nein
<b>12 h</b>	R square				0,2906
	<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95 %CI</b>	<b>signifikant?</b>	<b>summary</b>
	0 % CSE vs. 1 % CSE	-1,600	-25,36-22,16	nein	ns
	0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-9,530	-33,29-14,23	nein	ns
	0 % CSE vs. 5 % CSE	-8,510	-32,27-15,25	nein	ns
	0 % CSE vs. 10 % CSE	-13,27	-37,03-19,49	nein	ns
One-way analysis of variance					
	P value				0,0313
	P value summary				ns
	Are differences among means statistically significant?				nein
<b>24 h</b>	R square				0,6231
	<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95 %CI</b>	<b>signifikant?</b>	<b>summary</b>
	0 % CSE vs. 1 % CSE	21,5	1,279-41,73	ja	*
	0 % CSE vs. 2,5 % CSE	4,470	-15,76-24,7	nein	ns
	0 % CSE vs. 5 % CSE	0,900	-19,33-21,13	nein	ns
	0 % CSE vs. 10 % CSE	-2,210	-22,44-18,02	nein	ns

**Fortsetzung Tabelle 38: Statistische Analyse der Migration nach Inkubation der Zelllinien mit CSE**

<b>HNSCCUM-02T</b>					
<b>One-way analysis of variance</b>					
	P value				0,0180
	P value summary				*
	Are differences among means statistically significant?				ja
<b>4 h</b>	R square				0,6620
	<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95 %CI</b>	<b>signifikant?</b>	<b>summary</b>
	0 % CSE vs. 1 % CSE	2,130	-3,950-7,741	nein	ns
	0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-0,249	-5,867-5,369	nein	ns
	0 % CSE vs. 5 % CSE	-5,099	-10,72-0,519	nein	ns
	0 % CSE vs. 10 % CSE	-3,577	9,195-2,041	nein	ns
<b>One-way analysis of variance</b>					
	P value				0,8670
	P value summary				ns
	Are differences among means statistically significant?				nein
<b>8 h</b>	R square				0,1093
	<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95 %CI</b>	<b>signifikant?</b>	<b>summary</b>
	0 % CSE vs. 1 % CSE	3,801	-17,97-25,57	nein	ns
	0 % CSE vs. 2,5 % CSE	4,348	-17,42-26,12	nein	ns
	0 % CSE vs. 5 % CSE	2,399	-19,37-24,17	nein	ns
	0 % CSE vs. 10 % CSE	-2,385	-24,16-19,38	nein	ns
<b>One-way analysis of variance</b>					
	P value				0,9057
	P value summary				ns
	Are differences among means statistically significant?				nein
<b>12 h</b>	R square				0,0396
	<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95 %CI</b>	<b>signifikant?</b>	<b>summary</b>
	0 % CSE vs. 1 % CSE	-0,7938	-51,10-49,51	nein	ns
	0 % CSE vs. 2,5 % CSE	4,543	-45,76-54,85	nein	ns
	0 % CSE vs. 5 % CSE	-3,075	-53,38-47,23	nein	ns
	0 % CSE vs. 10 % CSE	-4,250	-61,55-39,06	nein	ns



**Tabelle 39: Messung der Invasion nach Inkubation der Zelllinien mit 10 % CSE**

<b>A549</b>		<b>Zellzahl [% der Kontrolle]</b>				<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>Kontrolle</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>	
<b>10 % CSE</b>	18,2	16,0	36,2	69,1	<b>34,9</b>	<b>24,5</b>	
<b>HNSCCUM-02T</b>		<b>Zellzahl [% der Kontrolle]</b>				<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>Kontrolle</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>	
<b>10 % CSE</b>	48,2	55,6	41,9	74,2	<b>48,6</b>	<b>6,9</b>	

**Tabelle 40: Statistische Analyse der Invasion nach Inkubation der Zelllinien mit 10 % CSE**

<b>A549</b>	
Unpaired t-test	
P Value	0,0018
P value summary	**
significantly different? (P<0,05)	ja
t, df	t=0,5309; df=6
<b>HNSCCUM-02T</b>	
Unpaired t-test	
P Value	0,0007
P value summary	***
significantly different? (P<0,05)	ja
t, df	t=6,439; df=6

## Anhang II: Ergebnisse und statistische Auswertung der zytotoxischen Versuche der primären Nasenschleimhautzellen

**Tabelle 41: Messung der metabolischen Aktivität nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE**

Material	Viabilität [% der Kontrolle]				
	0 %	1 %	2,5 %	5 %	10 %
<b>Patient 1</b> chron. Sinusitis	100,0	120,8	161,4	235,7	125,9
<b>Patient 2</b> chron. Sinusitis	100,0	106,2	122,4	129,0	140,1
<b>Patient 3</b> rez. Polyposis	100,0	154,2	130,0	186,3	100,1
<b>Patient 4</b> CRS mit Polyp	100,0	76,5	123,8	70,1	122,2
<b>Patient 5</b> Nasenmuschel	100,0	163,9	116,6	154,4	82,4
<b>Patient 6</b> Nasenmuschel	100,0	181,0	113,0	132,6	108,9
<b>Patient 7</b> Nasenmuschel	100,0	113,0	66,3	55,3	21,2
<b>Patient 8</b> Nasenmuschel	100,0	112,8	101,4	95,1	100,0
<b>Patient 9</b> Nasenmuschel	100,0	91,0	49,8	55,3	32,9
<b>Patient 10</b> Nasenmuschel	100,0	85,7	79,2	95,2	97,6
<b>Patient 11</b> Nasenmuschel	100,0	91,1	86,7	91,4	95,9
<b>Patient 12</b> Nasenmuschel	100,0	102,4	73,4	101,0	99,6
<b>Patient 13</b> Nasenmuschel	100,0	95,0	69,3	75,2	77,0
<b>Patient 14</b> Nasenmuschel	100,0	102,6	95,2	96,2	93,6
<b>Patient 15</b> Nasenmuschel	100,0	99,1	90,5	97,6	94,4
<b>Mittelwert</b>	<b>100,0</b>	<b>113,0</b>	<b>98,6</b>	<b>111,3</b>	<b>92,8</b>
<b>SD</b>	<b>0,0</b>	<b>30,2</b>	<b>29,5</b>	<b>49,6</b>	<b>31,3</b>

**Tabelle 42: Statistische Analyse der metabolischen Aktivität nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE**

primäre Nasenschleimhautzellen				
One-way analysis of variance				
P value				0,3699
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,0585
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	-13,02	-43,28-17,25	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	1,419	-28,84-31,68	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	-11,34	-41,61-18,92	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	7,217	-23,04-37,48	nein	ns

Tabelle 43: Messung der Vitalität nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE

Material		lebende Zellen [% der Kontrolle]					
		0 %	1 %	2,5 %	5 %	10 %	
Patient 7	Nasenmuschel	100,0	111,3	148,3	158,1	24,6	
Patient 8	Nasenmuschel	100,0	94,7	97,2	97,7	103,7	
Patient 9	Nasenmuschel	100,0	106,3	106,4	63,6	51,4	
Patient 10	Nasenmuschel	100,0	22,8	8,4	25,7	49,9	
Patient 11	Nasenmuschel	100,0	15,0	13,5	58,0	69,2	
Patient 12	Nasenmuschel	100,0	60,9	26,9	54,8	134,9	
Patient 13	Nasenmuschel	100,0	14,0	10,3	41,0	48,0	
Patient 14	Nasenmuschel	100,0	80,1	80,1	83,6	76,7	
Patient 15	Nasenmuschel	100,0	70,4	77,8	59,9	45,0	
<b>Mittelwert</b>		<b>100,0</b>	<b>63,9</b>	<b>63,2</b>	<b>71,4</b>	<b>67,0</b>	
<b>SD</b>		<b>0,0</b>	<b>38,5</b>	<b>50,4</b>	<b>38,8</b>	<b>34,0</b>	
Material		tote Zellen [% der Totkontrolle]					
		Tot-kontrolle	0 %	1 %	2,5 %	5 %	10 %
Patient 7	Nasenmuschel	100,0	20,2	18,6	20,9	21,0	54,9
Patient 8	Nasenmuschel	100,0	52,5	49,6	49,9	49,2	53,1
Patient 9	Nasenmuschel	100,0	20,0	16,1	16,6	30,7	42,9
Patient 10	Nasenmuschel	100,0	49,2	68,6	77,7	69,5	62,4
Patient 11	Nasenmuschel	100,0	40,8	65,7	72,9	56,3	55,1
Patient 12	Nasenmuschel	100,0	69,0	72,0	93,0	85,8	93,3
Patient 13	Nasenmuschel	100,0	42,7	75,0	120,8	68,3	68,8
Patient 14	Nasenmuschel	100,0	24,8	17,6	17,8	19,6	30,4
Patient 15	Nasenmuschel	100,0	17,6	21,6	18,8	27,8	30,4
<b>Mittelwert</b>		<b>100,0</b>	<b>37,4</b>	<b>45,0</b>	<b>54,2</b>	<b>47,6</b>	<b>54,6</b>
<b>SD</b>		<b>0,0</b>	<b>17,9</b>	<b>26,1</b>	<b>38,7</b>	<b>24,0</b>	<b>19,6</b>
Material		Gesamtzellzahl [% der Kontrolle]					
		0 %	1 %	2,5 %	5 %	10 %	
Patient 7	Nasenmuschel	100,0	93,6	75,5	63,5	82,6	
Patient 8	Nasenmuschel	100,0	103,3	97,9	96,2	86,0	
Patient 9	Nasenmuschel	100,0	91,4	87,6	84,4	74,7	
Patient 10	Nasenmuschel	100,0	116,1	107,5	106,2	96,7	
Patient 11	Nasenmuschel	100,0	130,8	105,5	98,6	91,7	
Patient 12	Nasenmuschel	100,0	111,6	96,0	89,6	79,1	
Patient 13	Nasenmuschel	100,0	119,0	97,4	99,2	97,1	
Patient 14	Nasenmuschel	100,0	104,3	100,4	89,3	79,3	
Patient 15	Nasenmuschel	100,0	92,8	97,8	84,1	80,8	
<b>Mittelwert</b>		<b>100,0</b>	<b>107,0</b>	<b>96,2</b>	<b>90,1</b>	<b>85,3</b>	
<b>SD</b>		<b>0,0</b>	<b>13,5</b>	<b>9,6</b>	<b>12,4</b>	<b>8,1</b>	

**Tabelle 44: Statistische Analyse der Vitalität nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE**

<b>primäre Nasenschleimhaut</b>				
<b>lebende Zellen</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,1954
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,1373
Bonferroni`s multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	36,06	-9,022-81,15	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	36,80	-8,284-81,88	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	28,63	-169,5-73,71	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	32,97	-12,11-78,06	nein	ns
<b>tote Zellen</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,6216
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,0622
Bonferroni`s multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	-7,587	-40,01-24,84	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-16,82	-49,25-15,60	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	-10,16	-42,58-22,27	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	-17,20	-49,02-15,22	nein	ns
<b>Gesamtzellzahl</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,0040
P value summary				***
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				ja
R square				0,3929
Bonferroni`s multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	-6,969	-20,90-6,958	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	3,816	-10,11-17,74	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	9,877	-4,050-23,80	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	14,67	0,746-28,60	ja	*

**Tabelle 45: Messung der Lebendzellzahl nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE**

Material	Lebendzellzahl [% der Kontrolle]					
	Kontrolle	1 %	2,5 %	5 %	10 %	
<b>Patient 1</b>	chron. Sinusitis	100,0	84,1	71,1	55,8	95,7
<b>Patient 2</b>	chron. Sinusitis	100,0	89,7	79,6	88,4	67,2
<b>Patient 3</b>	rez. Polyposis	100,0	72,8	83,7	63,5	109,4
<b>Patient 4</b>	CRS mit Polyp	100,0	66,2	105,3	153,4	88,0
<b>Patient 5</b>	Nasenmuschel	100,0	70,2	91,3	78,1	108,0
<b>Patient 6</b>	Nasenmuschel	100,0	79,8	122,4	89,5	101,9
<b>Patient 7</b>	Nasenmuschel	100,0	86,4	83,1	84,9	57,9
<b>Patient 8</b>	Nasenmuschel	100,0	87,6	90,4	91,4	85,1
<b>Patient 9</b>	Nasenmuschel	100,0	100,2	99,3	100,1	108,1
<b>Patient 10</b>	Nasenmuschel	100,0	54,4	46,5	48,1	46,2
<b>Patient 11</b>	Nasenmuschel	100,0	59,0	54,4	61,9	56,7
<b>Patient 12</b>	Nasenmuschel	100,0	73,3	56,6	70,6	70,5
<b>Patient 13</b>	Nasenmuschel	100,0	74,4	65,0	92,1	90,7
<b>Patient 14</b>	Nasenmuschel	100,0	106,7	84,7	70,4	62,4
<b>Patient 15</b>	Nasenmuschel	100,0	91,9	95,3	92,2	85,8
<b>Mittelwert</b>		<b>100,0</b>	<b>79,8</b>	<b>81,9</b>	<b>82,7</b>	<b>82,2</b>
<b>SD</b>		<b>0,0</b>	<b>14,6</b>	<b>20,5</b>	<b>24,9</b>	<b>20,8</b>

**Tabelle 46: Statistische Analyse der Lebendzellzahl nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit CSE**

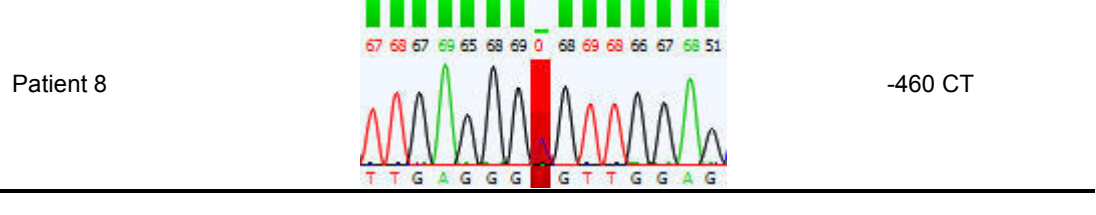
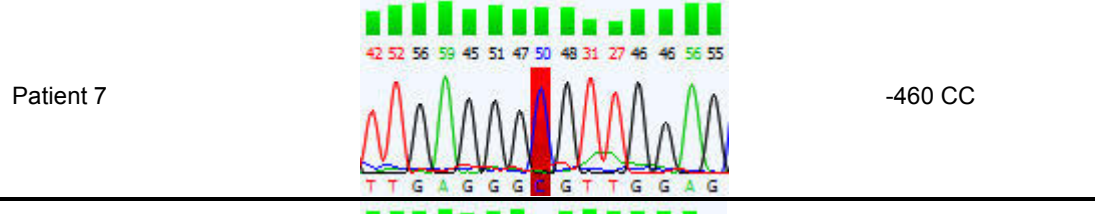
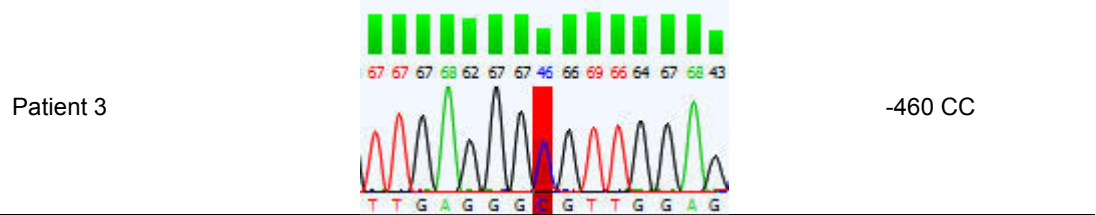
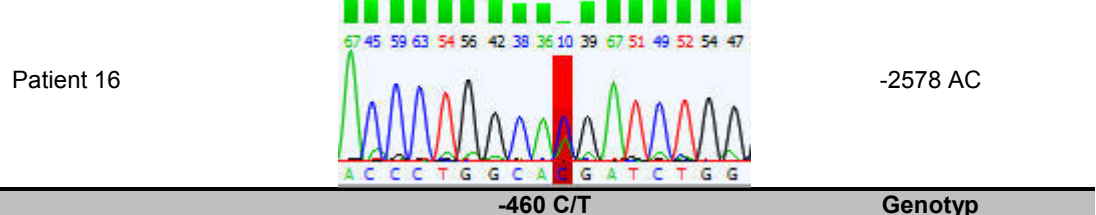
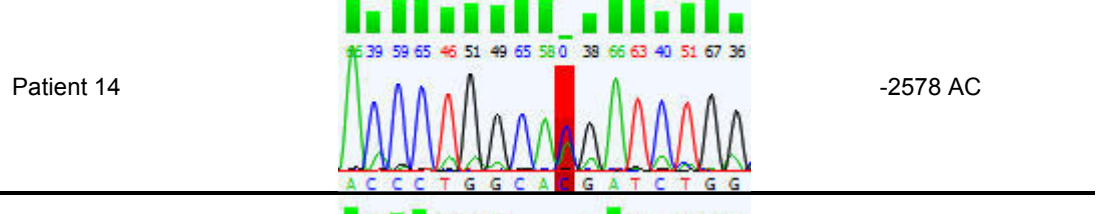
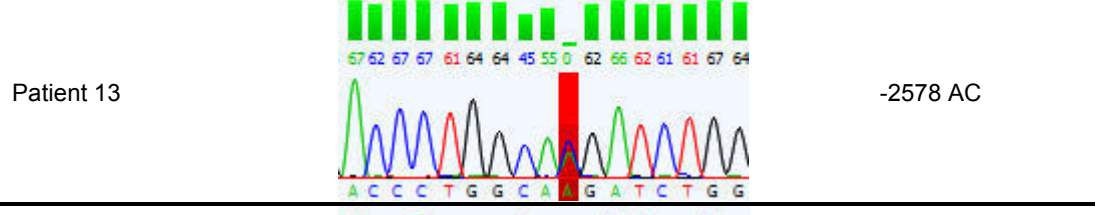
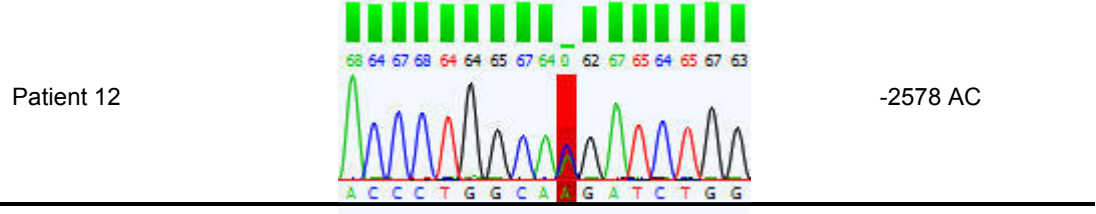
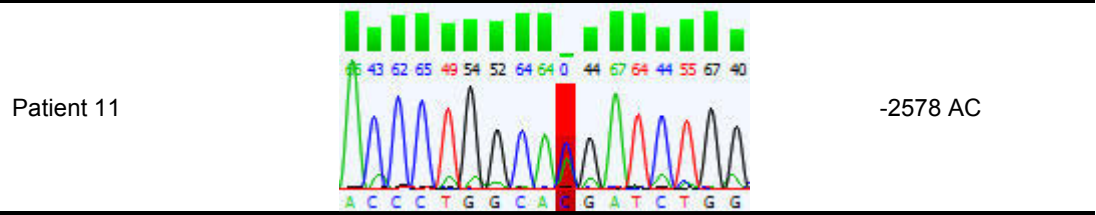
primäre Nasenschleimhaut				
One-way analysis of variance				
P value				0,0224
P value summary				*
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				ja
R square				0,1484
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	20,23	3,031-37,42	ja	*
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	18,10	0,903-35,29	ja	*
0 % CSE vs. 5 % CSE	17,31	0,109-34,50	ja	*
0 % CSE vs. 10 % CSE	17,77	0,574-34,97	ja	*

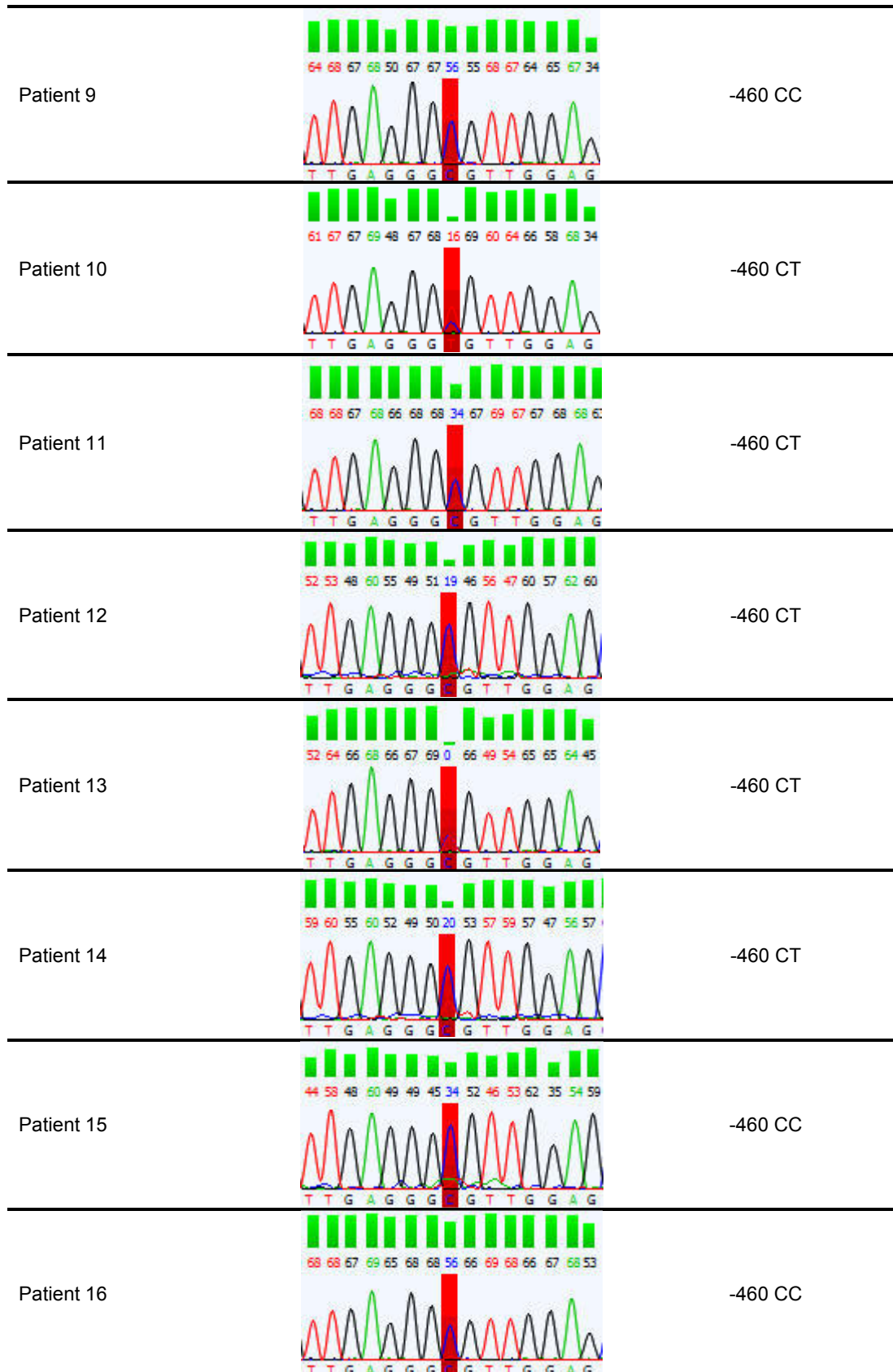
### Anhang III: Genotypisierung der primären Nasenschleimhautzellen

Zur Genotypisierung der Primärproben wurde zunächst die DNA isoliert und zur Amplifikation in die VEGF-PCR eingesetzt (3.2.2.7.1). Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und nach Isolation zur Verifizierung sequenziert. In Tabelle 47 sind die Ergebnisse der Sequenzierung der primären Nasenschleimhautzellen dargestellt.

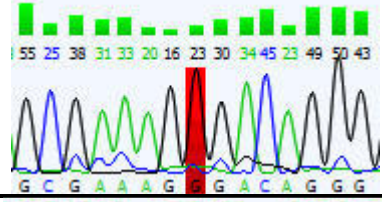
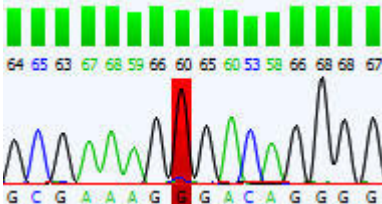
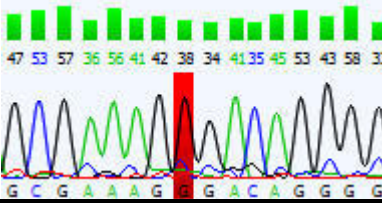
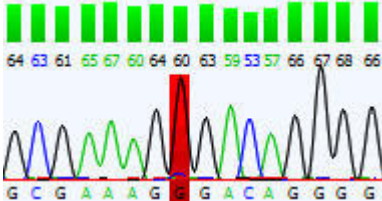
**Tabelle 47: Genotypisierung der VEGF-Promotor-SNPs -2578 A/C, -460 C/T und +405 C/G**

	-2578 A/C	Genotyp
Patient 3		-2578 AC
Patient 4		-2578 AA
Patient 7		-2578 AC
Patent 8		-2578 AC
Patient 9		-2578 AC
Patient 10		-2578 AC







	+405 C/G	Genotyp
Patient 3		+405 GG
Patient 7		+405 GG
Patient 8		+405 GG
Patient 9		+405 GG

## Anhang IV: Verwendete Sequenzen des VEGF-Promotors und der 3'-UTR

### A] Sequenz des VEGF-Promotors

Zur Untersuchung der VEGF-Promotoraktivität wurde die Sequenz des Promotors (NCBI Reference Sequence: NG\_008732.1; 2025-5591) in den pGlow TOPO® Reportervektor einkloniert

```

..GGGAGATCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCT
TGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTGCCCTTCCACTGCGCTCCCAA
GGTGAGGCCCTCCAAGCGGGGCCGAGTTTGGCCCTCAACTGGGAGCCAGCATGACCTCTGTG
TGGGCTGCTCTCTGCTTCACTGCCCCCTTCCCCAATCTGCTAGGTGACCCTGGGCCCCCTTG
TGCCCTCTCTGGGCCTTCGGAGGATTCTTTGGGGAGACAGTCTGCTCTGACGCCCCCTCCCC
TGCAGCAAGCAGCCTGGGGAGGGAGGTGAGGATAAGTGAAGTCAAGTTGTTTCAGGGGGCTAA
GCCCATGGAAGGGAAGATGCCACAGAGATACATGTGGTCTTGTGATTGTTGTTTTGTGCTTT
TTCCCCTTTTTTGAAGCTCAGGTGACTAGGTGACTTGAGCTTTTAATTTGGTGACAATGTG
GGCACTGGCTGAGTCTTAAGAGTACATTGTTGTAAATGCCGGTGACAACACACTGGGGCAT
GGGATCCAGAGTTAACCCCTCCAGGTACAGCCAGGTTATATCTCCACAATGAAGGGGGGAG
GTGGGCCATACTTTCTCGCCCTAATGAAGGTAGCTCAAAAACCCCTAGGCCAGGTTGTAATC
CTAGCCTTATATAAAAGGAATTCTGTGCCCTCACTCCCCTGGATCCCCTGGGCAAAGCCCCAG
AGGGAAACACAAACAGGTTGTTGTAACACACCTTGCTGGGTACCACCATGGAGGACAGTTGG
CTTATGGGGGTGGGGGGTGCCTGGGGCCACGGAGTGACTGGTGATGGCTATCCCTCCTTGA
ACCCCTCCAGCCTCCTCTTAGCTTCAGATTTGTTTATTTGTTTTTTACTAAGACCTGCTCTT
TCAGGTCTGTTGGCTCTTTTAGGGGCTGAAGAAGGCCGAGTTGAGAAGGGATGCAAGGGAGG
GGCCAGAATGAGCCCTTAGGGCTCAGAGCCTCCATCCTGCCCCAAGATGTCTACAGCTTGT
GCTCCTGGGGTGCTAGAGGCGCACAAGGAGGAAAGTTAGTGGCTTCCCTTCCATATCCCCTT
CATCAGCCTAGAGCATGGAGCCAGGTGAGGAGGCCTGCCTGGGAGGGGGCCCTGAGCCAGG
AAATAAACATTTACTAACTGTACAAAGACCTTGTCCTGCTGCTGGGGAGCCTGCCAAGTGG
TGGAGACAGGACTAGTGCACGAATGATGGAAAGGGAGGGTTGGGGTGGGTGGGAGCCAGCCC
TTTTCTCATAAGGGCCTTAGGACACCATAACCGATGGAACGGGGTACTGGGGAGGTAACC
TAGCACCTCCACAAACCACAGCAACATGTGCTGAGGATGGGGCTGACTAGGTAAGCTCCCT
GGAGCGTTTTTGGTTAAATTGAGGGAAATTGCTGCATTCCCATTTCTCAGTCCATGCCTCCACA
GAGGCTATGCCAGCTGTAGGCCAGACCCCTGGCA A/C ATCTGGGTGGATAATCAGACTGA
CTGGTCCCCTCTTCCCACAGGCCTCAGAGCCCCAACCTTGTTCCTGGGGCAGCCTGGAAA
TAGCCAGGTCAGAAACCAGCTAGGAATTTTCCAAGCTGCTTCCTATATGCAAGAATGGGAT
GGGGCCTTTGGGAGCACTTAGGGAAGATGTGGAGAGTTGGAGGAAAAGGGGGCTTGGAGGTA
AGGGAGGGGACTGGGGGAAGGATAGGGGAGAAGCTGTGAGCCTGGAGAAGTAGCCAAGGGAT
CCTGAGGGAATGGGGGAGCTGAGACGAAACCCCATTTCTATTTCAGAAGATGAGCTATGAGT
CTGGGCTTGGGCTGATAGAAGCCTTGGCCCTGGCCTGGTGGGAGCTCTGGGCAGCTGGCCT
ACAGACGTTCCCTTAGTGCTGGCGGGTAGGTTTGAATCATCACGCAGGCCCTGGCCTCCACCC
GCCCCACCAGCCCCCTGGCCTCAGTTCCTGGCAACATCTGGGGTTGGGGGGGCAGCAGGA
ACAAGGGCCTCTGTCTGCCAGCTGCCTCCCCCTTTGGGTTTTTGCCAGACTCCACAGTGCAT
ACGTGGGCTCCAACAGGTCCTCTTCCCTCCCAGTCACTGACTAACCCCGGAACCACACAGCT
TCCCGTTCTCAGCTCCACAAACTTGGTGCCAAATTCTTCTCCCCTGGGAAGCATCCCTGGAC
ACTTCCCAAAGGACCCAGTCACTCCAGCCTGTTGGCTGCCGCTCACTTTGATGTCTGCAGG
CCAGATGAGGGCTCCAGATGGCACATTGTGAGAGGGACACACTGTGGCCCTGTGCCAGCC
CTGGGCTCTCTGTACATGAAGCAACTCCAGTCCCAAATATGTAGCTGTTTGGGAGGTCAGAA
ATAGGGGGTCCAGGAGCAAACCTCCCCCACCCCTTTCCAAAGCCATTCCTCTTTAGCCA
GAGCCGGGGTGTGCAGACGGCAGTCACTAGGGGGCGCTCGGCCACCACAGGGAAGCTGGGTG
AATGGAGCGAGCAGCGTCTTCGAGAGTGAGGACGTGTGTGTCTGTGTGGGTGAGTGAGTGTG
TGCCTGTGGGGTTGAGGG C/T GTTGGAGCGGGGAGAAGGCCAGGGGTCACTCCAGGATT

```

CCAATAGATCTGTGTGTCCCTCTCCCCACCCGTCCCTGTCCGGCTCTCCGCCTTCCCCTGCC  
 CCCTTCAATATTCCTAGCAAAGAGGGAACGGCTCTCAGGCCCTGTCCGCACGTAACCTCACT  
 TTCTGTCTCCCTCCTCGCCAATGCCCGCGGGCGCGTGTCTCTGGACAGAGTTTCCGGGGGC  
 GGATGGGTAATTTTCAGGCTGTGAACCTTGGTGGGGTTCGAGCTTCCCCTTCAATTGCGGCGG  
 GCTGCGGGCCAGGCTTCACTGAGCGTCCGCAGAGCCCGGGCCCGAGCCGCGTGTGGAAGGGC  
 TGAGGCTCGCTGTCCCCGCCCGGGGCGGGGCGGGGTCGCGGGGCGGGGTCGCGGGGCGGAGC  
 CATGCGCCCCCTTTTTTTTTTAAAAGTCGGCTGGTAGCGGGGAGGATCGCGGAGGCTTG  
 GGGCAGCCGGGTAGCTCGGAGGTCGTGGCGCTGGGGCTAGCACCAGCGCTCTGTGCGGAGG  
 CGCAGCGGTTAGGTGGACCGGTCAGCGGACTACCCGGCCAGGGCGCTCGGTGCTGGAATTTG  
 ATATTCATTGATCCGGGTTTTATCCCTCTTCTTTTTTCTTAAACATTTTTTTTTTAAAAGTGT  
 ATTGTTTTCTCGTTTTAATTTATTTTTGCTTGCCATTCCCCACTTGAATCGGGCCGACGGCTT  
 GGGGAGATTGCTCTACTTCCCCAAATCACTGTGGATTTTGGAAACCAGCAGAAAGAGGAAAG  
 AGGTAGCAAGAGCTCCAGAGAGAAGTCGAGGAAGAGAGACGGGGTCAGAGAGAGCGCGCG  
 GGCGTGCGAGCAGCGAAAG **C/G** GACAGGGGCAAAGTGAGTGACCTGCTTTTGGGGTGA  
 CCGCCGGAGCGGGCGTGAGCCCTCCCCCTTGGGATCCCGCAGCTGACCAGTCGCG**AAGGGC**  
**AATTCTGCAGATCTAGAATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATT**  
**CTT...**

**Fett:** pGlow TOPO® Reportervektor

**A/C** SNP -2578 A/C

**C/T** SNP -460 C/T

**C/G** SNP +405 C/G

## Bj Sequenz der VEGF-3'-UTR

Zur Untersuchung der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität wurde die Sequenz (NG\_008732.1; Nukleotide 19.325-20.236) hinter die GFP-kodierende Sequenz einkloniert.

**..GGCATGGATGAGCTCTACAAATAA**TGAATTATCCAGCACAGTGGCGGCCGCATGTGACAAG  
 CCGAGGCGGTGAGCCGGGCAGGAGGAAGGAGCCTCCCTCAGGGTTTCGGGAACCAGATCTCT  
 CACCAGGAAAGACTGATACAGAACGATCGATACAGAAACCACGCTGCCGCCACCACACCATC  
 ACCATCGACAGAACAGTCCTTAATCCAGAAACCTGAAATGAAGGAAGAGGAGACTCTGCGCA  
 GAGCACTTTGGGTCCGGAGGGCGAGACTCCGGCGGAAGCATTCCCGGGCGGGTGACCCAGCA  
**C/T** GGTCCCTCTTGAATTGGATTCGCCATTTTATTTTTCTTGCTGCTAAATCACCGAG  
 CCCGGAAGATTAGAGAGTTTTATTTCTGGGATTCCTGTAGACACACCCACCCACATACATAC  
 ATTTATATATATATATATTATATATATATAAAAATAAATATCTCTATTTTATATATATAAAA  
 TATATATATTCTTTTTTTAAATTAACAGTGCTAATGTTATTGGTGTCTTCACTGGATGTATT  
 TGACTGCTGTGGACTTGAGTTGGGAGGGGAATGTTCCCACTCAGATCCTGACAGGGAAGAGG  
 AGGAGATGAGAGACTCTGGCATGATCTTTTTTTTTGTCCCACTTGGTGGGGCCAGGGTCTCT  
 CCCCTGCCCAGGAATGTGCAAGGCCAGGGCATGGGGCAAATATGACCCAGTTTTGGGAACA  
 CCGACAAACCCAGCCCTGGCGCTGAGCCTCTTACCCAGGTCAGACGGACAGAAAGACAGA  
 TCACAGGTACAGGGATGAGGACACCGGCTCTGACCAGGAGTTTGGGGAGCTTCAGGACATTG  
 CTGTGCTTTGGGGATTCCCTCCACATGCTGCACGCGCATCTCGCCCCAGGGGCACTGCCTG  
 GAAGATTGAGGAGCCTGGGCGGCCTTCGCTTACTCTCAG**CGGCCGCTCGAGTCTAGA...**

**Fett:**

**..GGCATGGATGAGCTCTACAAATAA**

**C/T**

**pGlow TOPO® Reportervektor**

Teil der GFP-kodierenden Sequenz

SNP +936 C/T

## Anhang V: Gezielte Mutagenese zur Einführung der Promotor-/3'-UTR-SNPs

### A] VEGF-Promotor-SNPs

Zur Untersuchung der SNP-abhängigen Regulation der VEGF-Promotoraktivität wurden mittels gezielter Mutagenese die SNPs -2578 A/C, -460 C/T und +405 C/G in die VEGF-Promotorsequenz eingeführt.

SNP -2578 A/C	SNP -460 C/T	SNP +405 C/G
CCTGGCAAGATCTGG	TTGAGGGCGTTGGAG	GCGAAAGCGACAGGG
CCTGGCACGATCTGG	TTGAGGGTGTGGAG	GCGAAAGGGACAGGG

### B] VEGF-3'-UTR-SNP

Der SNP-abhängige Einfluss wurde nach gezielter Mutation des SNPs +936 C/T in die 3'-UTR untersucht.

SNP +936 C/T
CCCAGCACGGTCCCT
CCCAGCATGGTCCCT

## Anhang VI: VEGF-Expression der Primärproben und Promotoraktivität nach Transfektion mit SNP-Promotorkonstrukten

**Tabelle 48: Messung der CSE-abhängigen VEGF-Expression primärer Nasenschleimhautzellen**

Material	VEGF-Expression [% der Kontrolle]	
	0 %	10 %
Patient 3	100,0	164,0
Patient 8	100,0	86,9
Patient 11	100,0	97,0
Patient 14	100,0	80,5
Patient 15	100,0	328,9
<b>Mittelwert</b>	<b>100,0</b>	<b>151,5</b>
<b>SD</b>	<b>0,0</b>	<b>104,6</b>

**Tabelle 49: Statistische Analyse der CSE-abhängigen VEGF-Expression primärer Nasenschleimhautzellen**

unpaired t-test		
	P value	0,3035
	P value summary	ns
Kontrolle (0 % CSE) vs. 10 % CSE	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,100; df=8

**Tabelle 50: Messung der SNP- und CSE-abhängigen VEGF-Expression primärer Nasenschleimhautzellen**

	VEGF-Expression [% der Kontrolle]	
	Kontrolle	10 % CSE
<b>SNP -2578 AC</b>		
Patient 3	100,0	164,0
Patient 8	100,0	86,9
Patient 14	100,0	80,5
Patient 15	100,0	328,9
<b>Mittelwert</b>	<b>100,0</b>	<b>165,1</b>
<b>SD</b>	<b>0,0</b>	<b>115,6</b>
<b>SNP -460 CC</b>		
Patient 3	100,0	164,0
Patient 15	100,0	328,9
<b>Mittelwert</b>	<b>100,0</b>	<b>246,4</b>
<b>SD</b>	<b>0,0</b>	<b>116,5</b>
<b>SNP -460 CT</b>		
Patient 8	100,0	86,93
Patient 14	100,0	80,5
<b>Mittelwert</b>	<b>100,0</b>	<b>83,7</b>
<b>SNP +405 GG</b>		
Patient 3	100,0	164,0
Patient 8	100,0	86,9
<b>Mittelwert</b>	<b>100,0</b>	<b>125,5</b>

**Tabelle 51: Statistische Analyse der SNP- und CSE-abhängigen VEGF-Expression primärer Nasenschleimhautzellen**

unpaired t-test		-2578 AC
	P value	0,3422
	P value summary	ns
Kontrolle (0 % CSE) vs. 10 % CSE	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,126; df=3

**Tabelle 52: Messung der VEGF-Proteinkonzentration nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit 10 % CSE**

Material	VEGF-Protein [pg/ml]	
	Kontrolle	10 %
Patient 2	821,4	1159,3
Patient 3	371,5	312,1
Patient 4	133,9	59,0
Patient 8	619,6	614,6
Patient 10	855,7	983,6
Patient 11	1072,0	1306,2
Patient 12	1253,7	1147,4
Patient 13	738,2	699,9
Patient 16	856,9	1105,3
Patient 17	996,6	1029,3
<b>Mittelwert</b>	<b>771,9</b>	<b>841,7</b>
<b>SD</b>	<b>330,2</b>	<b>408,2</b>

**Tabelle 53: Messung der SNP-abhängigen VEGF-Proteinkonzentration nach Inkubation der primären Nasenschleimhautzellen mit 10 % CSE**

	VEGF-Protein [% der Kontrolle]	
	Kontrolle	10 % CSE
<b>SNP -2578 AA</b>		
Patient 4	133,9	59,0
<b>Mittelwert</b>	<b>133,9</b>	<b>59,0</b>
<b>SNP -2578 AC</b>		
Patient 3	371,5	312,1
Patient 8	619,6	614,6
Patient 10	855,7	983,6
Patient 11	1072,0	1306,2
Patient 12	1253,7	1147,4
Patient 13	738,2	699,9
Patient 16	856,9	1105,3
<b>Mittelwert</b>	<b>843,9</b>	<b>870,4</b>
<b>SD</b>	<b>296,7</b>	<b>344,2</b>
<b>SNP -460 CC</b>		
Patient 3	371,5	312,1
Patient 16	856,9	1105,3
<b>Mittelwert</b>	<b>613,6</b>	<b>647,8</b>
<b>SNP -460 CT</b>		
Patient 8	619,6	614,6
Patient 10	855,7	983,6
Patient 12	1253,7	1147,4
Patient 13	738,2	699,9
Patient 17	996,6	1029,3
<b>Mittelwert</b>	<b>908,1</b>	<b>974,7</b>
<b>SD</b>	<b>255,5</b>	<b>300,8</b>
<b>SNP +405 GG</b>		
Patient 3	371,5	312,1
Patient 8	619,6	614,6
Patient 12	1253,7	1147,4
<b>Mittelwert</b>	<b>748,3</b>	<b>691,4</b>
<b>SD</b>	<b>454,9</b>	<b>422,9</b>

**Tabelle 54: Messung der VEGF-Proteinkonzentration nach Inkubation der Zelllinien mit 10 % CSE**

A549	VEGF-Protein [pg/ml]					MW	SD
<b>Kontrolle</b>	713,9	692,4	376,0	1134,7	554,9	<b>692,4</b>	<b>218,9</b>
<b>10 % CSE</b>	567,2	901,3	407,4	929,0	566,5	<b>674,3</b>	<b>229,5</b>
HNSSCUM-02T	VEGF-Protein [pg/ml]					MW	SD
<b>Kontrolle</b>	1493,2	1962,0	1043,4			<b>1499,5</b>	<b>459,3</b>
<b>10 % CSE</b>	1671,6	1730,2	1063,6			<b>1488,5</b>	<b>369,1</b>



## Anhang VII: VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion und Inkubation der Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T

Tabelle 55: Messung der VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion der Zelllinien mit SNP-Reporterkonstrukten

<b>A549</b>	<b>relative Expression [% der Kontrolle]</b>			<b>MW</b>	<b>SD</b>
CMV-Promotor	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>
Vektor	0,1	0,4	0,1	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>
wt (ACC)	99,8	98,2	73,5	<b>90,5</b>	<b>14,7</b>
-460 (ATC)	99,4	86,4	107,9	<b>97,9</b>	<b>10,8</b>
-2578 (CCC)	68,4	63,4	101,9	<b>77,9</b>	<b>20,9</b>
+405 (ACG)	46,1	100,1	36,0	<b>60,7</b>	<b>34,5</b>
-460//+405 (ATG)	58,3	94,8	31,2	<b>61,4</b>	<b>31,9</b>
-2578//-460 (CTC)	77,9	56,1	81,5	<b>71,8</b>	<b>13,8</b>
-2578//+405 (CCG)	82,5	94,8	46,0	<b>74,4</b>	<b>25,4</b>
-2578//-460//+405 (CTG)	41,7	121,2	26,2	<b>60,0</b>	<b>45,8</b>
<b>HNSCCUM-02T</b>	<b>relative Expression [% der Kontrolle]</b>			<b>MW</b>	<b>SD</b>
CMV-Promotor	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
Vektor	0,0	0,0	1,4	<b>0,5</b>	<b>0,8</b>
wt (ACC)	91,3	152,5	113,3	<b>119,0</b>	<b>31,0</b>
-460 (ATC)	95,0	100,0	75,3	<b>90,1</b>	<b>13,1</b>
-2578 (CCC)	91,2	113,2	110,9	<b>105,1</b>	<b>12,1</b>
+405 (ACG)	84,9	106,7	139,0	<b>110,2</b>	<b>27,2</b>
-460//+405 (ATG)	119,3	62,0	94,2	<b>91,8</b>	<b>28,7</b>
-2578//-460 (CTC)	91,0	50,3	93,2	<b>78,2</b>	<b>24,1</b>
-2578//+405 (CCG)	104,1	101,6	89,9	<b>98,5</b>	<b>7,6</b>
-2578//-460//+405 (CTG)	106,5	58,7	80,9	<b>82,0</b>	<b>23,9</b>

**Tabelle 56: Statistische Analyse der VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion der Zelllinien**

<b>A549</b>		
unpaired t-test		
	P value	0,2411
	P value summary	ns
ACC (wt; 0 % CSE) vs. ACG (0 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,375; df=4
	P value	0,2247
	P value summary	ns
ACC (wt; 0 % CSE) vs. ATG (0 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,435; df=4
	P value	0,1837
	P value summary	ns
ACC (wt; 0 % CSE) vs. CTC (0 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,605; df=4
	P value	0,3339
	P value summary	ns
ACC (wt; 0 % CSE) vs. CTG (0 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,098; df=4
<b>HNSCCUM-02T</b>		
unpaired t-test		
	P value	0,2110
	P value summary	ns
ACC (wt; 0 % CSE) vs. ATC (0 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,488; df=4
	P value	0,3274
	P value summary	ns
ACC (wt; 0 % CSE) vs. ATG (0 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,115; df=4
	P value	0,1459
	P value summary	ns
ACC (wt; 0 % CSE) vs. CTC (0 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	1,802
	P value	0,3282
	P value summary	ns
ACC (wt; 0 % CSE) vs. CCG (0 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,113; df=4
	P value	0,1772
	P value summary	ns
ACC (wt; 0 % CSE) vs. CTG (0 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,636; df=4

**Tabelle 57: Messung der VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion und Inkubation der Zelllinien mit 10 % CSE**

<b>A549</b>	<b>relative Expression [% der Kontrolle]</b>			<b>MW</b>	<b>SD</b>
CMV-Promotor	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
Vektor	0,1	0,4	0,1	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>
wt (ACC)	64,2	116,6	79,9	<b>86,9</b>	<b>26,9</b>
-460 (ATC)	144,9	99,2	106,9	<b>117,0</b>	<b>24,5</b>
-2578 (CCC)	59,7	59,8	109,6	<b>76,4</b>	<b>28,8</b>
+405 (ACG)	45,0	89,7	28,2	<b>54,3</b>	<b>31,8</b>
-460//+405 (ATG)	58,1	96,6	37,1	<b>63,9</b>	<b>30,2</b>
-2578//-460 (CTC)	50,5	53,4	68,3	<b>57,4</b>	<b>9,5</b>
-2578//+405 (CCG)	92,4	94,9	43,5	<b>76,9</b>	<b>28,9</b>
-2578//-460//+405 (CTG)	52,4	104,6	19,8	<b>58,9</b>	<b>42,8</b>
<b>HNSCCUM-02T</b>	<b>relative Expression [% der Kontrolle]</b>			<b>MW</b>	<b>SD</b>
CMV-Promotor	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
Vektor	0,0	0,0	1,4	<b>0,5</b>	<b>0,8</b>
wt (ACC)	93,6	95,6	111,4	<b>100,2</b>	<b>9,7</b>
-460 (ATC)	96,0	113,7	132,8	<b>114,2</b>	<b>18,4</b>
-2578 (CCC)	85,6	133,0	94,5	<b>104,4</b>	<b>25,2</b>
+405 (ACG)	109,1	114,9	120,4	<b>114,8</b>	<b>5,6</b>
-460//+405 (ATG)	109,1	26,24	114,8	<b>83,4</b>	<b>49,6</b>
-2578//-460 (CTC)	73,3	52,4	93,2	<b>78,2</b>	<b>24,1</b>
-2578//+405 (CCG)	100,1	65,3	81,4	<b>82,2</b>	<b>17,4</b>
-2578//-460//+405 (CTG)	99,2	46,0	140,1	<b>95,1</b>	<b>47,2</b>

**Tabelle 58: Statistische Analyse der VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion und Inkubation der Zelllinien mit 10 % CSE**

<b>A549</b>		
unpaired t-test		
	P value	0,2249
ACC (wt; 10 % CSE) vs. ATC (10 % CSE)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,434; df=4
	P value	0,2465
ACC (wt; 10 % CSE) vs. ACG (10 % CSE)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,356; df=4
	P value	0,3808
ACC (wt; 10 % CSE) vs. ATG (10 % CSE)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=0,9840; df=4
	P value	0,1479
ACC (wt; 10 % CSE) vs. CTC (10 % CSE)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,791; df=4
	P value	0,3918
ACC (wt; 10 % CSE) vs. CTG (10 % CSE)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=0,9592; df=4
<b>HNSCCUM-02T</b>		
unpaired t-test		
	P value	0,2178
ACC (wt; 10 % CSE) vs. ATC (10 % CSE)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,461; df=4
	P value	0,1933
ACC (wt; 10 % CSE) vs. ACG (10 % CSE)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,562; df=4
	P value	0,1479
ACC (wt; 10 % CSE) vs. CTC (10 % CSE)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,791; df=4

In der folgenden Tabelle sind die in Tabelle 55 sowie in Tabelle 57 angegebenen Mittelwerte zur genotypspezifischen Untersuchung des Einflusses des CSE gegenübergestellt.

**Tabelle 59: Gegenüberstellung der VEGF-Promotoraktivität der transfizierten Zellen nach Inkubation mit CSE und der unbehandelten Kontrolle**

A549	relative Expression [% der Kontrolle]			
	0 % CSE		10 % CSE	
	MW	SD	MW	SD
CMV-Promotor	100,0	100,0	100,0	0,0
Vektor	0,2	0,1	0,2	0,1
<i>wt</i> (ACC)	90,5	14,7	86,9	26,9
-460 (ATC)	97,9	10,8	117,0	24,5
-2578 (CCC)	77,9	20,9	76,4	28,8
+405 (ACG)	60,7	34,5	54,3	31,8
-460//+405 (ATG)	61,4	31,9	63,9	30,2
-2578//-460 (CTC)	71,8	13,8	57,4	9,5
-2578//+405 (CCG)	74,4	25,4	76,9	28,9
-2578//-460//+405 (CTG)	60,0	45,8	58,9	42,8

HNSCCUM-02T	relative Expression [% der Kontrolle]			
	0 % CSE		10 % CSE	
	MW	SD	MW	SD
CMV-Promotor	100,0	0,0	100,0	0,0
Vektor	0,5	0,8	0,5	0,8
<i>wt</i> (ACC)	119,0	31,0	100,2	9,7
-460 (ATC)	90,1	13,1	114,2	18,4
-2578 (CCC)	105,1	12,1	104,4	25,2
+405 (ACG)	110,2	27,2	114,8	5,6
-460//+405 (ATG)	91,8	28,7	83,4	49,6
-2578//-460 (CTC)	78,2	24,1	78,2	24,1
-2578//+405 (CCG)	98,5	7,6	82,2	17,4
-2578//-460//+405 (CTG)	82,0	23,9	95,1	47,2

**Tabelle 60: Statistische Analyse der VEGF-Promotoraktivität der transfizierten Zellen nach Inkubation mit CSE im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle**

<b>A549</b>		
unpaired t-test		
	P value	0,2835
	P value summary	ns
ATC (0 % CSE) vs. ATC (10 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,238; df=4
	P value	0,2097
	P value summary	ns
CTC (0 % CSE) vs. CTC (10 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,493; df=4
<b>HNSCCUM-02T</b>		
unpaired t-test		
	P value	0,3727
	P value summary	ns
ACC (0 % CSE) vs. ACC (10 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,003; df=4
	P value	0,1389
	P value summary	ns
ATC (0 % CSE) vs. ATC (10 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,844; df=4
	P value	0,2119
	P value summary	ns
CCG (0 % CSE) vs. CCG (10 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,484; df=4

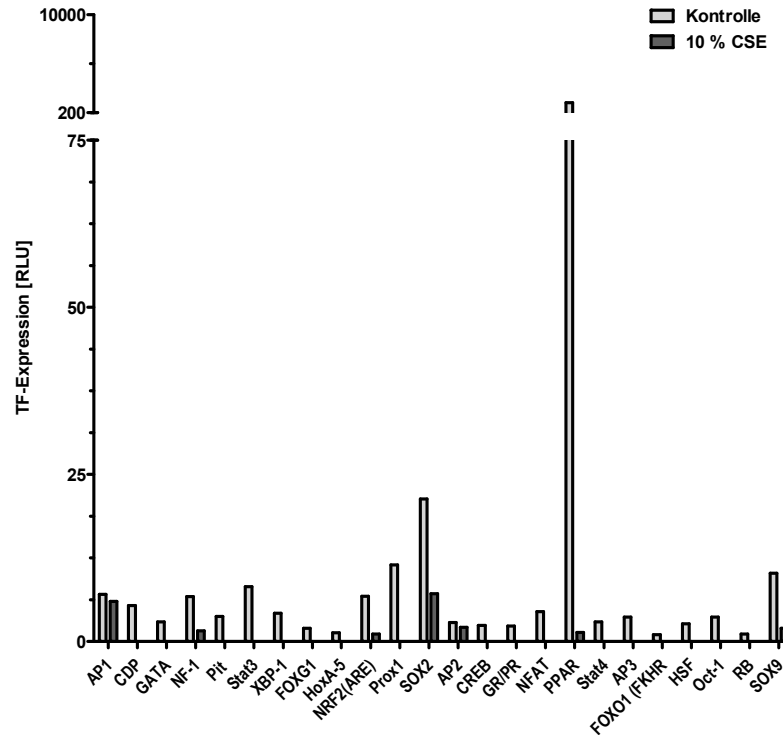
**Tabelle 61: Messung der VEGF-Promotoraktivität der transfizierten Zellen nach Inkubation mit CSE und der unbehandelten Kontrolle auf Proteinebene**

A549	Protein [% des CMV-Promotors]	
	0 % CSE	10 % CSE
CMV-Promotor	100,0	
<i>wt</i> (ACC)	128,7	272,6
-460 (ATC)	40,9	68,0
-2578 (CCC)	136,7	154,7
+405 (ACG)	142,6	217,2
-460//+405 (ATG)	109,5	126,3
-2578//-460 (CTC)	87,2	27,4
-2578//+405 (CCG)	54,1	68,9
-2578//-460//+405 (CTG)	50,6	121,2
HNSCCUM-02T	Protein [% des CMV-Promotors]	
	0 % CSE	10 % CSE
CMV-Promotor	100,0	
<i>wt</i> (ACC)	56,1	34,5
-460 (ATC)	58,3	104,2
-2578 (CCC)	69,7	76,9
+405 (ACG)	137,2	109,1
-460//+405 (ATG)	101,5	104,9
-2578//-460 (CTC)	43,5	35,6
-2578//+405 (CCG)	61,6	85,6
-2578//-460//+405 (CTG)	80,2	67,4

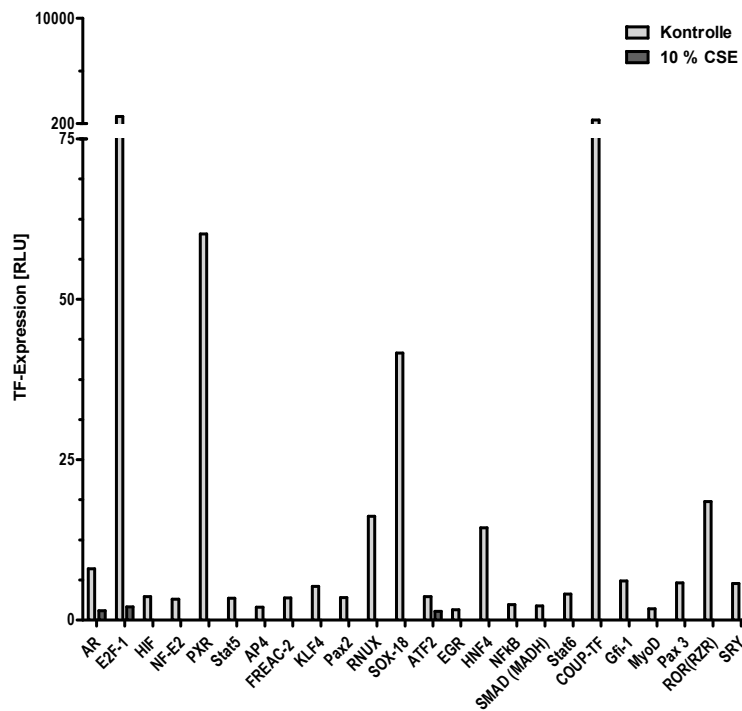
## Anhang VIII: SNP- und CSE-abhängige Regulation auf transkriptioneller Ebene

Im Rahmen des TF-Arrays wurden 95 TFs parallel untersucht. Zur besseren Veranschaulichung werden die Ergebnisse im Folgenden vergrößert dargestellt.

### Transkriptionsfaktor-Array nach Inkubation mit 10 % CSE; Teil I

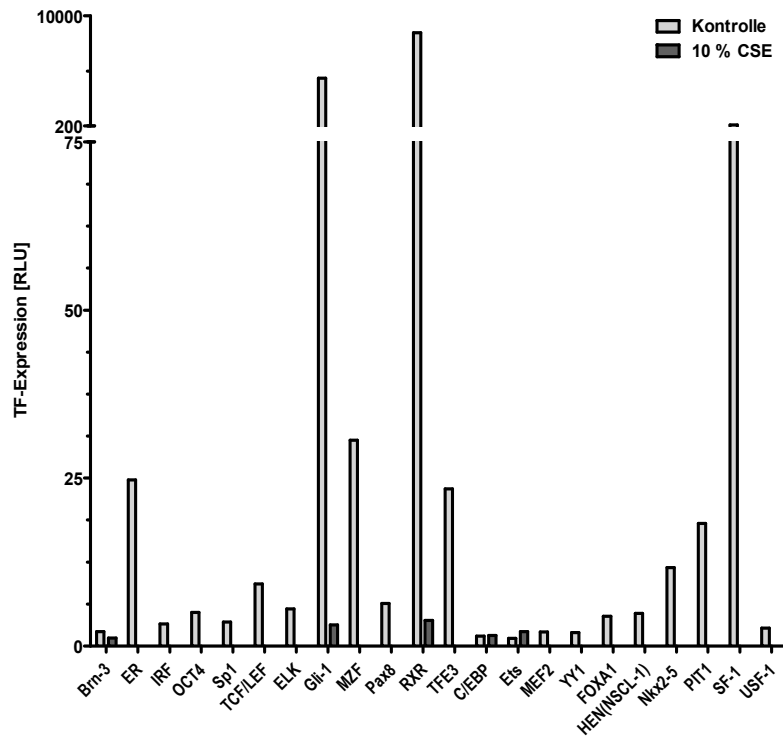


### Transkriptionsfaktor-Array nach Inkubation mit 10 % CSE; Teil II





Transkriptionsfaktor-Array nach Inkubation mit 10 % CSE; Teil III



Transkriptionsfaktor-Array nach Inkubation mit 10 % CSE; Teil IV

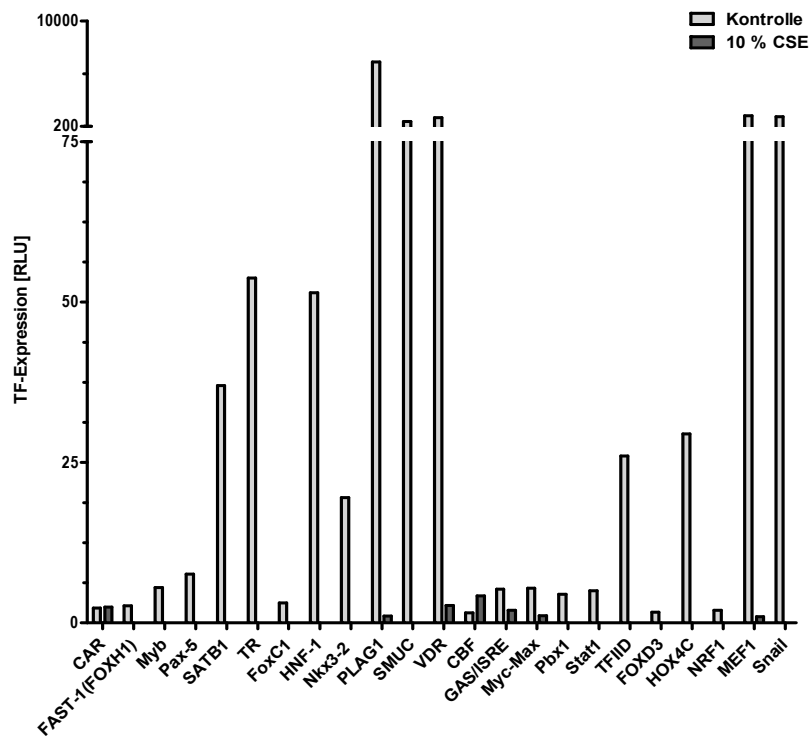


Tabelle 62: Messung der TF-Expression nach Inkubation mit CSE

Transkriptionsfaktor	Kontrolle	10% CSE	Transkriptionsfaktor	Kontrolle	10% CSE
AP1	7,1	6,0	NF-E2	3,3	NN
AP2	2,9	2,1	NFkB	2,4	NN
AP3	3,7	NN	Nkx2-5	11,7	NN
AP4	2,0	NN	Nkx3-2	19,6	NN
AR	8,0	1,4	NRF2(ARE)	6,8	1,1
ATF2	3,7	1,4	Oct-1	3,7	NN
Brn-3	2,2	1,2	OCT4	5,0	NN
C/EBP	1,5	1,6	P53	NN	NN
CAR	2,4	2,5	Pax3	5,8	NN
CBF	1,6	4,3	Pax2	3,5	NN
CDP	5,4	NN	Pax5	7,7	NN
COUP-TF	542,0	NN	Pax8	6,4	NN
CREB	2,4	NN	Pbx1	4,5	NN
E2F-1	853,0	2,1	Pit	3,8	NN
EGR	1,6	NN	PIT1	18,3	NN
ELK	5,6	NN	PLAG1	6.205,0	1,1
ER	24,7	NN	PPAR	1.182,5	1,4
Ets	1,2	2,1	Prox1	11,5	NN
FAST-1 (FOXH1)	2,7	NN	PXR	60,2	NN
FOXA1	4,5	NN	Rb	1,1	NN
FOXC1	3,1	NN	RNUX	16,2	NN
FOXD3	1,7	NN	ROR (RZR)	18,5	NN
FOXG1	2,0	NN	RXR	8.510,0	3,8
FOXO1	1,1	NN	SATB1	37,0	NN
FREAC-2	3,5	NN	SF-1	279,5	NN
GAS/ISRE	5,3	2,0	SMAD (MADH)	2,2	NN
GATA	2,95	NN	SMUC	659,5	NN
Gfi-1	6,1	NN	Snail	1.095,0	NN
Gli-1	4.456,0	3,2	SOX18	41,6	NN
GR/PR	2,4	NN	SOX2	21,4	7,1
HEN(NSCL-1)	4,9	NN	SOX9	10,2	2,0
HIF	3,7	NN	Sp1	3,6	NN
HNF-1	51,5	NN	SRF	NN	NN
HNF4	14,4	NN	SRY	5,7	NN
HOX4C	29,5	NN	Stat1	5,1	NN
HoxA-5	1,3	NN	Stat3	8,2	NN
HSF	2,7	NN	Stat4	3,0	NN
IRF	3,3	NN	Stat5	3,4	NN
KLF4	5,3	NN	Stat6	4,1	NN
MEF1	1.190,0	1,0	TCF/LEF	9,3	NN
MEF2	2,1	NN	TFE3	23,4	NN
Myb	5,6	NN	TFIID	26,0	NN
Myc-Max	5,5	1,2	TR	53,8	NN
MyoD	1,8	NN	USF-1	2,7	NN
MZF	30,7	NN	VDR	993,5	NN
NF-1	6,8	1,6	XBP-1	4,3	NN
NFAT	4,5	NN	YY1	2,0	NN

Tabelle 63: CSE-abhängige Regulation der MZF1-Translation

A549				MW	SD
Kontrolle	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
10 % CSE	79,5	100,7	60,6	<b>80,3</b>	<b>20,1</b>
HNSCCUM-02T				MW	SD
Kontrolle	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
10 % CSE	19,6	123,1	169,4	<b>71,4</b>	<b>73,2</b>

Tabelle 64: Statistische Analyse des Einflusses der CSE-abhängigen MZF1-Regulation

A549		
Unpaired t-test		
P Value		0,2307
P value summary		ns
singnificantly different? (P<0,05)		nein
t, df		t=1,703; df=2
HNSCCUM-02T		
Unpaired t-test		
P Value		0,9357
P value summary		ns
singnificantly different? (P<0,05)		nein
t, df		t=0,0910; df=2

Tabelle 65: Messung der SNP-abhängigen MZF1-Bindungsspezifität

A549		Bindungsspezifität [% des wt]				MW	SD
<b>+405 C (wt)</b>	Kontrolle	100,0	100,0	100,0		<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	10 % CSE	169,8	90,3	237,6		<b>165,9</b>	<b>73,7</b>
<b>+405 G (SNP)</b>	Kontrolle	295,1	136,2	213,6		<b>215,0</b>	<b>79,5</b>
	10 % CSE	350,1	110,5	334,3		<b>265,0</b>	<b>134,0</b>
HNSCCUM-02T		Bindungsspezifität [% des wt]				MW	SD
<b>+405 C (wt)</b>	Kontrolle	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	10 % CSE	10,7	36,6	121,2	79,0	<b>61,9</b>	<b>48,5</b>
<b>+405 G (SNP)</b>	Kontrolle	60,8	61,1	58,9	88,5	<b>67,3</b>	<b>14,2</b>
	10 % CSE	155,1	59,5	136,0	116,3	<b>116,7</b>	<b>41,3</b>

**Tabelle 66: Statistische Analyse der SNP-abhängigen MZF1-Bindungsspezifität**

<b>A549</b>		
unpaired t-test		
	P value	0,1963
+405 C (wt; 0 % CSE) vs. +405 C (wt; 10 % CSE)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,549; df=4
	<hr/>	
	P value	0,0664
+405 C (0 % CSE) vs. +405 G (0 % CSE)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=2,506; df=4
	<hr/>	
<b>HNSCCUM-02T</b>		
unpaired t-test		
	P value	0,2450
+405 C (wt; 0 % CSE) vs. +405 C (wt; 10 % CSE)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,362; df=4
	<hr/>	
	P value	0,1216
+405 G (0 % CSE) vs. +405 G (10 % CSE)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,960; df=4
	<hr/>	
	P value	0,0162
+405 C (0 % CSE) vs. +405 G (0 % CSE)	P value summary	*
	Significantly different? (P<0,05)	ja
	t; df	t=3,997; df=4
	<hr/>	

Tabelle 67: Messung der Effektivität des MZF1-*knock down* mittels siRNA

<b>A549</b>				<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>Kontrolle</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>knock down</b>	59,3	74,8	33,6	<b>55,9</b>	<b>20,8</b>
<b>HNSCCUM-02T</b>				<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>Kontrolle</b>	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>knock down</b>	80,6	38,2	81,5	<b>66,8</b>	<b>24,7</b>

Tabelle 68: Statistische Analyse der Effektivität des MZF1-*knock down* mittels siRNA

<b>A549</b>		
unpaired t-test		
	P value	0,0213
	P value summary	*
+405 C (wt; 0 % CSE) vs. +405 C (wt; 10 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	ja
	t; df	t=3,072; df=4
<b>HNSCCUM-02T</b>		
unpaired t-test		
	P value	0,0804
	P value summary	ns
+405 C (wt; 0 % CSE) vs. +405 C (wt; 10 % CSE)	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=2,328; df=4

**Tabelle 69: Messung der SNP-abhängigen VEGF-Promotoraktivität nach MZF1-knock down (qRT-PCR)**

<b>A549</b>			<b>relative Expression [% des CMV]</b>				<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>CMV</b>			100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>Vektor</b>			0,03	0,13	0,24		<b>0,14</b>	<b>0,10</b>
<b>+405 C (wt)</b>	<b>+MZF1</b>	Kontrolle	71,3	91,6	61,2		<b>74,7</b>	<b>15,5</b>
		10 % CSE	83,8	97,2	70,0		<b>83,7</b>	<b>13,6</b>
	<b>-MZF1</b>	Kontrolle	89,5	102,9	55,3		<b>82,6</b>	<b>24,5</b>
		10 % CSE	127,9	151,8	76,5		<b>118,7</b>	<b>38,5</b>
<b>+405 G</b>	<b>+MZF1</b>	Kontrolle	82,5	92,1	81,0		<b>85,2</b>	<b>6,0</b>
		10 % CSE	76,2	51,8	102,6		<b>76,9</b>	<b>25,4</b>
	<b>-MZF1</b>	Kontrolle	86,8	88,0	50,5		<b>75,1</b>	<b>21,3</b>
		10 % CSE	82,6	70,6	90,4		<b>81,2</b>	<b>10,0</b>
<b>HNSCCUM-02T</b>			<b>relative Expression [% des CMV]</b>				<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>CMV</b>			100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
<b>Vektor</b>			0,01	0,04	1,4	5,0	<b>1,6</b>	<b>2,3</b>
<b>+405 C (wt)</b>	<b>+MZF1</b>	Kontrolle	91,3	152,5	113,6	46,6	<b>100,9</b>	<b>44,2</b>
		10 % CSE	93,6	95,6	111,4	101,8	<b>100,6</b>	<b>8,0</b>
	<b>-MZF1</b>	Kontrolle	45,0	50,0	29,2	96,9	<b>55,3</b>	<b>29,1</b>
		10 % CSE	47,4	93,2	49,9	68,1	<b>64,7</b>	<b>21,2</b>
<b>+405 G</b>	<b>+MZF1</b>	Kontrolle	84,9	106,7	139,0	94,2	<b>106,2</b>	<b>23,6</b>
		10 % CSE	109,1	114,9	120,4	139,2	<b>120,9</b>	<b>13,1</b>
	<b>-MZF1</b>	Kontrolle	18,2	63,3	19,2	43,0	<b>35,9</b>	<b>21,5</b>
		10 % CSE	30,0	40,2	60,4	134,2	<b>66,2</b>	<b>47,1</b>

**Tabelle 70: Statistische Analyse der SNP-abhängigen VEGF Promotoraktivität nach MZF1-knock down (qRT-PCR)**

<b>A549</b>		
unpaired t-test		
	P value	0,2422
+405 C (0 % CSE; -MZF1) vs. +405 C (10 % CSE; -MZF1)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,371; df=4
<b>HNSCCUM-02T</b>		
unpaired t-test		
	P value	0,2099
+405 C (0 % CSE; +MZF1) vs. +405 C (0 % CSE; -MZF1)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,492; df=4
	P value	0,0189
+405 G (0 % CSE; +MZF1) vs. +405 G (0 % CSE; -MZF1)	P value summary	*
	Significantly different? (P<0,05)	ja
	t; df	t=3,814; df=4
	P value	0,1242
+405 G (10 % CSE; +MZF1) vs. +405 G (10 % CSE; -MZF1)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,941; df=4
	P value	0,3679
+405 G (0 % CSE; -MZF1) vs. +405 G (10 % CSE; -MZF1)	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,014; df=4

**Tabelle 71: Messung der SNP-abhängigen VEGF-Expression nach MZF1-knock down (Western Blot)**

<b>A549</b>	<b>wt (+405 C)</b>		<b>wt (+405 C)</b>		<b>+405 G</b>		<b>+405 G</b>	
<b>CSE</b>	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>MZF1</b>	+	+	-	-	+	+	-	-
<b>relatives Protein [% des CMV]</b>								
<b>n=1</b>	100,0	120,1	113,1	107,0	100,0	135,6	127,7	63,8
<b>n=2</b>	100,0	144,7	525,4	1112,5	100,0	28,5	62,4	60,6
<b>MW</b>	<b>100,0</b>	<b>132,4</b>	<b>319,2</b>	<b>609,7</b>	<b>100,0</b>	<b>82,0</b>	<b>95,0</b>	<b>62,2</b>
<b>HNSCCUM-02T</b>	<b>wt (+405 C)</b>		<b>wt (+405 C)</b>		<b>+405 G</b>		<b>+405 G</b>	
<b>CSE</b>	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>MZF1</b>	+	+	-	-	+	+	-	-
<b>relatives Protein [% des CMV]</b>								
<b>n=1</b>	100,0	61,5	68,9	71,4	100,0	79,6	78,3	48,3
<b>MW</b>	<b>100,0</b>	<b>61,5</b>	<b>68,9</b>	<b>71,4</b>	<b>100,0</b>	<b>79,6</b>	<b>78,3</b>	<b>48,3</b>



## Anhang IX: SNP-abhängige mRNA-Stabilität

Tabelle 72: Messung der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität (qRT-PCR)

A549		relative Expression [% der Kontrolle]				MW	SD	
<i>wt</i> (3'-UTR)	Kontrolle	0 h	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
		1 h	59,6	56,6	47,5	65,2	57,3	7,4
		2 h	55,7	66,9	50,2	80,3	63,3	13,3
		4 h	43,2	34,8	37,5	64,0	44,9	13,2
		8 h	34,3	38,4	28,3	77,2	44,6	22,1
		24 h	41,1	21,4	40,3	43,0	36,5	10,1
	10 % CSE	0 h	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
		1 h	48,9	81,3	47,4	75,2	63,2	17,6
		2 h	61,2	67,2	48,8	38,3	53,9	12,9
		4 h	50,1	56,1	54,8	37,9	49,7	8,3
		8 h	36,3	78,2	41,3	43,6	49,9	19,1
		24 h	41,1	93,1	47,4	29,3	52,7	27,9
SNP +936	Kontrolle	0 h	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
		1 h	104,0	46,0	127,0	45,7	80,7	41,3
		2 h	64,2	70,5	79,2	28,9	60,7	22,1
		4 h	37,7	50,6	30,8	28,2	36,8	10,0
		8 h	78,1	42,2	63,2	21,5	51,2	24,7
		24 h	66,7	48,8	82,4	21,5	54,9	26,1
	10 % CSE	0 h	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		1 h	14,9	67,7	14,6	17,9	28,8	26,0
		2 h	49,9	43,8	39,0	24,6	39,3	10,8
		4 h	33,7	31,9	23,3	15,4	26,1	8,4
		8 h	30,5	3,8	15,3	20,4	17,5	11,1
		24 h	27,4	4,7	28,8	43,8	26,2	16,1

Fortsetzung Tabelle 72: Messung der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität (qRT-PCR)

HNSCCUM-02T		relative Expression [% der Kontrolle]				MW	SD	
<b>wt (3'-UTR)</b>	<b>0 h</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>	
	<b>Kontrolle</b>	<b>1 h</b>	95,3	65,0	55,8	49,1	<b>66,3</b>	<b>20,4</b>
		<b>2 h</b>	81,1	33,1	48,5	65,2	<b>57,0</b>	<b>20,7</b>
		<b>4 h</b>	104,8	16,3	27,7	39,9	<b>47,2</b>	<b>39,6</b>
		<b>8 h</b>	25,9	10,8	10,4	10,3	<b>14,3</b>	<b>7,7</b>
		<b>0 h</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	<b>10 % CSE</b>	<b>1 h</b>	94,0	41,6	78,4	75,6	<b>72,4</b>	<b>22,1</b>
		<b>2 h</b>	36,1	16,4	43,7	60,9	<b>39,3</b>	<b>18,4</b>
		<b>4 h</b>	138,9	12,1	19,2	26,8	<b>49,3</b>	<b>60,1</b>
		<b>8 h</b>	109,9	12,3	10,8	12,1	<b>36,3</b>	<b>49,1</b>
<b>SNP +936</b>		<b>0 h</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	<b>Kontrolle</b>	<b>1 h</b>	84,3	87,0	82,8	45,9	<b>75,0</b>	<b>19,5</b>
		<b>2 h</b>	74,1	123,9	64,5	42,8	<b>76,3</b>	<b>34,3</b>
		<b>4 h</b>	31,4	17,8	50,4	27,7	<b>31,8</b>	<b>13,7</b>
		<b>8 h</b>	52,0	13,9	17,7	9,6	<b>23,3</b>	<b>19,4</b>
		<b>0 h</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
	<b>10 % CSE</b>	<b>1 h</b>	75,2	61,1	89,0	103,5	<b>82,2</b>	<b>18,2</b>
		<b>2 h</b>	43,0	41,8	63,9	76,1	<b>56,2</b>	<b>16,7</b>
		<b>4 h</b>	52,3	22,8	34,6	36,6	<b>36,6</b>	<b>12,1</b>
		<b>8 h</b>	27,8	12,3	15,1	13,7	<b>17,2</b>	<b>7,2</b>

Tabelle 73: Statistische Analyse der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität (qRT-PCR)

A549					
One-way analysis of variance					
P value					
<0,0001					
P value summary					
***					
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)					
ja					
R square					
0,7769					
wt (0 %)	Bonferroni's Multiple Comparison Test				
		Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary
	0 h vs. 1 h	42,75	11,91-73,59	ja	**
	0 h vs. 2 h	36,73	5,887-67,57	ja	*
	0 h vs. 4 h	55,12	24,28-85,96	ja	***
	0 h vs. 8 h	55,45	24,61-86,29	ja	***
0 h vs. 24 h	63,54	32,70-94,38	ja	***	
One-way analysis of variance					
P value					
0,0034					
P value summary					
**					
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)					
ja					
R square					
0,5991					
wt (10 %)	Bonferroni's Multiple Comparison Test				
		Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary
	0 h vs. 1 h	36,81	-3,314-76,93	nein	ns
	0 h vs. 2 h	46,12	5,996-86,24	ja	*
	0 h vs. 4 h	50,28	10,16-90,40	ja	**
	0 h vs. 8 h	50,14	10,02-90,26	ja	**
0 h vs. 24 h	47,28	7,156-87,40	ja	*	
One-way analysis of variance					
P value					
0,0235					
P value summary					
*					
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)					
ja					
R square					
0,4886					
+936 C/T (0 %)	Bonferroni's Multiple Comparison Test				
		Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary
	0 h vs. 1 h	19,35	-39,08-77,78	nein	ns
	0 h vs. 2 h	39,31	-19,12-97,74	nein	ns
	0 h vs. 4 h	63,18	4,747-121,6	ja	*
	0 h vs. 8 h	48,77	-9,663-107,2	nein	ns
0 h vs. 24 h	45,15	-13,27-103,6	nein	ns	
One-way analysis of variance					
P value					
<0,0001					
P value summary					
***					
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)					
ja					
R square					
0,8316					
+936 C/T (10 %)	Bonferroni's Multiple Comparison Test				
		Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary
	0 h vs. 1 h	71,22	37,76-105,7	ja	***
	0 h vs. 2 h	60,67	26,21-95,13	ja	***
	0 h vs. 4 h	73,94	39,48-108,4	ja	***
	0 h vs. 8 h	82,52	48,06-117,0	ja	****
0 h vs. 24 h	73,82	39,36-108,3	ja	***	

**Fortsetzung Tabelle 74: Statistische Analyse der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität (qRT-PCR)**

<b>HNSCCUM-02T</b>					
<b>wt (0 %)</b>	One-way analysis of variance				
	P value	0,0013			
	P value summary	**			
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)	ja			
	R square	0,6749			
	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary
	0 h vs. 1 h	33,71	-17,98-85,40	nein	ns
	0 h vs. 2 h	43,01	-8,682-94,70	nein	ns
	0 h vs. 4 h	52,82	1,128-104,5	ja	*
	0 h vs. 8 h	85,68	33,99-137,4	ja	***
<b>wt (10 %)</b>	One-way analysis of variance				
	P value	0,1331			
	P value summary	ns			
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)	nein			
	R square	0,3577			
	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary
	0 h vs. 1 h	27,62	-58,36-113,6	nein	ns
	0 h vs. 2 h	60,73	-25,25-146,7	nein	ns
	0 h vs. 4 h	50,75	-35,23-136,7	nein	ns
	0 h vs. 8 h	63,73	-22,25-149,7	nein	ns
<b>+936 C/T (0 %)</b>	One-way analysis of variance				
	P value	0,0004			
	P value summary	***			
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)	ja			
	R square	0,7264			
	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary
	0 h vs. 1 h	25,00	-22,85-72,85	nein	ns
	0 h vs. 2 h	23,69	-24,16-71,54	nein	ns
	0 h vs. 4 h	68,18	20,33-116,0	ja	**
	0 h vs. 8 h	76,68	28,83-124,5	ja	***
<b>+936 C/T (10 %)</b>	One-way analysis of variance				
	P value	<0,0001			
	P value summary	***			
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)	ja			
	R square	0,8805			
	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary
	0 h vs. 1 h	17,81	-11,75-47,37	nein	ns
	0 h vs. 2 h	43,80	14,24-73,36	ja	**
	0 h vs. 4 h	63,41	33,85-92,97	ja	***
	0 h vs. 8 h	82,76	53,22-112,3	ja	***

Tabelle 74: Messung der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität (GFP-ELISA)

A549		GFP-Protein [% der Kontrolle]			MW	SD	
<b>wt (3'-UTR)</b>	Kontrolle	0h	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
		1h	0,0	89,5	174,7	<b>88,1</b>	<b>87,3</b>
		4h	0,0	95,9	104,3	<b>66,7</b>	<b>58,0</b>
	10 % CSE	0h	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
		1h	101,4	52,7	54,6	<b>69,6</b>	<b>27,6</b>
		4h	205,0	198,4	59,6	<b>154,3</b>	<b>82,1</b>
<b>SNP +936</b>	Kontrolle	0h	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
		1h	2,2	46,0	68,5	<b>38,9</b>	<b>33,7</b>
		4h	0,0	75,9	63,7	<b>46,5</b>	<b>40,7</b>
	10 % CSE	0h	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
		1h	505,8	76,4	113,4	<b>219,5</b>	<b>250,6</b>
		4h	761,7	163,5	81,1	<b>362,9</b>	<b>355,1</b>
HNSCCUM-02T		GFP-Protein [% der Kontrolle]			MW	SD	
<b>wt (3'-UTR)</b>	Kontrolle	0h	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
		1h	130,4	92,1	38,9	<b>65,0</b>	<b>38,3</b>
		4h	304,8	62,6	31,8	<b>47,2</b>	<b>21,8</b>
	10 % CSE	0h	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
		1h	153,1	153,1	181,5	<b>269,1</b>	<b>176,9</b>
		4h	339,8	261,4	274,2	<b>267,8</b>	<b>9,0</b>
<b>SNP +936</b>	Kontrolle	0h	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
		1h	143,7	16,7	27,0	<b>21,9</b>	<b>7,3</b>
		4h	132,8	15,6	5,9	<b>10,7</b>	<b>6,9</b>
	10 % CSE	0h	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
		1h	114,5	65,6	90,0	<b>77,8</b>	<b>17,3</b>
		4h	44,1	36,9	34,8	<b>35,9</b>	<b>1,4</b>

**Tabelle 75: Statistische Analyse der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität (GFP-ELISA)**

<b>A549</b>					
<b>wt (0 %)</b>	One-way analysis of variance				
	P value				0,7992
	P value summary				ns
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
	R square				0,0720
	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary
0 h vs. 1 h	11,95	-150,4-174,3	nein	ns	
0 h vs. 4 h	33,26	-129,1-195,6	nein	ns	
<b>wt (10 %)</b>	One-way analysis of variance				
	P value				0,1911
	P value summary				ns
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
	R square				0,4240
	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary
0 h vs. 1 h	30,40	-103,8-164,6	nein	ns	
0 h vs. 4 h	-54,30	-188,5-79,93	nein	ns	
<b>+936 C/T (0 %)</b>	One-way analysis of variance				
	P value				0,0952
	P value summary				ns
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
	R square				0,5434
	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary
0 h vs. 1 h	61,11	-20,83-143,1	nein	ns	
0 h vs. 4 h	53,50	-28,44-135,4	nein	ns	
<b>+936 C/T (10 %)</b>	One-way analysis of variance				
	P value				0,4823
	P value summary				ns
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
	R square				0,2158
	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary
0 h vs. 1 h	-119,5	-793,0-554,0	nein	ns	
0 h vs. 4 h	-262,9	-936,4-410,6	nein	ns	

**Fortsetzung Tabelle 75: Statistische Analyse der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität (GFP-ELISA)**

<b>HNSCCUM-02T</b>					
<b>One-way analysis of variance</b>					
<b>wt (0 %)</b>	P value				0,1059
	P value summary				ns
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
	R square				0,5269
	<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95 %CI</b>	<b>signifikant?</b>	<b>summary</b>
0 h vs. 1 h	35,01	-33,30-103,3	nein	ns	
0 h vs. 4 h	52,79	-15,52-121,1	nein	ns	
<b>One-way analysis of variance</b>					
<b>wt (10 %)</b>	P value				0,1447
	P value summary				ns
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
	R square				0,4750
	<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95 %CI</b>	<b>signifikant?</b>	<b>summary</b>
0 h vs. 1 h	-169,1	-443,5-105,4	nein	ns	
0 h vs. 4 h	-167,8	-442,2-106,6	nein	ns	
<b>One-way analysis of variance</b>					
<b>+936 C/T (0 %)</b>	P value				<0,0001
	P value summary				***
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				ja
	R square				0,9861
	<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95 %CI</b>	<b>signifikant?</b>	<b>summary</b>
0 h vs. 1 h	78,14	62,64-93,64	ja	***	
0 h vs. 4 h	89,26	73,76-104,8	ja	***	
<b>One-way analysis of variance</b>					
<b>+936 C/T (10 %)</b>	P value				0,0006
	P value summary				***
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				ja
	R square				0,9139
	<b>Bonferroni's Multiple Comparison Test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95 %CI</b>	<b>signifikant?</b>	<b>summary</b>
0 h vs. 1 h	22,23	-4,611-49,07	nein	ns	
0 h vs. 4 h	64,15	37,31-90,99	nein	ns	

Tabelle 76: Messung der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität (Western Blot)

A549		GFP-Protein [% 0 h]			MW	SD	
<i>wt</i> (3'-UTR)	Kontrolle	0 h	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
		1 h	49,0	149,3	84,5	94,2	41,5
		2 h	19,7	73,3	109,2	67,4	36,8
		4 h	15,5	40,2	134,5	63,4	51,3
	10 % CSE	0 h	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
		1 h	8,2	111,6	63,0	60,9	42,2
		2 h	17,1	91,7	60,2	56,4	30,6
		4 h	3,4	72,2	37,2	37,6	28,1
SNP +936	Kontrolle	0 h	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
		1 h	55,5	89,4	113,9	86,3	23,9
		2 h	23,8	125,6	240,2	129,9	88,4
		4 h	32,3	77,5	205,4	105,1	73,3
	10 % CSE	0 h	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
		1 h	63,9	84,3	78,4	75,6	8,6
		2 h	52,3	85,2	82,1	73,2	14,8
		4 h	39,7	49,9	60,3	49,9	8,4
HNSCCUM-02T		GFP-Protein [% 0 h]			MW	Range	
<i>wt</i> (3'-UTR)	Kontrolle	0 h	100,0	100,0		100,0	0,0
		1 h	129,0	124,6		126,8	4,3
		2 h	51,6	253,4		152,5	201,8
		4 h	79,5	356,1		217,8	276,6
	10 % CSE	0 h	100,0	100,0		100,0	0,0
		1 h	107,5	162,4		134,9	54,9
		2 h	37,6	55,7		46,7	18,1
		4 h	66,6	51,8		59,2	14,8
SNP +936	Kontrolle	0 h	100,0	100,0		100,0	0,0
		1 h	51,1	11,6		31,4	39,6
		2 h	102,3	30,5		66,4	71,8
		4 h	85,0	30,6		57,8	54,4
	10 % CSE	0 h	100,0	100,0		100,0	0,0
		1 h	147,6	66,3		106,9	81,3
		2 h	91,1	203,1		147,1	112,0
		4 h	77,3	199,3		138,3	122,1



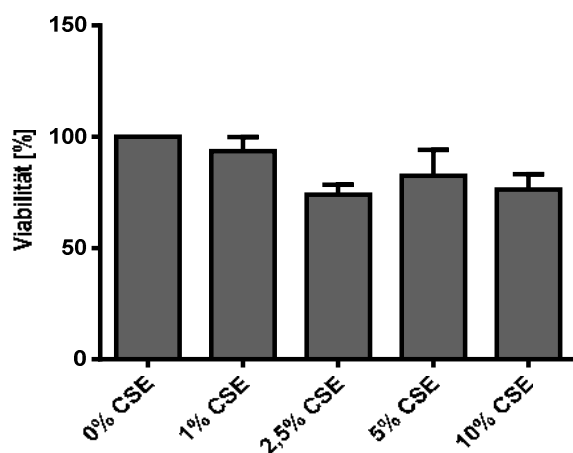
**Tabelle 77: Statistische Analyse der SNP-abhängigen mRNA-Stabilität (Western Blot)**

<b>A549</b>						
One-way analysis of variance						
<b>wt (0 %)</b>	P value					0,5668
	P value summary					ns
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)					nein
	R square					0,2130
	Bonferroni`s Multiple Comparison Test	Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary	
0 h vs. 1 h	5,800	-87,22-98,82	nein	ns		
0 h vs. 2 h	32,60	-60,42-125,6	nein	ns		
0 h vs. 4 h	36,60	-56,42-129,6	nein	ns		
One-way analysis of variance						
<b>wt (10 %)</b>	P value					0,1486
	P value summary					ns
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)					nein
	R square					0,4684
	Bonferroni`s Multiple Comparison Test	Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary	
0 h vs. 1 h	39,10	-33,81-112,0	nein	ns		
0 h vs. 2 h	43,60	-29,31-116,5	nein	ns		
0 h vs. 4 h	62,40	-10,51-135,3	nein	ns		
One-way analysis of variance						
<b>+936 C/T (0 %)</b>	P value					0,8322
	P value summary					ns
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)					nein
	R square					0,09780
	Bonferroni`s Multiple Comparison Test	Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary	
0 h vs. 1 h	13,70	-130,7-158,1	nein	ns		
0 h vs. 2 h	-29,90	-174,3-114,5	nein	ns		
0 h vs. 4 h	-5,100	-149,5-139,3	nein	ns		
One-way analysis of variance						
<b>+936 C/T (10 %)</b>	P value					0,0016
	P value summary					*
	Are differences among means statistically significant? (P<0,05)					ja
	R square					0,8385
	Bonferroni`s Multiple Comparison Test	Mean Diff.	95 %CI	signifikant?	summary	
0 h vs. 1 h	24,40	0,925-47,88	nein	ns		
0 h vs. 2 h	26,80	3,325-50,28	nein	ns		
0 h vs. 4 h	50,10	26,62-73,58	nein	ns		

## Anhang X: Vergleichende Untersuchung der Zytotoxizität und Promotoraktivität der Zervixkarzinomzelllinie HeLa

Zur vergleichenden Betrachtung des zelllinienabhängigen Einflusses der Inkubation mit CSE wurde die Zelllinie HeLa ebenfalls mit CSE inkubiert und die metabolische Aktivität, die Lebendzellzahl sowie die Vitalität untersucht. Zudem soll der zelllinienabhängige Einfluss der VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion und Inkubation mit CSE analog der Zelllinien A549 und HNSCCUM-02T an der Zervixkarzinomzelllinie HeLa untersucht werden.

### A) Metabolische Aktivität



**Abbildung 1: Messung der metabolischen Aktivität nach Inkubation der HeLa-Zellen mit CSE**

Zur Untersuchung der CSE-abhängigen metabolischen Aktivität der Zelllinie HeLa wurde diese für 24 h mit CSE inkubiert und im Anschluss die metabolische Aktivität mittels des AlamarBlue®-Assays bestimmt. Die metabolische Aktivität wurde nach Kristallviolett-färbung zur Bestimmung der Lebendzellzahl auf die Zellzahl bezogen und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt (n=6).

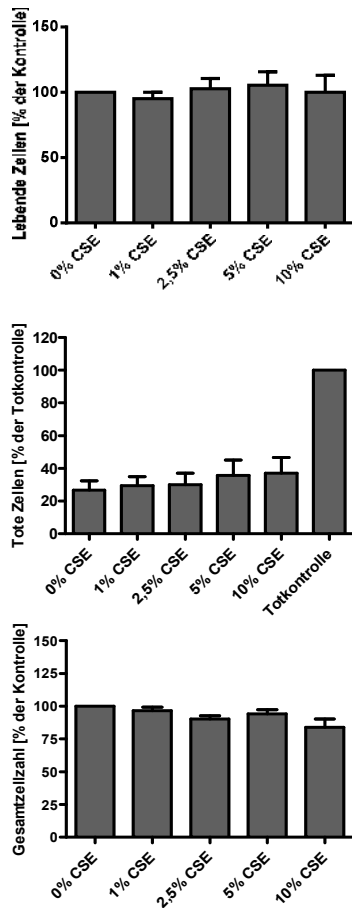
**Tabelle 78: Messung der metabolischen Aktivität nach Inkubation der HeLa-Zellen mit CSE**

HeLa	Viabilität [% der Kontrolle]						MW	SD
0 % CSE	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
1 % CSE	123,0	82,1	73,5	97,2	106,4	89,3	<b>93,6</b>	<b>15,6</b>
2,5 % CSE	89,2	152,2	100,0	69,2	155,0	150,0	<b>73,9</b>	<b>11,0</b>
5 % CSE	120,3	149,1	113,2	113,6	64,3	116,0	<b>82,4</b>	<b>28,7</b>
10 % CSE	142,3	83,0	77,2	53,1	97,4	146,6	<b>76,3</b>	<b>16,7</b>

**Tabelle 79: Statistische Analyse der metabolischen Aktivität nach Inkubation der HeLa mit CSE**

HeLa				
One-way analysis of variance				
P value	0,0623			
P value summary	ns			
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)	nein			
R square	0,2917			
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	6,447	-20,15-33,04	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	26,08	-0,51-52,68	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	17,57	-9,02-44,17	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	23,68	-2,91-50,28	nein	ns

## B) Anteil der lebenden und toten Zellen nach CSE-Inkubation



### Abbildung 2: Messung der Vitalität nach Inkubation der HeLa-Zellen mit CSE

Zur Untersuchung des Anteils der lebenden und toten Zellen wurde ein LIVE/DEAD®-Assay durchgeführt. Nach Aussaat der HeLa wurden diese für 24 h mit CSE inkubiert. Nach Bestimmung der toten und lebenden Zellen wurden die Zellen mit 70 % EtOH abgetötet und die Gesamtzellzahl bestimmt. Der Anteil der toten/lebenden Zellen wurde auf die Gesamtzellzahl bezogen und als Prozent der unbehandelten bzw. der Totkontrolle dargestellt (n=3)

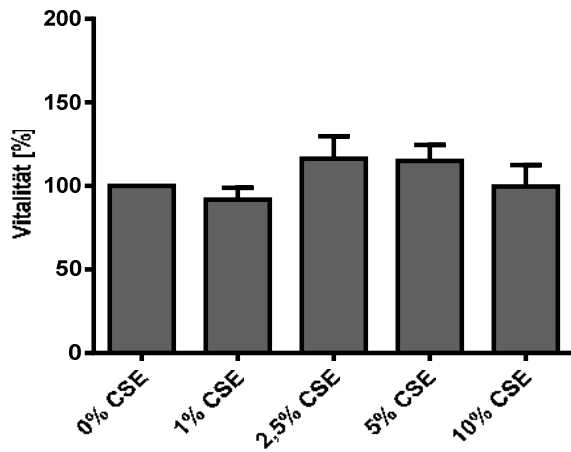
Tabelle 80: Messung der Vitalität der HeLa nach Inkubation mit CSE

HeLa	lebende Zellen [% der Kontrolle]			MW	SD
0 % CSE	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
1 % CSE	91,8	89,1	104,7	95,2	8,3
2,5 % CSE	112,9	87,1	107,9	102,8	13,4
5 % CSE	105,6	87,2	123,3	105,3	18,1
10 % CSE	95,3	80,0	124,7	100,0	22,7
	tote Zellen [% der Totkontrolle]				
Totkontrolle	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
0 % CSE	37,3	18,4	24,7	26,8	9,6
1 % CSE	40,4	23,5	24,6	29,5	9,4
2,5 % CSE	43,3	19,2	27,5	30,0	12,3
5 % CSE	52,7	20,6	33,8	35,7	16,4
10 % CSE	53,0	20,7	38,1	37,2	16,3
	Gesamtzellzahl [% der Kontrolle]				
0 % CSE	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
1 % CSE	91,1	100,3	98,2	96,5	4,8
2,5 % CSE	85,1	92,8	92,6	90,2	4,4
5 % CSE	94,1	99,6	88,5	94,0	5,5
10 % CSE	83,2	94,9	73,5	83,9	10,8

**Tabelle 81: Statistische Analyse der Vitalität der HeLa nach Inkubation mit CSE**

<b>HeLa</b>				
<b>lebende Zellen</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,9342
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,0731
Bonferroni`s multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	4,831	-31,80-41,47	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-2,768	-39,40-33,87	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	-5,334	-41,97-31,30	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	0,0362	-36,60-36,67	nein	ns
<b>tote Zellen</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,8467
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,1189
Bonferroni`s multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	-2,676	-41,00-35,65	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-3,195	-41,52-35,13	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	-8,885	-47,21-29,44	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	-10,34	-48,67-27,99	nein	ns
<b>Gesamtzellzahl</b>				
One-way analysis of variance				
P value				0,6049
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,2206
Bonferroni`s multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	0,6018	-38,23-27,23	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	0,0328	-32,43-33,03	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	0,0328	-32,43-33,03	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	1,050	-23,13-42,33	nein	ns

## C) Lebendzellzahl nach Inkubation mit CSE



**Abbildung 3: Messung der Lebendzellzahl nach Inkubation der HeLa-Zellen mit CSE**

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl nach Inkubation der HeLa mit CSE (24 h) wurde eine Kristallviolett-färbung durchgeführt. Die Lebendzellzahl wird als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt (n=7).

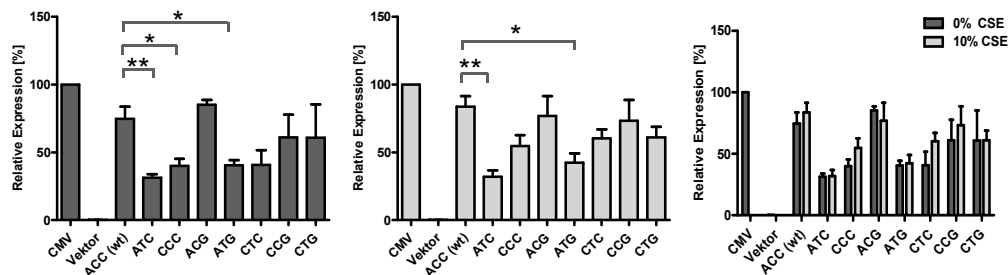
**Tabelle 82: Messung der Lebendzellzahl nach Inkubation der HeLa mit CSE**

HeLa	Vitalität [% der Kontrolle]							MW	SD
0 % CSE	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
1 % CSE	70,9	123,0	82,1	73,5	97,2	106,4	89,3	91,8	18,7
2,5 % CSE	99,4	89,2	152,2	99,9	69,2	155,0	150,0	116,4	35,2
5 % CSE	127,9	120,3	149,1	113,2	113,6	64,3	116,0	114,9	25,6
10 % CSE	97,3	142,3	83,0	77,2	53,1	97,4	146,6	99,6	34,1

**Tabelle 83: Statistische Analyse der Lebendzellzahl nach Inkubation mit CSE (HeLa)**

HeLa				
One-way analysis of variance				
P value				0,3415
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P<0,05)				nein
R square				0,1355
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95 % CI	signifikant?	Summary
0 % CSE vs. 1 % CSE	8,228	-28,83-45,29	nein	ns
0 % CSE vs. 2,5 % CSE	-16,42	-53,48-20,64	nein	ns
0 % CSE vs. 5 % CSE	-14,91	-51,98-22,15	nein	ns
0 % CSE vs. 10 % CSE	0,438	-36,62-37,50	nein	ns

## DJ VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion und Inkubation mit CSE



**Abbildung 4: Messung der SNP-abhängigen VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion und Inkubation der HeLa-Zellen mit 10 % CSE**

Zur Bestimmung der SNP-abhängigen Promotoraktivität wurde nach Transfektion der HeLa-Zellen mit den SNP-Reporterkonstrukten und Inkubation (10 % CSE) eine GFP-spezifische qRT-PCR durchgeführt. Nach Quantifizierung auf das *housekeeping* Gen GAPDH werden die Werte als Prozent der nicht transfizierten unbehandelten Kontrolle dargestellt (n=3).

**Tabelle 84: Messung der SNP-abhängigen VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion und Inkubation mit CSE der HeLa-Zellen**

Kontrolle	relative Expression [% der Kontrolle]			MW	SD
CMV-Promotor	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Vektor	0,0	0,1	0,2	0,1	0,1
<i>wt</i> (ACC)	71,3	91,6	61,2	74,7	15,5
-460 (ATC)	26,0	34,4	33,5	31,3	4,6
-2578 (CCC)	39,5	49,4	31,2	40,0	9,1
+405 (ACG)	82,5	92,1	81,0	85,2	6,0
-460//+405 (ATG)	37,6	36,3	47,9	40,6	6,4
-2578//-460 (CTC)	45,9	56,3	20,0	40,7	18,7
-2578//+405 (CCG)	51,2	93,6	38,5	61,1	28,8
-2578//-460//+405 (CTG)	41,4	109,6	31,5	60,8	42,5
10 % CSE	relative Expression [% der Kontrolle]			MW	SD
CMV-Promotor	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
Vektor	0,0	0,1	0,2	0,1	0,1
<i>wt</i> (ACC)	83,8	97,2	70,0	83,7	13,6
-460 (ATC)	22,5	37,3	36,2	32,0	8,3
-2578 (CCC)	40,4	67,4	56,4	54,8	13,6
+405 (ACG)	76,2	51,8	102,6	76,9	25,4
-460//+405 (ATG)	48,9	28,6	49,3	42,3	11,9
-2578//-460 (CTC)	47,1	69,1	64,7	60,3	11,6
-2578//+405 (CCG)	46,9	100,2	72,6	73,2	26,7
-2578//-460//+405 (CTG)	47,2	74,8	60,6	60,9	13,8

**Tabelle 85: Statistische Analyse der SNP-abhängigen VEGF-Promotoraktivität nach Transfektion und Inkubation mit CSE der HeLa-Zellen**

unpaired t-test		
ACC ( <i>wt</i> ; 0 % CSE) vs. ATC (0 % CSE)	P value	0,0096
	P value summary	**
	Significantly different? (P<0,05)	ja
	t; df	t=4,657; df=4
ACC ( <i>wt</i> ; 0 % CSE) vs. CCC (0 % CSE)	P value	0,0287
	P value summary	*
	Significantly different? (P<0,05)	ja
	t; df	t=3,347; df=4
ACC ( <i>wt</i> ; 0 % CSE) vs. CTC (0 % CSE)	P value	0,0243
	P value summary	*
	Significantly different? (P<0,05)	ja
	t; df	t=3,529; df=4
ACC ( <i>wt</i> ; 0 % CSE) vs. CTC (0 % CSE)	P value	0,0725
	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=2,423; df=4
ACC ( <i>wt</i> ; 10 % CSE) vs. ATC (10 % CSE)	P value	0,0049
	P value summary	**
	Significantly different? (P<0,05)	ja
	t; df	t=5,629; df=4
ACC ( <i>wt</i> ; 10 % CSE) vs. CCC (10 % CSE)	P value	0,0596
	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=2,608; df=4
ACC ( <i>wt</i> ; 10 % CSE) vs. ATG (10 % CSE)	P value	0,0165
	P value summary	*
	Significantly different? (P<0,05)	ja
	t; df	t=3,976; df=4
ACC ( <i>wt</i> ; 10 % CSE) vs. CTC (10 % CSE)	P value	0,0863
	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=2,264; df=4
ACC ( <i>wt</i> ; 10 % CSE) vs. CTG (10 % CSE)	P value	0,1113
	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=2,037; df=4
CCC (0 % CSE) vs. CCC (10 % CSE)	P value	0,1936
	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,561; df=4
CTC (0 % CSE) vs. CTC (10 % CSE)	P value	0,1989
	P value summary	ns
	Significantly different? (P<0,05)	nein
	t; df	t=1,538; df=4





## **Eigene Veröffentlichungen**

Für die Onlineversion entfernt.

Für die Onlineversion entfernt.

## **Danksagung**

Für die Onlineversion entfernt.



# CURRICULUM VITAE

Für die Onlineversion entfernt.

Für die Onlineversion entfernt.

---

Für die Onlineversion entfernt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Mainz, den 22. Juni 2016

Carmen Metzger