

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund-, und Kiefer-Gesichtschirurgie des
Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
- Direktor: Univ.- Prof. Dr. Dr. Dr.h.c. U. Joos -

**Genexpressionsanalyse der kokulturellen
Verhältnisse zwischen Tumor- und Endothelzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Krause, Thomas Fritz Rudi Gerhard
aus Mühlhausen/Thüringen

2006

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Heribert Jürgens
1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Dr. J. Kleinheinz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. P.Scheutzel
Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund-, und Kiefer-Gesichtschirurgie des
Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
- Direktor: Univ.- Prof. Dr. Dr. Dr.h.c. U. Joos -

Zusammenfassung

Genexpressionsanalyse der kokulturellen Verhältnisse zwischen Tumor- und Endothelzellen

Thomas Krause

Die Behandlung von neoplastischen Gewebsveränderungen des Kopf-Halsbereiches hat sich in den letzten Jahrzehnten stetig verbessert. Gerade das Plattenepithelkarzinom, als häufigstes Malignom dieser Region, zeigt jedoch eine relativ schlechte Gesamtprognose. Diese Tatsache kann durch einen stärkeren Bezug der Diagnostik und Therapie auf die eigentliche Tumorbilogie verbessert werden. Die dann mögliche exaktere Prognose oder individuellere Therapie fordert jedoch ein absolutes Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen. Die vorliegende Arbeit verfolgt die Zielstellung die transkriptionelle Aktivität von Plattenepithelkarzinomzellen in Abhängigkeit der An- oder Abwesenheit von Endothelzellen mittels einer umfassenden Genexpressionsanalyse zu untersuchen. Der Genexpressionsvergleich zwischen Tumorkultur und Tumor-Endothelzellkokultur zeigte deutliche Expressionsunterschiede, so wurde der Einfluss des tumorumgebenden Gewebes im Verlauf der Arbeit immer deutlicher. Ebenso zeigt sich die Bedeutung von komplexen in vitro Kokulturen und deren umfassende Genexpressionsanalyse zur Simulation von in vivo Vorgängen. Tumorkulturell wurden Interleukine- (IL1A, IL8), Chemokine (CXCL1, CCL20, CXCL3 und CX3CL1), die ‚Tumor Nekrosis Factors‘ TNFAIP2, TNFRSF6 und TRAF4, und ebenso die angiogenen Faktoren ECGF und Angiogenin erhöht exprimiert. Gegensätzlich dazu zeigte die Tumor-Endothelzellkokultur eine erhöhte Expression von PLAUR, ESDN, GFI-1, ID-3, CCND2 und zudem wurde der MAP-Kinase-Stoffwechselweg positiv beeinflusst (CACNG6, DUSP10, RASGRP1, TNFRSF6, CXCL1). In der Tumorkultur ist es zu einer Expression von positiv angiogen-proliferativen Faktoren gekommen. Die expressionellen Charakteristika der Tumorkultur zeigen einen sehr aktiven Tumorstoffwechsel, der auf angiogenetische Induktion, Zellproliferation, Wachstum und Apoptoseinhibition hinzielt. Kokulturell steht weniger die Expression von proangiogenetischen Faktoren im Vordergrund als die Expression von Faktoren der Invasion, Migration und Metastasierung. Der Tumorzelle genügt demnach die Simulation eines Gefäßplexus durch die endotheliale Anwesenheit innerhalb einer in-vitro Tumor-Endothelzellkokultur um von einem proangiogenen Expressionsschema hin zum invasiven und metastasierenden Expressionsmuster zu gelangen.

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2006

Diese Dissertation ist in Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	- 1 -
1 Wissenschaftlicher Hintergrund.....	- 2 -
1.1 Die Endothelzelle	- 2 -
1.1.1 Zytologie und Histologie.....	- 2 -
1.1.2 Beteiligung der Endothelzelle an der Koagulation und Antikoagulation.....	- 3 -
1.1.3 Endothelzellen und Immunreaktionen.....	- 4 -
1.1.4 Angiogenese.....	- 5 -
1.2 Die Tumorzelle.....	- 9 -
1.2.1 Ätiologie der Mundhöhlenkarzinome.....	- 9 -
1.2.2 Feldkanzerogenisierung	- 10 -
1.2.3 „Multi-Step-Theory“	- 10 -
1.2.4 Epidemiologie.....	- 11 -
1.2.5 Tumorangio-genese	- 11 -
1.2.6 Invasion und Metastasierung	- 13 -
1.2.7 Tumordiagnostik.....	- 14 -
1.2.8 Tumorthherapie	- 15 -
1.3 Genexpressionsbeobachtung	- 17 -
1.3.1 Einleitung	- 17 -
1.3.2 Methodik der „GeneChips“-Affymetrix.....	- 18 -
1.3.3 Methodik der „TaqMans“-Applied Biosystems.....	- 19 -
1.3.4 Photolithographie – GeneChips Technologie - Affymetrix	- 19 -
1.3.5 Chemilumineszenz- TaqMan Technologie – Applied Biosystems	- 20 -
1.4 Ein Vergleich von Affymetrix und Applied Biosystems	- 24 -
2 Problemstellung.....	- 26 -
3 Material und Methode.....	- 27 -
3.1 Isolierung von Endothelzellen aus humaner Nabelschnurvene	- 27 -
3.2 Passagieren- u. Aussaat v. Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen.....	- 28 -
3.3 CAL27 – experimentelle Tumorzelllinie –	- 28 -
3.4 Herstellung einer Kokultur aus CAL27 Tumorzellen und Endothelzellen.	- 29 -
3.5 Ablösung der Zellen und RNA Extraktion für die Genchip-Analyse.....	- 29 -
3.6 RNA Isolierung aus Tumorgeweben	- 30 -
3.7 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA und RNA.....	- 30 -
3.8 „Human Genom Survey Microarrays“	- 30 -
3.9 Statistische Auswertung.....	- 32 -
3.9.1 t-Test-Mittelwertvergleiche.....	- 32 -
3.9.2 F-Test -	- 33 -

3.9.3	FC – der Fold Change.....	- 33 -
3.10	Auswertung der Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchung	- 33 -
4	Ergebnisse.....	- 35 -
4.1	Einleitung	- 35 -
4.2	Tumorreinkulturell erhöhte Transkription	- 36 -
4.2.1	TNF-assoziierte Moleküle.....	- 36 -
4.2.2	Chemokine	- 36 -
4.2.3	Cytochrome und Serpine	- 37 -
4.2.4	Interleukine.....	- 38 -
4.2.5	Interferon-assoziierte Moleküle.....	- 39 -
4.2.6	angiogenetische Faktoren	- 39 -
4.2.7	Invasion und Metastasierung	- 40 -
4.2.8	Transkriptionelle Faktoren.....	- 41 -
4.2.9	Homeobox und nukleäre Faktoren.....	- 42 -
4.2.10	Endo- und Exocytose.....	- 43 -
4.3	Tumor-Endothelzellkulturell erhöhte Transkription	- 43 -
4.3.1	Transkriptionsassoziierte Faktoren.....	- 43 -
4.3.2	Signalmoleküle	- 44 -
4.3.3	Rezeptoren	- 45 -
4.3.4	Onkogenet. Faktoren, biolog. oder funktionell unklassifizierte Moleküle	- 46 -
4.3.5	Zelladhäsion, Zellstruktur und Zytoskelett	- 47 -
4.3.6	Immunität	- 48 -
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	- 49 -
5	Diskussion.....	- 53 -
5.1	Reinkulturell erhöhte Expression	- 53 -
5.1.1	Mitglieder der Chemokin-Familie.....	- 53 -
5.1.2	Interleukine oder Interleukinrezeptoren.....	- 58 -
5.1.3	Moleküle, die mit TNF zu assoziieren sind.....	- 62 -
5.1.4	Weitere Faktoren mit angiogenem Potential	- 69 -
5.2	Kokulturell erhöhte Expression.....	- 75 -
5.2.1	Rezeptoren	- 75 -
5.2.2	Signalmoleküle	- 82 -
5.2.3	Transkriptionsfaktoren	- 86 -
5.2.4	Zytoskelett.....	- 89 -
5.2.5	Zelladhäsion	- 90 -
5.2.6	Weitere.....	- 92 -
6	Zusammenfassung	- 99 -
7	Literaturverzeichnis.....	- 100 -
8	Anhang.....	I
8.1	Lebenslauf.....	I
8.2	Danksagung	II

Einleitung

Jährlich erkranken in Deutschland 300.000 Menschen an Krebs, ca. 25% der Patienten sterben an dieser Erkrankung. Weltweit entwickeln jährlich mehr als 550.000 Menschen Tumore im Kopf-Halsbereich, wobei hier zu 90% das Plattenepithelkarzinom diagnostiziert wird (Neville B.W. 2002; Weinberg M.A. 2002). Die Mortalität beträgt in Abhängigkeit von interindividuellen Unterschieden, zwischen 30 und 60% (WHO 1997). Diese Prognose wird begleitet von erheblichen therapieadhärenten Belastungen, wie umfangreichen Operationen mit Resektionen und anschließender Rekonstruktion. Wobei hier der soziokulturell entscheidende Bereich des Gesichtes operiert wird. Rezidive bleiben dabei auch nach korrekt durchgeführter Therapie ein lebenslang möglich, was lebenslange Nachuntersuchungen erforderlich macht. Der Leidensdruck dieser Patienten ist enorm (Aarstad A.K. et al. 2005; Brignolo A. et al. 2001; Gourin C.G. et al. 2005).

Innerhalb der Diagnostik und Therapie der neoplastischen Erkrankungen fand in den letzten Jahren eine Art Individualisierung statt. Neoplasien werden nicht mehr ausschließlich durch Gewebeabstammung, Größe, Ausdehnung usw. klassifiziert, sondern können durch z.B. Biomarker einer exakteren Prognose und individuelleren Therapie zugeordnet werden. Die Entwicklung und Verbesserung diagnostischer Marker oder therapeutisch verwendbarer Toxine zeigte zum Beispiel bei Brustkrebs deutliche Erfolge. Dabei limitiert besonders die Tumorerheterogenität, auch innerhalb einer Tumorentität die gegenwärtige Anwendbarkeit von prognostischen Markern, so z.B. auch bei dem oralen Plattenepithelkarzinom. Zwangsläufig also ergibt sich die Notwendigkeit eines nahezu absoluten Verständnisses der genetischen und molekularen Basis entsprechender Tumorerkrankungen (Quon H. et al. 2001). Es gilt also zu Verstehen, auf welche Art und Weise Tumorzellen auf Transkriptionsebene mit dem umliegenden Gewebe interagieren. Folkman et al. prägte 1972 den Begriff der „Angiogeneseabhängigkeit des Tumorwachstums“ und deutete auf die Relevanz der Endothelzellen für den Tumorstoffwechsel hin. Seitdem wurde in zahlreichen Publikationen anhand von pro- und antiangiogenen Wirkstoffen das Zusammenspiel zwischen Tumor- und Endothelzellen untersucht (Carmeliet P. et al. 2003; Tang D.G. et al. 2004; Verheul H.M. et al. 2004). Die Frage der generellen transkriptionellen Beeinflussung des Tumorstoffwechsels in Plattenepithelkarzinomen durch Endothelzellen ist weitgehend ungeklärt und die Beantwortung dieser Frage ist die Zielstellung der vorliegenden Arbeit.

1 Wissenschaftlicher Hintergrund

1.1 Die Endothelzelle

Endothelzellen kleiden sowohl das Lymph- als auch das Blutgefäßsystem, als deren innerste Schicht, zum Lumen hin aus. Sie trennen somit den intravasalen- vom interzellulären Raum (Baldwin and Thurston 2001), gleichzeitig sind sie auch Garant eines kontrollierten Stoff- und Flüssigkeitsaustausches in alle Richtungen. Blutkapillaren sind zwar der Abschnitt des Blutgefäßsystems mit dem einfachsten Aufbau gleichzeitig jedoch ist es aber auch der wichtigste Abschnitt für den Gas- und Stoffaustausch (Baldwin and Thurston 2001).

Im Folgenden soll die Zytologie und Histologie sowie die Beteiligung der Endothelzelle an der Koagulation und Antikoagulation, der Immunreaktion sowie der Vaskulogenese und Angiogenese etwas intensiver eingegangen werden.

1.1.1 Zytologie und Histologie

Die sehr flachen (0,1-1 µm dick) Endothelzellen kleiden in Längsrichtung der Kapillaren orientiert deren Lumen in Form einer einschichtigen Zelllage aus. Kapillaren haben ein zylindrisches Lumen mit einem Durchmesser von 7-9 µm. Morphologisch sind dünne Endothelzellen, mit 0,1-0,2 µm Dicke und wenigen Mikropinozytosebläschen- und dicke Endothelzellen, mit 0,3-1 µm Dicke und vielen Mikropinozytosebläschen zu unterscheiden. So stellt das Endothel mit annähernd $1-6 \times 10^{13}$ Endothelzellen ein ca. 1kg schweres Organ dar (Sumpio B.E. et al. 2002). Mikropinozytosebläschen dienen der Endozytose und bilden Vesikelketten. Die Endothelzelle enthält eher wenige Zellorganellen in ihrem Zytoplasma, kleine Golgi-Apparate und einige Mitochondrien sind paranukleär lokalisiert (Sumpio B.E. et al. 2002), ebenso ist das raue endoplasmatische Retikulum (RER) nur gering ausgebildet. Sog. Weibel-Palade Körper sind charakteristisch, dabei handelt es sich um ca. 0,6 µm lange osmiophile Gebilde mit Mikrotubuli, diese enthalten den von-Willebrand-Faktor und

Endothelin, ein vasoaktives Peptid (Galley H.F. et al. 2004; Weibel E.R. & Palade G.F. 1964). Untereinander sind Endothelzellen v.a. durch Zonula occludentes/tight-junctions und Nexus verbunden, Zonula adherens kommen selten vor (Dejana et al. 1995; Galley H.F. et al. 2004; Schnittler 1998). Funktionell wichtige Anteile sind das Zytoskelett sowie Myosinfilamente und Mikropinozytosebläschen.

Endothelzellen stellen keine einheitliche Population dar sie unterscheiden sich in ihrer Enzymausstattung, vor allem bezüglich ihrer Phosphatasen und hinsichtlich ihrer Glykokalix, die entscheidend für die Adhäsion und Einwanderung der Leukozyten ins Gewebe ist (Aird W.C. et al. 2003; Stevens T. et al. 2001; Aird W.C. et al. 2002).

Funktionell überwiegen bei manchen Endothelzellen der Stoff- und Gasaustausch, bei anderen die metabolischen Eigenschaften. Endothelzellen mit überwiegend metabolischen Eigenschaften sind sekretorisch tätig. Diesbezüglich handelt es sich um die Bildung von Materialien für die subendotheliale Matrix, wie Kollagen, Elastin, Proteoglykane sowie Stoffe die an der Blutgerinnung, an der Weitenregulierung der Gefäße, an der Angiogenese und für glatte Muskelzellen eine Rolle spielen. Endothelzellen sind sowohl für Gase als auch für Lipoproteine und weitere Plasmabestandteile durchlässig. Zu diesen beiden Haupteigenschaften kommen weitere spezielle Eigenschaften wie zum Beispiel die Fähigkeit der Alveolarkapillare Angiotensin I in Angiotensin II umzuwandeln, oder die Fähigkeit anderer Endothelien Adeninnukleotide, vasoaktive Peptide oder Prostaglandine zu metabolisieren.

1.1.2 Beteiligung der Endothelzelle an der Koagulation und Antikoagulation

Da die Blutgerinnungsenzyme ihre Funktion im Gefäßsystem ausüben, ist eine präzise Regulation nötig, um die prokoagulatorischen Aktivitäten in der Region der Gewebeverletzung zu halten. Zeitgleich zirkulieren neben den prokoagulatorischen Blutgerinnungsfaktoren, Inhibitoren der Fibrinbildung im Blut. Diese üben eine Schutzfunktion zur Aufrechterhaltung der Zirkulation und zur Vermeidung einer generalisierten Gerinnungsreaktion aus.

So wirken Endothelzellen durch gebundene, heparinähnliche Glycosaminoglykane, durch die Biosynthese von Prostaglandin I₂ (Prostazyklin) und durch Sekretion von Plasminogenaktivator und Thrombomodulin antikoagulativ. Dabei werden Prostazyklin und NO (Nitritoxid) als wesentlich antikoagulativ beschrieben (de Graaf J.C. et al. 1992).

Die Glycosaminoglykane beschleunigen die Antithrombin III Wirkung im Sinne einer Inaktivierung der Koagulationsproteasen (Welles E.G. 1996). Dieser Thromboxanantagonist ist ein Aktivator der Adenylatzyklase und hemmt somit die Plättchenaggregation (Welles

E.G. 1996). Ein Missverhältnis zwischen Thromboxan A₂ und Prostaglandin I₂ ist entscheidend für die Thrombogenese und Arterogenese (Viinikka L. 1990).

Mit Hilfe des fibrinolytischen Systems, werden Thromben im intakten Gefäßsystem lysiert. Dabei wird Plasmin, aus seiner inaktiven Vorstufe dem Plasminogen, durch Plasminogenaktivatoren gebildet. So wird zwischen körpereigenen-, wie die Urokinase oder Gewebefibrinogenaktivator (tPA), und körperfremden, wie die Streptokinase Plasminogenaktivatoren unterschieden (Emeis J.J. 1995; Emeis J.J. et al. 1997). tPA ist ein Glykoprotein mit 70kDa Molekulargewicht, 527 Aminosäuren und einem Kohlenhydratanteil von 10%, es liegt in vielen Geweben in unterschiedlicher Konzentration vor – in Blutgefäßen ist es an Endothelzellen gebunden und kann durch Thrombin freigesetzt werden. Aufgrund der hohen Fibrinaffinität von tPA wird es selektiv lokal bei Fibrin- oder Thrombenbildung aus dem Endothelspeicher freigesetzt (Emeis J.J. 1995; Emeis J.J. et al. 1997). tPA entfaltet im Gegensatz zu anderen Serinproteasen schon in der Proform proteolytische Aktivität (Emeis J.J. 1995; Emeis J.J. et al. 1997).

Zudem synthetisieren Endothelzellen den für die Plättchenaggregation wichtigen von-Willebrand-Faktor, der zum Teil ins Plasma oder in die subendotheliale Matrix abgegeben wird und dort, im Falle einer Verletzung, die anfangs lockere Bindung zwischen Thrombozyten und Kollagen festigt (Bowie E.J.W., Solberg L.A., Fass D.N. et al. 1986). „Dies macht deutlich, dass die Verhinderung einer Spontangerinnung zu einem großen Teil von Stoffwechsel- und Sekretionsleistung des Endothels abhängt.“ Prof. Dr. Speckmann (Zitat: Vorlesung der Physiologie, Prof. Speckmann, 25.10.2001)

1.1.3 Endothelzellen und Immunreaktionen

Unter den Granulozyten kommt den neutrophilen Granulozyten eine Schlüsselfunktion bei der Infektabwehr zu. Sie sind im Blut lokalisiert und bewegen sich im Falle einer Entzündungsreaktion entlang eines Konzentrationsgradienten, von beispielsweise Interleukin 8 (DiVietro J.A. et al. 2001), bestimmter Entzündungsmediatoren um am Ort des Geschehens entzündliche Agenzien zu phagozytieren. Die Extravasation wird möglich durch Adhäsion an das Gefäßendothel mit anschließender Diapedese. Der Prozess der Adhäsion läuft in einer Kaskade ab und resultiert in einer festen Anheftung an das Endothel (Butcher E.C. 1991; Springer T.A. 1994).

Die Adhäsion wird über Selectine und Integrine vermittelt. Selectine sind lektinähnliche, kohlenhydratbindende Proteine, wobei man L-Selectine, auf Leukozyten findet und E-Selectine, nach Cytokinaktivierung durch Endothelzellen synthetisiert- und exprimiert werden und zudem P-Selectine, auf aktivierten Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert werden. Jedem Selectin stehen spezifische Kohlenhydratsequenzen auf jeweils

Leukozyten und Endothelzellen gegenüber. Während der lockeren Bindung über Selektine untersuchen die Leukozyten die Endotheloberfläche nach Diapedesauslösern, fehlen diese, gibt die leichte Selectinbindung die Leukozyten schnell wieder in die Zirkulation zurück. Die erwähnten Integrine ermöglichen als Adhäsionsmoleküle eine feste Anheftung der Leukozyten an das Endothel. Integrine befinden sich auf der Oberfläche zirkulierender Leukozyten und benötigen zur Bindung eine Aktivierung ihrer Bindungsaktivität durch vorwiegend von Endothelzellen freigesetzte Signale. Zu diesen Signalen gehören chemotaktisch aktive Cytokine wie IL-8, MCP1, MIP1 und Rantes (letztere haben Wirkung vorwiegend auf Monozyten, Lymphozyten und Eosinophile). Zusätzlich werden durch lokal gebildete Entzündungsfaktoren wie TNF- α oder IL-1 interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) auf Endothelzellen ausgebildet wodurch eine weitere Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom möglich ist. Aufgrund chemotaktischer Faktoren, wie z.B. durch das Fragment C5a des Komplementsystems oder Leukotrien B4 orientieren sich Leukozyten durch den extravasalen, extrazellulären Raum (Ley K. 2002).

1.1.4 Angiogenese

1.1.4.1 Einleitung

Das vaskuläre System ist das erste funktionelle Organ, das sich während der Embryonalphase entwickelt und somit den Prozess der Vaskulogenese beschreibt. Die extraembryonalen mesodermalen Hämangioblasten aggregieren im Dottersack und bilden Blutinseln. Dabei findet eine Differenzierung zu einer externen Endothelzellschicht und zu einem Kern aus Blutzellen statt. Aus der Endothelzellschicht geht anschließend der primär kapilläre Plexus hervor. Kurz darauf differenzieren am proximalen lateralen Mesoderm lokalisierte intraembryonale mesodermale Hämangioblasten und Angioblasten und bilden dabei die dorsale Aorta (Baron M.H. 2001; Choi K. 2002). Der Begriff Angiogenese hingegen beschreibt die Neubildung von Gefäßen ausgehend von einem bestehenden kapillären Plexus, die so sprießenden neuen Gefäße sind im gesamten Körper vorzufinden. In der finalen Phase der Gefäßentwicklung differenzieren mesenchymale Zellen zu muralen Zellen, wie z.B. glatte Muskelzellen und Periozyten, und umgreifen die Blutgefäße, diese werden dadurch stabilisiert und sind letztendlich erst dadurch voll entwickelt. Die Endothelzellen der inneren Oberfläche von Blutgefäßen bei Erwachsenen sind zum einen relativ stoffwechselruhige Zellen, gleichzeitig sind sie entscheidend für die Erhaltung der Integrität der Gefäße (Carmeliet P. 2000). Ausgehend von diesen Zellen findet in

Mikrogefäßen die Gefäßneubildung statt (Risau W.1997). Die Vaskulogenese beschreibt demnach einmal die embryonale Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes, beim Erwachsenen hingegen nimmt die Vaskulogenese ihren Ursprung in mesenchymalen Vorläuferzellen, den Hämangioblasten. Während die Angiogenese die Aus- und Umgestaltung eines bestehenden Gefäßsystems erklärt und aus bestehenden Endothelzellen hervorgeht.

1.1.4.2 Pro- und Antiangiogene relevante Faktoren

Der „intensivst-regulierte“ Prozess der Angiogenese wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, prinzipiell gilt die Aussage, dass das Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenen Molekülen über die Pro- oder Regression der potenziellen Blutgefäßneubildung entscheidet. Das Spektrum von Publikationen über angiogenetische Faktoren ist erschöpfend umfassend. Grosses Interesse gilt hier vor allem den endotheliumspezifischen Faktoren deren Rezeptoren auf Endothelzellen exprimiert werden (Oettgen P. 2001).

proangiogene Faktoren	Funktion
VEGF Familie	stimuliert die Vaskulogenese/Angiogenese
VEGFR; NRP-1	leitet angiogene- und Überlebenssignale ein
Ang1 und Tie2	stabilisiert Gefäße, inhibiert Permeabilität
PDGF-BB und Rezeptoren	rekrutiert Gefäßmuskelzellen
TGF-β1, Endoglin, TGF-β-Rezeptoren	stimuliert die Produktion v. extrazellulärer Matrix
FGF, HGF, MCP-1	stimuliert die Angio/Arteriogenese
Integrine	Rezeptoren für Matrixmakromoleküle u. Proteinase
VE-Cadherin, PECAM(CD31)	endotheliale junctionale Moleküle
Ephrine	regulieren die arterio-venöse Spezialisierung
Plasminogenaktivatoren, MMPs	Matrixremodelling, Freisetzung v. Wachstumsfaktoren
PAI-1	stabilisiert wachsende Gefäße
NOS, COX2	stimuliert die Angiogenese u. Vasodilatation
AC133	reguliert die Angioblastendifferenzierung
Chemokine	pleiotrope Funktion in d. Angiogenese
Id1/Id3	bestimmt die endotheliale Plastizität

Tabelle 1: Auswahl entscheidender proangiogener Faktoren (mod. n. Carmeliet P. et al. 2000; Yancopoulos G.D. et al. 2000)

antiangiogene Faktoren	Funktion
VEGFR-1, lösl. VEGFR1, lösl. NRP-1	senkt VEGF, VEGF-b, PlGF
Ang2	Antagonist v. Ang1
TSP-1, -2	inhibiert endotheliale Migration, Wachstum, Adhäsion u. Überleben
Endostatin (Kollagen XVIII Fragment)	inhibiert endotheliale Migration u. Überleben
Vasostatin, Calreticulin	inhibiert endotheliales Wachstum
Platelet Factor 4	inhibiert die Bindung v: VEGF, bFGF
TIMPs, MMP Inhibitoren, PEX	unterdrückt d. patholog. Angiogenese
IFN- α , - β , - μ , IP-10, IL-4, IL-12, IL-18	inhibiert d. endotheliale Migration, reguliert bFGF herunter
Prolactin (M., 16K)	inhibiert BFGF/VEGF
VEGI	moduliert zelluläres Wachstum
Fragment v. SPARC	inhibiert die endotheliale Bindung u. Aktivität v. VEGF
Osteopontin-Fragment	interferiert mit Integrin-Signalen
Maspin	Proteasen-Inhibitor
Canstatin, proliferin related protein, restin	unbekannte Funktion

Tabelle 2: Auswahl entscheidender antiangiogener Faktoren (mod. n. Carmeliet P. et al. 2000; Yancopoulos G.D. et al. 2000)

1.1.4.3 Ablauf der Angiogenese

Die Angiogenese lässt sich grundsätzlich in die folgenden sequentiellen Schritte einteilen: 1) nach der Ablösung der gefäßstabilisierenden Periozyten 2) kommt es zum Abbau der extrazellulären Matrix durch endotheliale Proteasen 3) eine darauffolgende mögliche Migration und Proliferation der Endothelzellen 4) führt zur Formation endothelialer Tuben (Röhren) 5) die wiederum durch eine neue Anlagerung von Periozyten stabilisiert werden (Battagay EJ. 1995; Hanahan D. et al. 1997). Versucht man diese grob schematische Darstellung biochemisch darzustellen und dabei Faktoren-Wirkungs-Beziehungen

aufzudecken beginnt man bei Angiopoietin-2 (Ang-2) mit seiner antagonistischen Wirkung auf den TIE-2 Rezeptor. Ang-2 ist verantwortlich für die Ablösung der Periozyten von der Gefäßwand und ist somit im übertragenen Sinne gefäßdestabilisierend (Carmeliet P. et al. 2003). Daraufhin stimuliert VEGF-A die Endothelzellen zur Formation neuer Gefäße indem es die Synthese von Proteasen vorantreibt und so den Abbau der extrazellulären Matrix- und somit Migration- und Proliferation ermöglicht (Carmeliet P. et al. 2003). Angiopoietin-2 selbst stimuliert die Angiogenese nicht, es steigert vielmehr, bei Kombination von beidem, die angiogene Wirkung von VEGF-A. Die Endothelzellen produzieren nach der Formation neuer Gefäße PDGF („platelet-derived growth factor“), dieser wirkt anziehend auf Periozyten (Carmeliet P. et al. 2003). Die somit quasi durch PDGF aktivierten Periozyten produzieren Angiopoietin-1 (Sundberg C. et al. 2002) sobald dieses (wahrscheinlich quantitativ), das durch die Endothelzellen hervorgebrachte Angiopoietin-2 überragt/dominiert, fixieren sich die Periozyten an den neuen Gefäßen und stabilisieren diese (Hirschi et al. 1998; Hirschi et al. 1999). Zudem wirkt Angiopoietin-1 direkt stimulierend auf die endotheliale Migration und Überlebensrate (Yancopoulos G.D. et al. 2000) Abschließend wird durch den direkten Kontakt von Endothelzellen und Periozyten TGF- β („transforming growth factor- β “) erheblich aktiviert und beschleunigt so die Reifung der „jungen Gefäße“ (Folkman J. & D'Amore P. A. 1996).

Angiogenese läuft im Erwachsenen nur vorübergehend in bestimmten Bereichen des Körpers wie dem Endometrium, dem ovariellen Follikel oder bei der Wundheilung ab (Carmeliet P. et al. 2003). Gegensätzlich dazu hat eine Angiogenese eine entscheidende Bedeutung für verschiedene pathologische Prozesse wie Tumore, diabetische Retinopathie und rheumatische Arthritis inne (Carmeliet P. et al. 2003). Der „angiogene Switch“ entscheidet durch Angiogeneseinduktion oder –inhibition über Gefäßwachstum, Gefäßerhalt oder Regression (Hanahan D., Folkman J. 1996; Carmeliet P. et al. 2003). Dieser Ablauf ist entscheidend für die Tumorprogression, da nur so Blutgefäße in den Tumor einwachsen und ihm Sauerstoff- und andere Stoffwechselmetabolite innerhalb des Diffusionslimits von 100-200 μm bieten können (Hanahan D., Folkman J. 1996; Carmeliet P. & Jain R.K. 2000). Nach Harris AL. 2002 bleibt selbst nach Neovaskularisation das Sauerstoffangebot unterhalb des zellulären Bedarfs. Demnach weisen Tumore konstante-, die Tumorzellbiologie beeinflussende hypoxische Verhältnisse auf (Harris AL. 2002). Der Sauerstoffmangel wirkt regulatorisch auf die Expression verschiedener angiogener Faktoren und ist somit beteiligt an der (Vaskulogenese und) Angiogenese (Carmeliet P. et al. 1998; Iyer N.V. et al. 1998; Ryan H.E. et al. 1998). Dementsprechend wird die Hypoxie als ein äußerst kritischer Parameter für die Tumorprogression und – Aggressivität dargestellt (Kunz & Ibrahim 2003). Durch diese Erkenntnisse wurde die antiangiogene Therapie zu einer vielversprechenden Therapie der Krebsbehandlung (Augustin H.G. 1998).

1.2 Die Tumorzelle

1.2.1 Ätiologie der Mundhöhlenkarzinome

Schon seit den siebziger Jahren ist der eindeutige Zusammenhang zwischen dem Tabak- und Alkoholkonsum und dem Mundhöhlenkarzinom bekannt (Graham S. 1977; Miller A.B. 1974; Wynder E.L. et al. 1957). 80 % aller Mundhöhlentumoren lassen sich diesen beiden Risikofaktoren zuordnen (La Vecchia C. et al. 1997), wobei familiäre Formen dieser Tumore nicht beschrieben wurden (Brachmann 1994). Bezüglich des Tabaks lassen sich sogar anhand der Anamnesedaten der Patienten realistische Dosis-Wirkungsbeziehungen aufstellen (Blot W.J. et al. 1988). Das Risiko, an einem Mundhöhlenkarzinom zu erkranken, scheint für starke Raucher bis zu fünfmal größer zu sein als für Nichtraucher (Martinez I. 1969). Alkohol dagegen sollte eher als Ko-Karzinogen betrachtet werden, dieser Kontext kann nur schwer isoliert betrachtet werden, da 90 % aller Patienten Raucher sind oder waren (Zöller J.F. 1995). Einige Studien weisen für Patienten, die zwar Alkohol, aber keinen Tabak konsumieren, eine relative Risikoerhöhung von 1,5 bis 5,8 nach (La Vecchia C. et al. 1997). Andere epidemiologische Studien weisen ein bis zu zehnmals größeres Risiko für starke Trinker nach als für Personen mit einem moderaten Alkoholgenuß (Wynder E.L. et al. 1957). Der gelegentliche Konsum von Wein kann das Risiko sogar senken (La Vecchia C. et al. 1997). Der synergistische Effekt von Tabak und Alkohol scheint die Risiken auf das bis zu hundertvierzigfache zu erhöhen (La Vecchia C. et al. 1997). Es wird nicht nur die Inzidenz durch den gleichzeitigen Konsum von Tabak und Alkohol erhöht, sondern auch der Zeitpunkt des Auftretens eines Mundhöhlenkarzinoms verschoben: Die Tumoren entstehen etwa 15 oder mehr Jahre früher als in einer Normalpopulation (Bross I.D.J. et al. 1976). Zusätzlich zum Tabak- und Alkoholabusus, kommt Entzündungen der Schleimhäute sowie chronischen Irritationen eine ätiologische Bedeutung zu. Prämaligene Läsionen wie die Leukoplakie bieten dabei klinisch eine Entwicklungsgrundlage für viele Tumore des oropharyngealen Traktes (Bouquot et al. 1998, Santos et al. 2005), ebenso zeigen Erythroplakien einen Zusammenhang mit Dysplasien und invasiven Karzinomen (Sciubba 2001).

Die eigentliche Karzinomentstehung des aerodigestiven Traktes wird durch zwei Theorien beschrieben:

1.2.2 Feldkanzerogenisierung

Durch Slaughter et al. entstand 1953 die Theorie der Feld-Karzinogenese (Slaughter 1953; Braakhuis et al. 2003). Diese Hypothese erklärt das Auftreten von syn- und metachronen Tumoren, auf der Basis, dass das aerodigestive Eingangsepithel karzinogenen Einflüssen gleichermaßen ausgesetzt ist und somit der gesamte Bereich für Krebsentstehung prädisponiert wird. Slaughter erklärt so die Entstehung multipler autonomer primärer epithelialer Tumore nach Karzinogenexposition. So kann ein langandauernd und kontinuierlich genetisch veränderter epithelialer Bereich multiple neoplastische Läsionen entwickeln (Prevo et al. 1999; Tabor et al. 2002; Simon et al. 2001). Dementsprechend beschreibt Braakhuis et al. 2003 einzelne präneoplastische Felder innerhalb einzelner- oder angrenzender anatomischer Bereiche mit der proportional hohen Entwicklung multipler primärer Tumore. Organsysteme für die die Feld-Karzinogenese beschrieben wird, sind: Plattenepithelkarzinome („HNSCC“: „head and neck squamous cell carcinoma“) im Cavum oris, Oropharynx und Larynx, Lunge (Franklin et al. 1997), Ösophagus (Prevo et al. 1999), Vulva (Rosenthal et al. 2002), Cervix (Chu et al. 1999), Colon (Jothy et al. 1996); Brust (Fortsis et al. 2001), Harnblasen (Takahashi et al. 1998) und Haut (Stern et al. 2002).

1.2.3 „Multi-Step-Theory“

Diese Theorie beschreibt nach Vogelstein et al. 1988 die Notwendigkeit der Akkumulation verschiedener Störungen auf zellulärer Ebene - bezüglich Proliferation, Differenzierung und Apoptose - somit mit Relevanz für den Phänotypus. Dazu gehören verschiedenste genetische Veränderungen, beispielsweise der Mutation des p53 Gens oder der Cyclin D1 Amplifikation (Anayama et al. 2001; Okuda et al. 1995; Oyama et al. 1994; Pennisi et al. 1998; Polayk et al. 1994). So durchlaufen genetisch entsprechend vorgeschädigte Zellen ein prämalignes Stadium um nach weiteren entscheidenden genetischen Veränderungen maligne zu transformieren (Lehrbach et al. 2003). Der Prozess der Feldkanzerogenisierung kann durch molekulare Beziehungen definiert werden und einer jeweiligen Position im Prozess der „multi-step“ Theorie zugeordnet werden (Braakhuis et al. 2003).

1.2.4 Epidemiologie

Dabei ist bekannt, dass in Deutschland pro Jahr mehr als 300000 Menschen an Krebs erkranken und etwa 25% aller Menschen an Tumorerkrankungen sterben. Zudem sind orale- und pharyngeale Tumoren mit einer weltweiten Inzidenz von 575000 diagnostizierten Fällen pro Jahr die fünft häufigsten Tumoren überhaupt (WHO 1997). Dabei sind Plattenepithelkarzinome mit einem Anteil von 90% der häufigste orale Tumore (Neville B.W., 2002; Weinberg, M. A., 2002). Oropharyngealtumore zeigen bezüglich ihrer Inzidenz und Mortalität seit Mitte der siebziger Jahre eine stetige Zunahme (Batzler W.U. et al. 2002). Seit Mitte des letzten Jahrzehnts stagniert in Deutschland die Mortalität bei Männern (Batzler W.U. et al. 2002).

1.2.5 Tumorangiogenese

Vor annähernd hundert Jahren wurden angiogenetische Abläufe erstmals in der direkten Umgebung von Tumoren beschrieben. Seit 1968 wurde hypothetisch angenommen, dass Tumore diffusionsfähige „angiogene“ Substanzen synthetisieren und sezernieren.) Folkman sprach 1972 erstmals von einer Angiogeneseabhängigkeit des Tumorwachstums und der Metastasierung. Daraus folgend entstand die Zielstellung eine Wachstumshemmung der Tumore durch das Blockieren der Angiogenese zu erreichen. Dabei ist das Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren entscheidender Regulator der Angiogenese (Carmeliet P. et al 2000).

Das tumoröse Geschehen charakterisiert sich durch autonome Größenzunahme die wiederum indirekt eine spätere Metastasierung erleichtert bzw. ermöglicht. Die Angiogenese stellt dabei die Voraussetzung für eine Größenzunahme über einen Durchmesser von 2cm dar (Huang Z et al. 2004). Die Angiogenese Abhängigkeit wurde erstmals von Folkman et al. 1972 in einem in vivo Modell dargestellt. Bis zu diesem Durchmesser kann er durch Diffusion aus der Umgebung versorgt werden, es wird also ein gefäßführendes Tumorparenchym benötigt. Carmeliet P. & Jain R.K. zeigten 2000, dass als Diffusionslimit ein Abstand von 100-200µm gilt (Carmeliet P. & Jain R.K. 2000).

Als Angiogeneseinduktoren gelten angiogenetische Faktoren, die sowohl von Wirtszellen als auch von Tumorzellen sezerniert werden (Verheul H.M. et al. 2004; Tang D.G. et al. 2004). Dabei unterscheidet man grundlegend nach ihrer Wirkung Stimulatoren- und Inhibitoren der Angiogenese (Carmeliet P. et al. 2003). Die Gefäßeinsprossung wird komplex durch verschiedenste Faktoren reguliert, und resultiert aus einer chemotaktisch ausgelösten Migration der Tumorzellen zu den Endothelzellen hin (von Bülow C. et al. 2001). Lange

wurde angenommen, dass Tumorzellen durch direkte Chemotaxis eine endotheliale Migration auslösen. Von Bülow C. et al. 2001 zeigten jedoch, dass die parakrin ausgelöste chemotaktische Wirkung von Endothelzellen auf Tumorzellen wesentlich stärker ausgeprägt ist als die endotheliale Migrationsinduktion durch Tumorzellen (von Bülow C. et al. 2001).

In diesem Zusammenhang werden hypoxie-bedingt verschiedene Transkriptions- und Wachstumsfaktoren gebildet. HIF („hypoxia inducible factor“) ist ein Heterodimer, welches aus einer sauerstoffabhängigen α - und einer β -Untereinheit besteht, beide Komponenten werden stetig in konstanter Rate synthetisiert (Wang G.L. et al. 1995; Choi K.M. et al. 2002; Berta M. et al. 2004; Brahimi-Horn MC. et al. 2005).

Das quantitativ erhöhte HIF-Protein steigert proportional seine Wirkung (Carmieliet et al. 2000; Berta M. et al., 2004; Brahimi-Horn MC. et al. 2005), wie z.B. auf die Transkriptionsrate des EPO-Genes. Zusätzlich zum Einfluß von Sauerstoff wird die Stabilität- und Aktivität von HIF-1 alpha durch Interaktionen mit verschiedenen Proteinen wie pVHL-, P53- und p300/CBP-, sowie durch posttranslationale Modifikationen-, Hydroxylierungen-, Acetylierungen- und Phosphorylierungen reguliert (Choi K.M. et al. 2002). Shweiki et al. ging 1992 davon aus, dass hypoxischen Verhältnisse die Bildung eines hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor I (HIF) verursachen, dieser wiederum induziert nach Shweiki et. al. die hypoxiebedingte Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF). Nach Berta M. et al., 2004 resultiert während der Tumorangiogenese das rapide Wachstum der Tumorzellen schnell im Absinken der Sauerstoffkonzentration – die bevorzugt im Zentrum des Tumors entstehende Hypoxie induziert angiogenetische Faktoren. So beeinflusst HIF 1 alpha z.B. die posttranslationalen Modifikationen eines Schlüsselproteines der Regulation der Blutgefäßformation: VEGF. Streng genommen sprechen Berta M. et al. eher von einer Modifikation als von einer Induktion. Fillies T. et al. beschreiben für orale Plattenepithelkarzinome (T1 und T2) eine günstige Prognose bei vorliegender HIF 1 alpha Überexpression (Fillies T. et al. 2005).

Endothelspezifische VEGF-Rezeptoren (VEGF-R1, VEGF-R2 oder KDR) (Costa C. et al. 2004) vermitteln über Tyrosinkinaseaktivität die parakrine Proliferationsstimulation der Gefäßendothelien. Zudem beteiligen sich verschiedene Cytokine wie TGF- β , FGF oder Cox (Kofler S. et al. 2005; Rosenkilde M.M. et al. 2004; Riedl K. et al. 2004), Integrine (Hwang R. et al. 2004) und Angiogenin u.v.m. an der Gefäßneubildung. Die Gefäßneubildung in einen Tumor steigert das Metastasierungsrisiko erheblich, da so eine hämatogene Streuung von Tumorzellen des Primärtumors wesentlich wahrscheinlicher ist, obwohl dabei interessant ist, dass nur 0,01% der im Blut zirkulierenden Tumorzellen schließlich im Stande sind metastatische Kolonien zu bilden (Howell G.M. et al. 2005).

1.2.6 Invasion und Metastasierung

Sowohl Invasion als auch Metastasierung gehören zu den wichtigsten Charakteristika maligner Tumore. Die Invasion (Syn.: Infiltration) beschreibt ein aktives Einwachsen von Tumorzellen in normales Gewebe, wobei infolge der Destruktion der Verlust der Gewebsstruktur einhergeht. Die Metastasierung beschreibt fortführend die auf invasives Wachstum folgende Verschleppung von Tumorzellen mit dem Einwachsen einer Metastase (Tochtergeschwulst) in weit entfernten Bereichen des Körpers - also ohne Kontinuität zum Primärtumor. Die Fähigkeit zur Metastasierung ist nach Thomas et al 1995 einer der Unterschiede zwischen malignen und benignen Tumoren (Thomas et al. 1995). Während sich Sarkome früh hämatogen ausbreiten, metastasieren Karzinome meist zunächst lymphogen (Thomas et al. 1995). Spätrezidive, die lange nach der erfolgreichen Primärtumorbehandlung auftreten, sind auf metastasierte Tumorzellen oder kleine Tumore zurückzuführen, die häufig einen teils jahrelangen Tumorschlaf („tumor dormancy“) durchleben (Naumov G.N. et al. 2001). Diese allgemeingültige Aussage sucht jedoch ihre Bestätigung für das Plattenepithelkarzinom noch. Der Tumorschlaf entsteht durch endogene Angiogeneseinhibitoren wie Thrombospondin 1 oder Angiostatin (Huang Z. et al. 2004) und stellt sich prinzipiell als ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose dar (Carmieliet et al. 2000). Invasives Wachstum lässt sich in seinem Ablauf prinzipiell in drei Schritte gliedern: Es beginnt mit der Auflösung von Zell-Zell-Kontakten, zeigt dann eine enzymatische Degradation und einen Umbau der extrazellulären Matrix und findet seine Vollendung in aktiven Bewegungen (Lokomotion) der Tumorzelle. Invasive Zellen zeigen demnach Veränderungen ihrer Adhäsion, Motilität und ihres Protease-Antiprotease Gleichgewichtes (Perumpanani A.J et al. 1996). Die Metastasierung kann entlang verschiedener anatomischer Determinanten verlaufen, insofern ist die hämatogene-, lymphogene-, kavitäre- und kanalikuläre Metastasierung bekannt, dementsprechend ist der Zusammenhang zwischen der Metastasierung und angiogenetischen- bzw lymphangiogenetischen Prozessen deutlich (Huang Z. et al. 2004). Die Metastasierung erfolgt in mehreren Schritten und kann komplex innerhalb einer Metastasierungskaskade zusammengefasst werden. Zusammenfassend wird in dieser Kaskade die Intravasation, Verschleppung von Tumorzellen, Extravasation und letztendliche Metastasenbildung dargestellt.

Es kommt also durch destruktives Tumorwachstum zum Einbruch von Zellen oder Zellverbänden in vor allem die Lymph- oder Blutgefäße, wobei die seitenspezifische lymphogene Aussaat die häufigste Form der Metastasierung ist. So gelangen vom Primärtumor losgelöste Tumorzellen mit dem interstitiellen Lymphabfluß- oder auch durch eine amöboide Eigenbeweglichkeit in die regionären Lymphknoten. Dort gelangen sie über die Vas afferentia in den Randsinus des Lymphknoten, dem Weg der Lymphe folgend

durchwandern die Zellen anschließend den Interfollikularsinus um letztendlich durch den Marksinus die Vas efferentia am Lymphknotenhilus zu erreichen und in den nächsten Lymphknoten verschleppt zu werden. Die sich daraus ergebende Möglichkeit von mehreren hintereinander liegenden Lymphknotenmetastasen wird auch als Lymphangiosis carcinomatosa bezeichnet. Ebenso können Tumorzellen die entsprechenden Lymphknotenstagen durchlaufen ohne zu metastasieren. Lymphknotenmetastasen oder das beschriebene Lymphangiosis carcinomatosa können bei entsprechender Lage und Größe den weiteren Lymphabfluß behindern und ermöglichen so eine retrograde Metastasierung. Die hämatogene Metastasierung bildet in Abhängigkeit der relativen Lokalisation des Primärtumors zu bestimmten Filterorganen ein bestimmtes Metastasierungsmuster aus. Der häufigste Ort der hämatogen gestreuten Metastasen ist die Lunge. Die hämatogene Metastasierung tritt bei oralen Plattenepithelkarziomen jedoch nur mit einer sehr geringen Häufigkeit auf.

1.2.7 Tumordiagnostik

Die Tumordiagnostik beginnt mit der klinischen Exploration woraufhin eine Einteilung des pathologischen Befundes entsprechend der TNM-Klassifikation erfolgt (Wittekind et al. 2002). Daran angelehnt ist eine Stadieneinteilung nach der UICC („Union Internationale Contre Cancer“) möglich (UICC 2002). Die Ausdehnung des Primärtumors wird durch hinzufügen von Zahlen z.B. zum „T“ definiert. Das Vorhandensein oder Fehlen von regionären Lymphknotenmetastasen wird mit dem „N“ für Nodus abgekürzt und ebenfalls numerisch untergliedert. Gleiches gilt für mögliche Fernmetastasen, welche durch „M“ beschrieben werden. Somit entsteht nach eingehender Diagnostik ein Buchstaben-Zahlen-Code (z.B. T2N1M0), der die anatomische Ausdehnung der malignen Veränderung darstellt. Das TNM-Schema wird zudem in eine prätherapeutische (TNM) und eine posttherapeutische Form (pTNM) untergliedert. Beide ermöglichen eine Stadieneinteilung. Der prätherapeutische Befund dient der Beurteilung und Auswahl entsprechender Therapieformen und basiert auf allen zur Verfügung stehenden diagnostischen Untersuchungsmethoden. „pTNM“ hingegen bietet durch die zusätzliche histopathologische Befundung die Möglichkeit der Therapiebewertung (durch Vorhandensein oder Fehlen eines Residualtumors, angegeben mit „R“) und Prognosestellung (anhand des histol. Gradings, angegeben mit „G“) ergibt. Weitere Parameter ermöglichen eine noch eindeutigere Darstellung der durchgeführten TNM-Klassifikation. Der Sicherheitsfaktor „c“ (certainty) gibt die diagnostische Methodik der Klassifikation an und lässt so eine kritische Bewertung der Tumorklassifikation zu. Die TNM-Klassifikation führt so von der Diagnose des pathologischen Befundes zur Therapie.

1.2.8 Tumorthherapie

1.2.8.1 Präoperative Maßnahmen

Eine umfassende Behandlung beginnt mit präoperativen Überlegungen: wie ist der Allgemeinzustand des Patienten, wie der Ernährungsstatus, wie der Zahnstatus? Bestehen Nah- oder Fernmetastasen? Welches therapeutische Vorgehen bedeutet für den Patienten die größten Heilungschancen und die geringsten Risiken? Zu diesem Zweck durchläuft jeder Patient ein umfangreiches Staging. Eine Zahnsanierung muss immer durchgeführt werden, insbesondere dann, wenn eine Bestrahlung des Patienten geplant ist (Lockhart P.B. et al. 1994; Keys H.M. et al. 1976). Dabei sollten periapikale Läsionen, Karies und retinierte Zähne entfernt werden. Auch der Zahnersatz muss geprüft und gegebenenfalls verbessert oder entfernt werden. All diese Maßnahmen dienen dazu, Extraktionen nach der Bestrahlung zu vermeiden, da dadurch eine infizierte Osteoradionekrose entstehen kann (Morrish R.B. et al. 1980). Die Zahnsanierung muss spätestens 2 Wochen vor der Bestrahlung abgeschlossen sein. Eine Fluoridierungsschiene hilft, Strahlenkaries zu vermeiden (Regezi J.A. et al. 1976). Die Patienten sollten sich das Rauchen abgewöhnen, da sonst ein erhöhtes Rezidivrisiko besteht (Day G.L. et al. 1994; Browman G.P. et al. 1993). Die Therapie sollte immer individuell auf den Patienten abgestimmt sein. Da viele Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle starke Raucher und Trinker gewesen sind, liegen bei dieser Patientengruppe oft auch pulmonale und kardiovaskuläre Erkrankungen vor. Bei 25 % der Patienten liegt eine Unterernährung vor (Goodwin W.J. et al. 1993), welche mit einem erhöhten Risiko einhergeht, während der Operation zu versterben (Hooley R. et al. 1983). Hier ist das Legen einer Magensonde oder einer PEG-Sonde sinnvoll.

1.2.8.2 Chirurgische Therapie

Die obligat präoperative klinische und radiologische Untersuchung ermöglicht erst den chirurgischen Eingriff, dient, auch wenn die endgültige Resektatgröße erst intraoperativ festgelegt wird, vorbereitend einer genauen Größen- und Lagebestimmung. Die Resektion in sano wird gegebenenfalls intraoperativ durch Schnellschnittuntersuchungen oder durch histopathologische Nachuntersuchungen festgestellt. Cervikale Lymphknoten werden durch die sog. Neck dissection entfernt, dabei handelt es sich um die chirurgische Eröffnung der Halsweichteile mit anschließender Resektion verschiedener vorwiegend lymphatischer anatomischer Strukturen. Diesbezüglich kann man die früher fast ausschließlich

durchgeführte radikale Neck dissection, mit der Entnahme des Musculus sternocleidomastoideus, des Nervus accessorius sowie der Vena jugularis und die inzwischen in verschiedenen Variationen immer weiter verbreitete funktionelle Neck dissection, bei der extralymphatische Strukturen erhalten bleiben unterscheiden (Buckley J.G. et al. 2001). Da die Lymphknoten bei klassischen N0-Tumoren zu 20% falsch-negativ sind wird die Neck dissection in diesen Fällen kontrovers diskutiert. Bei diesen Tumoren ist nicht sicher, ob eine Halslymphknotenausräumung eine Prognoseverbesserung mit sich bringt. Weitere diagnostische Verfahren wären hilfreich.

1.2.8.3 Strahlentherapie

Bestrahlungen können prä- und postoperativ erfolgen, sie können im palliativen Sinn, anstelle einer Operation- (kurativ) oder in verschiedenen Kombinationsformen durchgeführt werden. Die Strahlentherapie muss immer auf die jeweilige Patientensituation abgestimmt werden. Im Vergleich von prä- und postoperative Bestrahlungen, ist der therapeutische Effekt bei der postoperativen Radiatio größer (Tupchong L. et al. 1991; Marcial V.A. et al. 1982). So wird die Indikation zur postoperativen Bestrahlung von T3-, T4- und invasiv wachsenden Tumoren deutlich. Durch postoperative Bestrahlungen ist es, insofern es innerhalb einer chirurgischen Therapie nicht möglich war oder gelungen ist tumorfreie Resektionsränder zu präparieren, möglich die Lebenserwartung zu erhöhen (Vikram B. et al. 1984; Zelefsky M.J. et al. 1990; Huang D.T. et al. 1992). Besonders wichtig für die dreidimensionale Ausrichtung der Radiotherapie sind genau Kenntnisse des lymphogenen Metastasierungsverhaltens, so geben Lage und Größe des Primärtumors die Ausdehnung des Bestrahlungsfeldes vor (Pfreundner L. et al. 1996).

1.3 Genexpressionsbeobachtung

1.3.1 Einleitung

Polyoligonukleotidarrays stellen ein potentes Verfahren dar und bieten einen schnellen Zugang zu genetisch kodierter Information. Infolgedessen hat diese Technologie eine enorme Bedeutung für die biologische - und biomedizinische Forschung (McGall G.H. et al. 2002; Rui M. et al. 2003; Schena R. et al. 2000). Diese Technologie, die inzwischen Standard für das Auffinden von Genfunktionen, das Evaluieren von Medikamenten, die Analyse von Stoffwechselwegen und die Klassifizierung klinischer Muster geworden ist, ermöglicht es zehntausende Transkripte in nur einem einzigen Experiment aufzuspüren und zu quantifizieren (Rui M. et al. 2003). Biologische Systeme lesen, speichern und modifizieren genetische Information; jeder Nukleinsäurestrang hat durch Basenpaarung die Fähigkeit der Erkennung von komplementären Sequenzen. Die Arrays sind im Wesentlichen große Sets von Nukleinsäure- Probe- Sequenzen die in definierten, „adressierbaren“ Lokalisationen auf einer Substratoberfläche festgelegt wurden und dazu fähig sind große Mengen genetischer Information in einer einzigen Hybridisierungsuntersuchung zugänglich zu machen (McGall G.H. et al. 2002).

Mikroarrays wurden Mitte 1990er verfügbar, sie ermöglichten einen riesigen Vorwärtssprung in der Anzahl von Genen, die parallel in einer gegebenen Probe analysiert werden konnten. (McGall G.H. et al. 2002) Ihre enorme Leistungsfähigkeit in der globalen, parallelen Genexpressionsbeobachtung macht sie zu einem idealen Ausgangspunkt für eine schnelle Bewertung der unterschiedlichen transkriptionellen Profile von verschiedenen Geweben oder Zellarten (Schena R. et al. 2000).

Mikroarrays basieren auf den gleichen Prinzipien wie Northern Blots, differentielle Hybridisierungen und andere hybridisierungsbasierte Techniken (McGall G.H. et al. 2002). Im typischen Experiment werden zwei RNA Muster, beide mit unterschiedlichen Fluorophoren gekennzeichnet, simultan auf dem Mikroarray hybridisiert. Diese kompetitive Hybridisierung erlaubt den direkten Vergleich der relativen Genexpression beider RNA Muster auf dem Array (Schena R. et al. 2000).

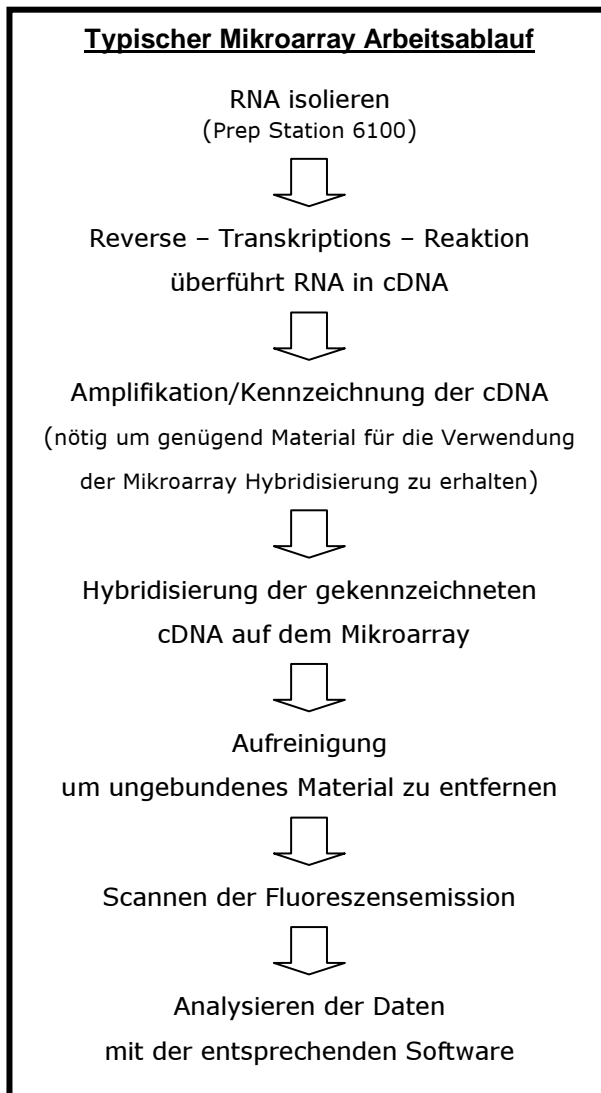


Abbildung 1:

dieser Grundriss stellt die typische Arbeitsabfolge eines Mikroarrayexperimentes dar

1.3.2 Methodik der „GeneChips“-Affymetrix

Die Firma Affymetrix nutzt die Technik der leicht gerichteten („light-directed“) Synthese, diese ermöglichte es, hunderttausende Oligonukleotid Probe Sequenzen auf einem Glas „Chip“, mit weniger als als 1 cm² Größe unterzubringen. Dabei werden 5´- oder 3´ endständig schützende Gruppen von der fortlaufenden Oligonukleotidkette an vordefinierten Regionen der Glasoberfläche entfernt, dies geschieht durch eine photolithographische Maske, die wiederum die Lichteinwirkung kontrolliert (McGall G.H. et al. 2002). Somit

erzeugte die fluoreszente Markierung photolumineszente Signale während der Hybridisierungsreaktion.

1.3.3 Methodik der „TaqMans“-Applied Biosystems

Für die Genexpressionsarrays der Firma Applied Biosystems (TaqMans®) hingegen gilt, dass jede Probe ein synthetisches Oligonukleotid mit 60 Nukleotiden (nt) ist und für ein spezifisches und maximales Signal konzipiert wurde. Die Länge von 60nt bietet die optimale Länge für die spezifischen Erkennung, Oligos dieser Länge bieten die beste Kombination von Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu kürzeren Oligos oder cDNA Proben. 60-mer Oligomeren (oligos) haben gute Spezifität für einzelne Basen, wie sie bei kürzeren Oligos zu erwarten wären und eine starke Sensitivität für lange Fragmente vergleichbar den cDNA Arrays. Veröffentlichte Daten zeigten, dass 60-mer Oligos sowohl cDNA als cRNA mit ca. 5-10fach stärkerer Dichte binden als 25mer oligos (Reidhaar-Olson et al. 2001). Die Oligonukleotid Proben werden durch kovalent am 3' Ende gebundene C6-Spacer modifiziert. In vielen Fällen werden die Proben mit einem 3'UTR („UTR“: „untranslated region“) erstellt da diese so eine geringere Homologie untereinander haben als die kodierenden Regionen der verschiedenen Gene. Dieses Vorgehen erhöht die Spezifität des Arrays.

1.3.4 Photolithographie – GeneChips Technologie - Affymetrix

Durch die Möglichkeit der parallel synthetisierten großen Sätze von Probe Sequenzen stellt die Photolithographie ein sehr effizientes Werkzeug für die „high-density Arrays“ dar, dafür wird exemplarisch die Firma Affymetrix als Anwender dieser Technologie aufgeführt. Die Anzahl der nötigen synthetischen Schritte für die Arrayproduktion hängt von der Länge der Proben nicht aber von der Anzahl der Proben ab (McGall G.H. et al. 2002). Es können effiziente Strategien verwendet werden um beliebige Polynukleotide, in einer geringen Anzahl von chemischen Schritten, an speziellen Lokalisationen auf dem Array zu synthetisieren. Zum Beispiel kann der komplette Satz von 4^n Polynukleotiden der Länge n – oder jeder Teil- oder Untermenge in $4n$ Zyklen synthetisiert werden. Daraus folgt: mit einer gegebenen Referenzsequenz kann ein DNA Probe Array, bestehend aus einer hoch dichten Zusammenstellung mit wenigen Einschränkungen in den Gestaltungsparametern hergestellt werden. Synthetische Marker, modifiziert mit photochemisch austauschbaren Gruppen

wurden so auf Glassubstraten aufgebracht, daraufhin wird Licht durch eine photolithographische Maske auf spezielle Areale auf der Oberfläche gestrahlt, dabei entstehen lokalisierte Photodeprotektionen. Die Masken können so erstellt werden, dass sie für eine Vielfalt von Anwendungen verwendet werden können. Die meisten Arrays beinhalten handelsübliche Sätze von Proben mit einer 20(er) oder 25(er) Basenlänge (McGall G.H. et al. 2002). Zu den einschränkenden Faktoren gehört die räumliche Auflösung des photolithographischen Prozesses, dieser bestimmt die maximal erreichbare Dichte des Arrays und somit auch die Menge an Sequenzinformation die auf einem gegebenen Chip mit einer bestimmten physikalischen Dimension maximal kodiert werden kann (McGall G.H. et al. 2002). Der Umfang an Nukleinsäureinformation der in Form von unterschiedlichen Proben auf dem Array kodiert wird ist nur durch die physikalische Größe der Arrays und die erreichbare lithographische Auflösung limitiert. Durch Kontaktlithographie können „GeneChips“ mit individuellen Probe in einer Größe von 18 x 18 µm hergestellt werden. Diese Technologie hat sich als fähig für die Fabrikation von Arrays mit einer Dichte von mehr als 10⁶ Sequenzen/cm², korrespondierend zu einer Größe von ca. 10 x 10 µm erwiesen. Zusammenfassend erlaubt die Photolithographie die Anfertigung von Arrays mit hohem Informationsinhalt. Da die Arrays auf rigidem Material (Glas) konstruiert werden können sie umgekehrt in einem Hybridisierungsraum montiert werden. Fluoreszenz markierte Nukleinsäureausschnitte werden in den Raum eingeführt und kreuzen sich mit den komplementären Oligonukleotiden auf dem Array. Laserstimulation dringt durch die Rückseite des Glases, fokussiert auf die Grenzstelle der Arrayoberfläche und die gewünschte Auflösung. Die Fluoreszenzemission wird durch eine optische Linse gesammelt und passiert auf dem Weg zu einem sensitiven Detektor einige optische Filter. Durch einfaches Scannen des Laserstrahles oder „übersetzen“ des Arrays, bzw. einer Kombination von beidem, erhält man ein quantitatives zweidimensionales fluoreszentes Abbild der Hybridisierungsintensität.

1.3.5 Chemilumineszenz- TaqMan Technologie – Applied Biosystems

Die Chemilumineszenz ist in Bezug auf Hybridisierung, Visualisierung und Quantifizierung eine ideale Technologie für Mikroarray Analysen und wird beispielsweise durch das Unternehmen Applied Biosystems verwendet. Mit Digoxygenin (DIG) gebundene cDNA oder cRNA wird im Hybridisierungsraum auf dem Mikroarray bei 55°C für 16h inkubiert. Ein anschließender Waschgang entfernt überschüssige DIG-gebundene Moleküle daraufhin wird ein Alkalin-Antikörper Konjugat zugegeben, dass sich mit seiner Bindung zu DIG orientiert. Eine folgende Zugabe von „Substrat“ (genaue chemische Zusammensetzung

fehlt) und einem Chemilumineszenzverstärker initiieren das chemilumineszente Signal. Der Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer übernimmt die Datensammlung. Die chemilumineszente Technologie benötigt keine Exzitation und resultiert in einem sehr geringen Level von Hintergrundsignalen („background noise“). Sie beeindruckt mit ihren „Signal-to-Noise“ (Verhältnis der Signale zu den Ergebnissen) Ergebnissen und ermöglicht ohne das Zurückgreifen auf weitere Array Konfigurationen eine Erfassung niedriger Expressionslevel.

Die Proben der Applied Biosystems Mikroarrays werden unter der Verwendung von Standard Phosphoramidite- und Solid-Phase Synthese hergestellt. Die so erzeugten Proben werden kovalent am 3'Ende auf einer Glas- oder Nylonoberfläche gebunden. Applied Biosystems verwendet zur Registrierung von Hybridisierungsreaktionen auf der Arrayoberfläche Chemilumineszenzreaktionen. Das intensive Signal, das aus der verstärkten chemilumineszenten Reaktion hervorgeht ermöglicht eine Beobachtungssensitivität die im Vergleich zu nicht-chemilumineszenten Technologien wie der Fluoreszenz außerordentlich hoch ist.

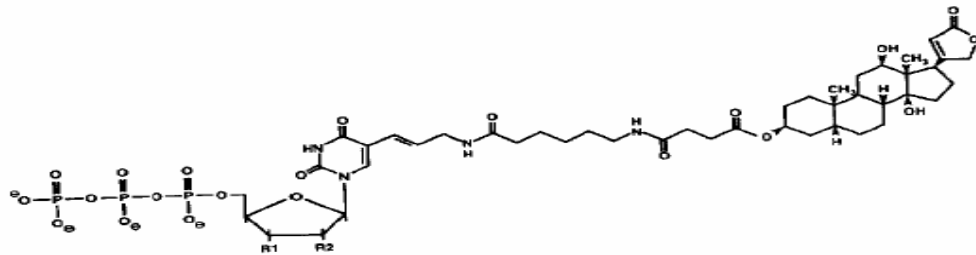


Abbildung 2: Struktur von DIG gekennzeichneten Uridin Nukleotiden (mod. n. Applied Biosystems)

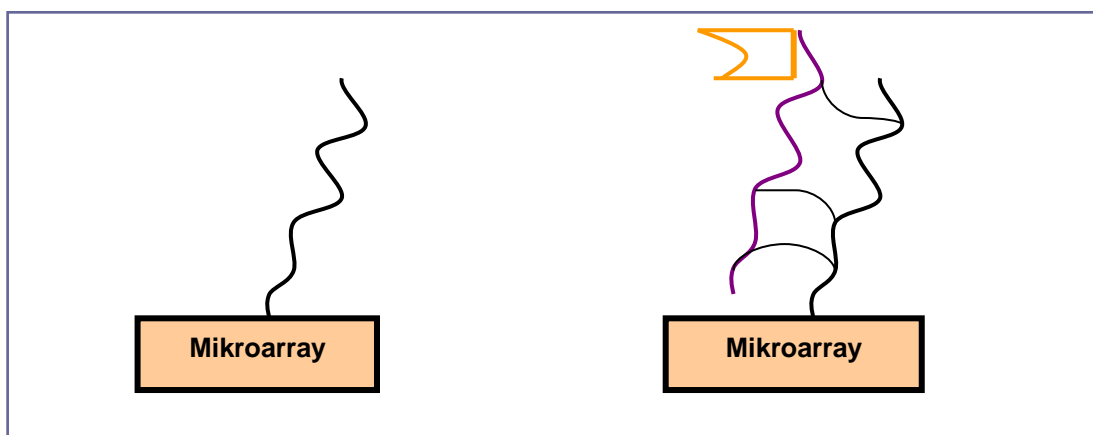


Abbildung 3: immobilisierter Oligo mit später gebundener DIG-gebundener cDNA oder cRNA (mod. n. Applied Biosystems)

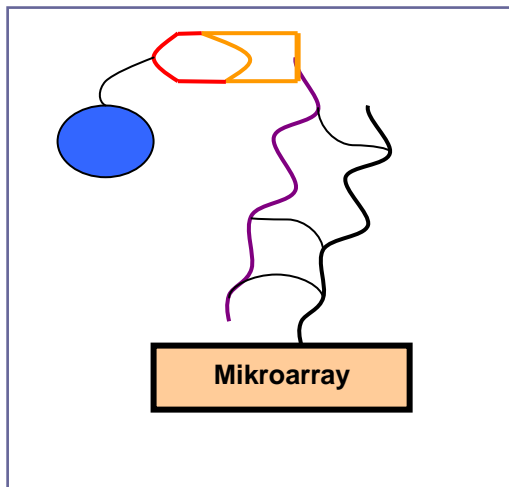


Abbildung 4: DIG-Antikörperbindung, der Antikörper ist mit der alkalischen Phosphatase gebunden (mod. n. Applied Biosystems)

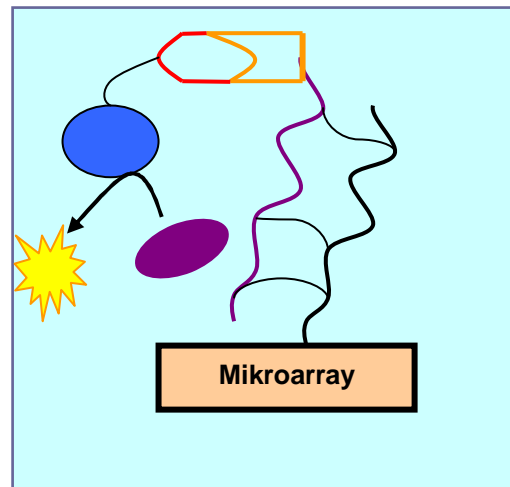
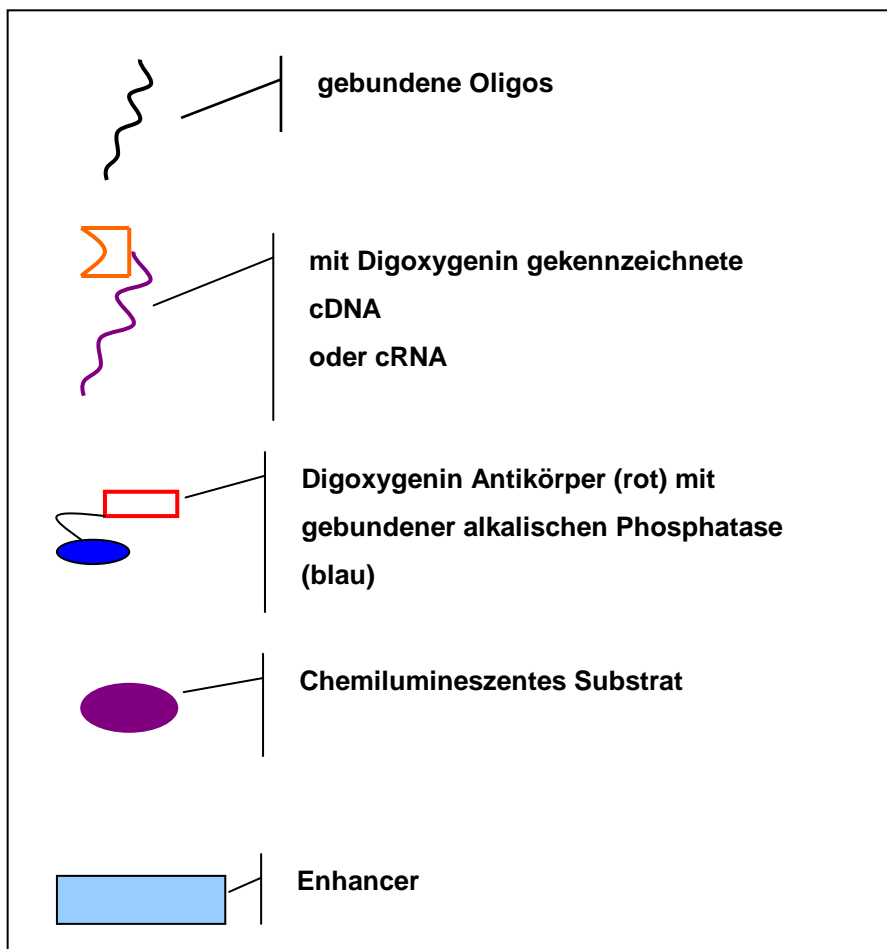


Abbildung 5: das sog. Chemilumineszente Substrat bildet durch die Reaktion mit der alkalischen Phosphatase Chemilumineszenz, diese wird durch die zugegebene Enhancerflüssigkeit verstärkt (mod. n. Applied Biosystems)



Applied Biosystems 1700 Chemilumineszenz Analyzer

Dieses Gerät enthält hoch präzise elektro-optische Systeme für die schnelle und hoch sensitive Wahrnehmung der Mikroarraychemilumineszenz. Zusätzlich wird durch den 1700 Analyzer der Mikroarray auch mit fluoreszenten Komponenten dargestellt; dies ermöglicht eine Rasterherstellung, Normalisierung und identifiziert jede Veränderung mit höchster Genauigkeit. Während der Array Herstellung wird zusätzlich zu den einzelnen 60-mer Proben eine interne 24-mer Kontrollprobe auf dem Mikroarray platziert. Während des Hybridisierungsschrittes werden jeweils komplementäre Oligonukleotide zu der Hybridisierungsmixtur hinzugegeben. Diese Kontrollprobe ist mit einem fluoreszenten Anteil gekennzeichnet (LIZ dye). Die anschließende Analyse des Mikroarrays durch den „1700 Analyzer“ im fluoreszenz Modus kann alle Eigenschaften mit absoluter Sicherheit unabhängig vom chemilumineszenten Expressionssignal „haargenau“ darstellen. So kann durch die internen Kontrollproben die Herstellungsqualität beurteilt werden, eine Gegenüberstellung verschiedener beobachteter Eigenschaften sowie ganzer Array Ergebnisse wird so denkbar. Wie schon angedeutet bringt eine automatische Rasterung des Arrays die Möglichkeit des erleichterten und schnelleren Auffindens gesuchter Spots. Der Applied Biosystems 1700 Analyzer entspricht mit seiner CCD Kamera absolut dem „State-of-the-Art“. Ein motorisiertes Chassis bewegt den Mikroarray in den Beobachtungsbereich des Analyzer um dort die chemilumineszenten- und fluoreszenten Signale zu erfassen. Die Systemsoftware stellt anschließenden Bezug zwischen der ermittelten Intensität und der Genexpression, der genauen Eigenschaftsregistrierung und einer Datenqualitätskontrolle her. Das Ausbleiben von Hintergrundsignalen kombiniert mit der hochreproduzierbaren Photonemission führt zu einem „Signal-to-Noise“ Verhältnis, das nahezu äquivalent zu den stattgefundenen Hybridisierungen ist und somit die Eigenschaften vergleichbarer Arraysysteme bei Weitem übertrifft. Die Zielstellung der Applied Biosystems Human Genome Survey Microarrays ist auf einem einzigen Microarray ein Probeset zu konzentrieren, das in der Lage ist jedes human exprimierte Gen aufzuspüren. Dabei hat nur Applied Biosystems Zugriff zu sowohl öffentlichen- als auch der Celera Datenbank. Somit wird die Informationsquelle durch die Celera Human Genome Datenbank-, die RefSeq Transkripte die strukturell durch die Locuslink public Datenbank gestellt werden-, die Mammalian Gene Collection (MGC)¹-, die GeneBank mRNA und Gentranskripte die durch Applied Biosystems selbst ermittelt wurden, dargestellt. Das Applied Biosystems Human Genome Survey Microarray bietet 31700 Proben zur Überprüfung von 27868 Genen. Von diesen qualitativ hochwertigen Gensets stammen 28% ausschließlich von Celera Genomics, diese sind nicht in öffentlichen Datenbanken erhältlich. Die verbleibenden 71% des Gensets werden durch öffentliche Domänen wie der RefSeq-, GenBank mRNAs-, MGCs- und wiederum mit einem Hauptteil durch die Celera Genomics Datenbank gestellt. Zudem enthält das Genset 2646 einzigartige Gene, deren Sequenzdaten nur geringfügig oder gar

nicht in öffentlichen Datenbanken aufgeführt sind, die jedoch durch experimentelle Untersuchungen von Applied Biosystems ermittelt wurden.

1.4 Ein Vergleich von Affymetrix und Applied Biosystems

Ein direkter Vergleich zwischen dem Applied Biosystems (ABI) Human Genome Array und dem HG u133A und B Mikroarray von Affymetrix stellt deutliche Unterschiede dar. So werden die Proben bei ABI mit einer Länge von 60-mer Oligonukleotiden auf einer Nylonmembran fixiert, während Affymetrix seine 25-mer langen Oligonukleotide auf einer Glasoberfläche synthetisiert. Die Anzahl der Proben entspricht bei ABI ca. 30000 abgesicherten Genen pro Array dem stehen bei Affymetrix ca. 39000 ESTs und Genen auf zwei Arrays gegenüber. Dabei ist auch entscheidend, dass die Datenquelle der Geninformation bei ABI durch sowohl öffentliche- als auch die Celeradatenbank- bei Affymetrix dagegen nur durch öffentliche Datenbanken gestellt wird. Für die eigentliche Genexpressionsbeobachtung verwendet Applied Biosystem eine gekühlte CCD-Kamera, welche die chemilumineszenten Signale erfasst. Affymetrix registriert die durch die verwendete Methodik entstandene Fluoreszenz durch Laser Scanning. So führt z.B. die Probenlänge bei ABI zu deutlich besseren Sensitivitäts-Spezifitäts-Verhältnissen. Die Chemilumineszenz bringt den Vorteil einer, wenn man sie so bezeichnen möchte, autonom strahlenden Reaktion, d.h. es ist keine Lichtbestrahlung nötig um eine Emission zu erreichen. Für die Fluoreszenz, welche bei den Affymetrix-Genechips verwendet wird, ist jedoch eine Lichtquelle nötig um Moleküle mit fluoreszenten Eigenschaften zur Emission anzuregen. Diese Notwendigkeit der „Beleuchtung“ der Glasoberfläche auf der die Oligonukleotide vorliegen bringt negative Effekte wie Reflektionen und Hintergrundeffekte (Hintergrundgeräusche: „background noise“) mit sich und führt so zu falsch-positiven- sowie falsch-negativen Ergebnissen. Man könnte von einer stärkeren Unklarheit der Affymetrixmessungen durch eine methodische Verwischung von Messungen reden. Dementsprechend kam es in dieser Versuchsreihe zur Anwendung des „Taqmans“ der Firma Applied Biosystems. Diese Technik bietet im Vergleich zu Angeboten von Konkurrenzunternehmen zwei entscheidende Vorteile. Durch die Anwendung chemilumineszenter Prozesse und zum anderen durch 60mer Oligos von ca. 30000 validierten Genen wird ein maximales Sensitivitäts-Spezifitäts Verhältnis erreichbar. Das chemilumineszente Korrelat wurde durch die Applied Biosystems 1700 Chemielumineszens Analyzer und entsprechende Software greifbar gemacht. (Tabelle 1.)

Tabelle 3: Vergleich Applied Biosystems - Affymetrix

	Applied Biosystems (Taqman)	Affymetrix (HG U133A und B)
Proben	Oligomere, die auf eine Nylonmembran aufgebracht sind	Oligomere werden auf einer Glasoberfläche synthetisiert
Probentypus	60mer Oligo	25merOligo
Probenzahl	ca. 30000 validierte Gene/Array	ca. 39000 ESTs und Gene auf HG U133a und b (zwei Arrays)
Quelle der Geninformation	Public Databases / Celera Databases	Public Databases
Detektionsmodus	Chemilumineszens / gekühlte CCD Kamera	Fluoreszens/ Laser Scanner
Min. Input (totaler RNA)	0,5 µg für die RT IVT / 25 µg für RT	1 µg/Array

2 Problemstellung

Diese Arbeit untersucht die Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen und Zellen einer oralen Plattenepithelkarzinomzellreihe (CAL27) auf Transkriptionsebene. Grundlegende Determinanten sind dabei: die Auswahl einer adäquaten Methodik und Durchführung der Genexpressionsanalyse sowie das Management der generierten Datenmenge. So wird durch eine Genexpressionsanalyse versucht, einen möglichst weit reichenden Einblick in die interzelluläre Einflussnahme auf RNA-Ebene zu erlangen. Hierfür werden die Zellen *in vitro* angezüchtet, um anschließend als Kokultur für sieben Tage inkubiert zu werden. Dabei wird eine Kokultur aus Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen und Zellen der Tumorzellreihe CAL27 angelegt. Zusätzliche hergestellte Reinkulturen dienen als Referenzkulturen. So wird ganz grundlegend die Einflussnahme der Endothelzellen auf die Transkription einer Tumorzelle untersucht. Auf die RNA-Extraktion folgt die Genexpressionsuntersuchung mittels „Applied Biosystems(ABI) Human Genome Array“. Die Auswertung der resultierenden Expressionsunterschiede zwischen Rein- und Kokultur bringt Ergebnisse auf allen Stoffwechselebenen hervor, die anhand statistischer Parameter aufgearbeitet werden um so über die Literaturrecherche eine Eingliederung in den Kontext zu ermöglichen. Hierbei wird nach Genen gesucht, die im Verhältnis reinkulturell, also in der Referenzkultur, bzw. kokulturell, in der Endothel-Tumorzellkokultur, unterschiedlich stark transkribiert werden. Die entsprechenden quantitativ signifikant unterschiedlichen RNA-Sequenzen werden entsprechenden Stoffen bzw. Stoffgruppen zugeordnet, woran sich die Eingliederung in den Gesamtkontext anschließt.

3 Material und Methode

3.1 Isolierung von Endothelzellen aus humaner Nabelschnurvene

Vorbereitend ist Promocellmedium, autoklavierbares PBS-Dulbecco und 0,05% Collagenase A im Wasserbad vorzuwärmen. Im kleinen Wasserbad sollte ein Becher mit Wasser vorgewärmt werden. Zwei 60iger Zellkulturschalen sind mit 0,5% Gelatine zu beschichten und für mindestens 20 min bei 37°C zu inkubieren. Ein kleines Becherglas ist mit warmen autoklaviertem PBS Dulbecco- und zwei weitere mittlere Bechergläser sind mit 70%igem Alkohol zu befüllen. Ein zusätzliches großes Becherglas zum Auffangen der Spülflüssigkeiten sollte auf der Sterilbank bereitstehen. Zudem werden mehrere Maxischalen-, zwei bis drei sterile Scherenklemmen-, eine sterile Spülkanüle-, eine sterile Pinzette-, ein steriles Skalpell- sowie zwei Falconröhrchen mit je 5ml kompl. Medium auf der Sterilbank benötigt.

Zur eigentlichen Isolierung der Endothelzellen ist die Nabelschnur aus dem Transportmedium zu entnehmen und in 70%igem Alkohol zu waschen. Nachdem die Nabelschnur abgetropft ist, wird sie zur Präparation in eine Maxischale überführt. Dort wird die Spülkanüle vorsichtig in die Vene eingeführt und durch eine Scherenklemme fixiert. Dabei ist die Vene durch ihre Dünnwandig- und Großlumigkeit von den Arterien mit kleinerem Lumen und dickerer Wand zu unterscheiden. Die Nabelschnur mit fixierter Scherenklemme wird dann über ein großes Becherglas gehängt und solange mit PBS-Dulbecco gespült bis die Spülflüssigkeit klar ist. Eventuell vorhandene PBS-Reste sind mit einer leeren Perfusorspritze wegzublasen. Die somit gereinigte Vene ist an ihrem Ende mit einer Scherenklemme zu verschließen um anschließend über eine Spülkanüle 0,05 %ige Collagenase A in die Vene einfüllen zu können. Die Nabelschnur mit eingebrachter Collagenase A ist im zweiten vorbereiteten Becherglas bei 37°C für 10 min zu inkubieren. Nach erfolgter Inkubation ist die Nabelschnur kurz in 70%igem Alkohol zu desinfizieren und zu massieren. Der Inhalt der Nabelschnur wird durch die Spülkanüle vorsichtig in das erste Falconröhrchen mit Medium tropfen gelassen. Daraufhin wird das Medium des zweiten Falconröhrchens mit Hilfe einer 5ml Spritze über die Spülkanüle in die Nabelschnurvene eingefüllt, kurz massiert und wieder in das Röhrchen zurückgelassen. Beide Falconröhrchen

werden nun bei 1200 U/min und für 7min zentrifugiert. Der Mediumüberstand in den Röhrchen sollte nun ohne das Zellpellet zu beschädigen aus den Röhrchen abgesaugt werden. Das Pellet wird nun mit frischem Medium resuspendiert und in eine vorbereitete Zellkulturschale ausgesiedelt. Die Zellkulturschalen sind durch Absaugen des Gelatineüberschusses- und durch zweimaliges Waschen mit autoklaviertem PBS Dulbeco vorzubereiten. Die Kulturschalen mit eingebrachten Endothelzellen werden bei 37°C unter 5%CO₂ für 24h inkubiert. Je nach Bedarf können die Schalen nach 24h ein- bis zweimal mit autoklaviertem PBS Dulbeco gewaschen und mit frischem Medium versorgt werden.

3.2 Passagieren- u. Aussaat v. Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen

In 60er Kulturschalen (NUNC®) wird, nach zweimaligem Waschen mit PBS, 4ml Trypsin/EDTA 0,25%/0,02% zugegeben und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 4ml Medium zugegeben und das Trypsin inaktiviert. Diesem Ablauf folgt die Zellzahlbestimmung, die Zentrifugierung (1000 U/min), Resuspension (in 1ml Medium) und die Aussiedlung in mit Gelatine vorbereitete-, und zweimal mit PBS gewaschenen Kulturschalen. Bei einer Aussaat von 6000 Zellen/cm³ erhalten wir eine 75 ml konfluente Kulturflasche mit 450000 Zellen/Flasche in einem Zeitraum von ca. drei Wochen.

3.3 CAL27 – experimentelle Tumorzelllinie –

CAL27 Zellen wurden 1982 durch J. Gioanni et al. 1988 (Centre Antoine L. Cedex, France) etabliert. Die Zellen stammen von einer Gewebeentnahme der Zunge bei einem 56jährigen Mann. Bei dieser Zellreihe handelt es sich um epitheliale, polygonale Zellen mit hoch granularem Cytoplasma. Immunhistochemische Studien zeigten eine ausgeprägte Anfärbbarkeit mit Antikeratin-Antikörpern. Die Zellen wachsen in semi-solidem Medium schlecht. Als Medium wird das "Dulbecco's modified Eagle's medium" empfohlen dieses wird mit 4 mM L-Glutamine und durch 1.5 g/L sodium Bicarbonat, 4.5 g/L Glucose, 90%; und 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ergänzt. Das Medium sollte alle zwei bis drei Tage erneuert werden. Die Duplizierungszeit beträgt 35 Stunden. Als Subkultivierungsverhältnis wird ein Mengenquotient von 1:6 empfohlen. Den Vorteil, den die CAL27 Zellreihe gegenüber vergleichbaren Zellreihen bietet liegt in der Medienzusammenstellung. Ähnliche Zellreihen benötigen Hydrocortisonzusätze mit einer Konzentration von ca. 400 ng/ml, und

erfahren damit schon unter rein experimentellen Voraussetzungen eine Art Medikamentierung. (LGC/ATCC Promochem)

3.4 Herstellung einer Kokultur aus CAL27 Tumorzellen und Endothelzellen.

Der Prozess der Zusammenführung beider Zellreihen begann mit der Aussaat von Endothelzellen in vier 60er Platten (NUNC®) in einer Zelldichte von 10000/cm² mit dem Zelllysat beschickt. Die entsprechenden Schalen wurden mit Gelatine beschichtet und mit 103 µl Zellsuspension und 5ml Zellsuspension befüllt (besät). Die Menge der Zellsuspension ergab sich aus der Zelldichte in der Resuspension und der gewünschten Zelldichte in den Kulturschalen.

24 Stunden später wurden die CAL 27 Tumorzellen in einer Zelldichte von 20000 Zellen/cm² in ebenfalls vier 60er Kulturschalen (NUNC®) ausgesät. Die Tumorzellen wurden entsprechend der oben genannten Kriterien in einer 213 µl Zellsuspension den 5 ml Medium zugegeben.

72 Stunden später waren die Platten zu 60% bewachsen und wurden in einer 120er Platte (Maxischale, ebenfalls NUNC®) durch ausreichende Mediumzufuhr in Kontakt gebracht. Ab diesem Zeitpunkt fanden bis zur Zellablösung keine Medienwechsel mehr statt.

3.5 Ablösung der Zellen und RNA Extraktion für die Genchip-Analyse

Nach dem Absaugen des Mediums werden die Schalen zweimal mit PBS gewaschen. Pro Schale wird 500 µl Lysinpuffer zugegeben. Den Tumorzellen werden zusätzlich 500 µl hinzugefügt (in Biopure Tube, da sonst zu dickflüssig). Nun sofort den Zellschaber einsetzen, die Schale schräg halten woraufhin die gelösten Zellen als Schleier sichtbar werden. Die Suspension in eine Eppendorf Tube resuspendieren, die klare Lösung eine Stunde auf Eis stellen und anschließend bei -20°C tiefrieren.

3.6 RNA Isolierung aus Tumorgeweben

Die RNA wurde unter Verwendung der ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation in Kombination mit dem „Tissue RNA Isolation System“ aus frisch gefrorenem Tumormaterial gewonnen. Die Isolation wurde durch die GeneSys Laboratories GmbH (Münster, Deutschland) ausgeführt. In Abhängigkeit der TumorgroÙe werden zwei bis 5 µm Sektionen in „Nucleic Acid Purification Lysis Solution“ gereinigt und anschließend mit 10 Units Proteinkinase K pro ml Lösung in einem Zeitraum von ein bis zwei Stunden bei Zimmertemperatur gelöst. Die Reinigung der RNA vom Lysat wurde entsprechend der Instruktionen des Herstellers durchgeführt.

3.7 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA und RNA

Die RNA Konzentration der Proben wurde durch die spektrophotometrische Messung der OD bei 260 nm, 280 nm und 320 nm und durch folgende Formel ermittelt:

$$cNA = (OD_{260} - OD_{320}) * e \text{ mg/ml} * DF$$

cNA = Konzentration der Nukleinsäuren (mg/ml)

e = Extinktionskoeffizient – für RNA mit 0,04 und für DANN mit 0,05 angegeben

DF = Lösungs-/Verdünnungsfaktor

Die Reinheit wurde in Bezug zu dem Verhältnis OD260/OD280 bewertet und sollte für RNA bei annähernd 2,0 - und für DNA bei 1,7 liegen. Alternativ dazu kann die DNA oder RNA Menge durch einen Vergleich der Fluoreszenz-Intensität der Proben zu einer standardisierten Fluoreszenz-Intensität mit bekannter Konzentration (in einem Ethidiumbromid stained Gel) ermittelt werden.

3.8 „Human Genom Survey Microarrays“

Die Expressionsanalyse wurde ebenfalls durch die GeneSys Laboratories GmbH ausgeführt. Diese verwendeten dabei den Chemiluminescent Microarray Analyzer 1700 mit den dazugehörigen Kits und Reagenzien unter Beachtung der Protokolle des Herstellers.

Es werden 2µg hoch-qualitativer RNA, bei 42°C unter Verwendung des T7-Oligo (dT) Primers und des RT-IVT (reverse transcription and in vitro transcription) Kennzeichnungs-Kits, revers transkribiert. Der zweite Strang wird bei 16°C für zwei Stunden hergestellt und die so entstandene cDNA wird mittels der RT-IVT Reinigungskomponenten aufbereitet. Während der IVT Kennzeichnung (für 9h bei 37°C) wird in die cRNA Digoxigenin-markiertes UTP (Roche Diagnostics) eingefügt. Alle nötigen Inkubationen während der RT- und IVT Reaktionen werden im GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Die cRNA wurde ebenfalls durch die RT-IVT Reinigungskomponenten aufbereitet und die Quantität wurde durch die Absorptionsmessung bei 260 und 320nm bestimmt. 10 µg gekennzeichnete cRNA wurde innerhalb von 30 min bei 60°C im Fragmentierungspuffer gespalten, durch die darauf folgende Zugabe eines Stopppuffers wird die Reaktion beendet. Die Human Genom Survey Microarrays (Applied Biosystems) werden für eine Stunde bei 55°C prehybridisiert. Die gespaltene und gekennzeichnete cRNA wird der Hybridisierungsmixtur zugefügt und schnellstens in die jeweilige Mikroarray-Kassette eingeführt. Während der Hybridisierung (für 16h bei 55°C) werden die Microarrays bei 100 rpm agitiert. Nach der Hybridisierung wird der Microarray der Kassette entnommen und auf dem Reinigungstray des „Rocking Platform Shakers“ (VWR Rocking Platform Shaker, Darmstadt, Deutschland) einem Reinigungspuffer 1 für 5min -, einem Reinigungspuffer 2 für 5min – und einem Chemilumineszenzpuffer zweimal für 5min unterzogen. Ebenso läuft auf dem Rocking Platform Shaker die Bindung der Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase und Fab Fragmente (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) in 20 min ab. Nach drei Waschgängen mit dem chemilumineszenten Spülungspuffer für jeweils 10 min verbleiben die Antikörper auf dem Array. Während der chemilumineszenten Reaktion werden die Microarrays mit für 10 min mit einem Puffer der die Chemilumineszens steigert gewaschen und anschließend mit einer ebenfalls die Chemilumineszens steigernden Lösung für 20 min inkubiert. Nach einer zusätzlichen Spülung mit Chemilumineszens steigerndem Puffer wird das chemilumineszente Substrat auf den Microarray gegeben. Die Chemilumineszens wird mit dem 1700 Chemilumineszens Microarray Analyzer (Applied Biosystems) erfasst. Gefolgt auf primären Analysen und Qualitätskontrollen werden die AB-Navigator Software Version 1.0.0.3 Data Sets für weitere Analysen herangezogen.

3.9 Statistische Auswertung

3.9.1 t-Test-Mittelwertsvergleiche

Der t-Test ist ein statistischer Signifikanztest, der untersucht, ob sich zwei Stichprobenmittel mehr als zufällig voneinander unterscheiden. Dabei kann unterschieden werden zwischen:

- Stichprobenmittelwerten aus unabhängigen Stichproben,
- Stichprobenmittelwerten aus abhängigen Stichproben.

Der t-Test ist sehr robust gegen Verletzungen der Voraussetzungen für parametrische Verfahren. Er kann also auch noch durchgeführt werden, wenn diese Voraussetzungen nicht hundertprozentig erfüllt sind.

t-Test für unabhängige Stichproben: Zwei voneinander unabhängige Stichproben werden aus 2 Grundgesamtheiten gezogen. Das Ergebnis sind zwei Verteilungen mit verschiedenen Mittelwerten. Der t-Test für unabhängige Stichproben überprüft, ob die Stichprobenergebnisse vereinbar sind mit der Nullhypothese, die Differenz der Mittelwerte ist null, die Stichproben stammen aus Grundgesamtheiten mit identischem μ , also $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$, bzw. mit der Alternativhypothese, die Differenz der Mittelwerte ist ungleich null, also $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$. Gilt die Nullhypothese, hat die Verteilung des Kennwertes „Differenz zweier Mittelwerte“ einen Erwartungswert von 0. Die Prüfgröße wird berechnet nach der Formel:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\hat{\sigma}_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}}$$

t-Test für abhängige Stichproben: In diesem Fall sind die Stichproben nicht unabhängig voneinander entstanden. Die Wertepaare haben etwas miteinander zu tun. Sie könnten z.B. an den gleichen Untersuchungseinheiten einmal vor Auftreten eines bestimmten Ereignisses und danach erhoben worden sein. Oder es wurden aufgrund der Fragestellung paarweise Untersuchungseinheiten miteinander verglichen, z.B. Ehepartner. In diesem Fall ist eine Einheit der einen Stichprobe der anderen zugeordnet. Man könnte den Zusammenhang der Paare durch die Berechnung der Korrelation überprüfen. Es muss nun die Beeinflussung der Wertepaare untereinander berücksichtigt werden. Der t-Test für abhängige Stichproben überprüft ob sich die Mittelwertdifferenz der Wertepaare bzw. der Mittelwert der Differenzen signifikant von Null unterscheidet. Die Nullhypothese lautet in

diesem Fall $H_0: \mu_d = 0$, die H_1 ist: $\mu_d \neq 0$. Die Prüfgröße berechnet sich wie folgt: $t =$

$$\frac{\bar{x}_d - \mu_d}{\hat{\sigma}_{\bar{x}_d}}$$

Für ausnahmslos alle Filtercharakteristika galt ein t-Test der kleiner gleich 0,05 sein musste (Hogben C.A. 1964).

3.9.2 F-Test

Mit dem F-Test wird getestet, ob sich Varianzen mehr als zufällig voneinander unterscheiden, oder ob die beiden Stichproben aus Grundgesamtheiten mit gleichen Varianzen stammen. Die Prüfgröße berechnet sich nach der Formel:

$$F = \frac{\hat{\sigma}_1^2}{\hat{\sigma}_2^2} = \frac{\text{größere Varianz}}{\text{kleinere Varianz}}$$

Der F-Test setzt Unabhängigkeit der Stichproben voraus. Für ausnahmslos alle Filtercharakteristika galt ein F-Test der kleiner gleich 0,05 sein musste (David F.N. & Johnson N.L. 1951).

3.9.3 FC – der Fold Change

Der Fold Change ist ein weiteres der verwendeten statistischen Verfahren. Dieser stellt lediglich das Verhältnis zweier Ergebnisse aus zwei unterschiedlichen Datenmengen dar. Der Fold Change ist hier einer quantitativen Angabe des Expressionsunterschiedes gleichzusetzen.

3.10 Auswertung der Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchung

Die analytische Herangehensweise an die Ergebnisse, orientiert sich zunächst an Hot Spots, die durch einen erheblichen Fold Change auffielen. So wurden durch einen Fold Change, der größer 3 oder kleiner 0,33 ist, nur solche Ergebnisse dargestellt, die im Verhältnis zwischen der Rein- und Kokultur mindestens mit einer Differenz um den Faktor 3 mehr oder weniger stark transkribiert wurden. (Tabelle 2.) Diese Ergebnisse (25) vermittelten einen ersten Eindruck und einen Überblick, jedoch ermöglichen sie aufgrund ihrer Diversität oder auch bisher unzureichenden Erforschung der jeweiligen Sequenzen keinen tiefreichenden

Einblick in die Beeinflussung der Transkription der Tumorzellen durch die An- oder Abwesenheit von Endothelzellen. Die Veränderung der Filtercharakteristika ermöglicht eine umfangreiche Darstellung der interzellulären Beeinflussung. Ein Fold Change über 1 stellt eine kokulturell erhöhte Expression dar, ein Fold Change kleiner 1, beschreibt eine reinkulturell erhöhte Transkription. Ein Fold Change von „größer gleich 1,5“ stellt demnach die kokulturell erhöhte Expression dar. Ein Fold Change „kleiner gleich 0,67“ (Ergebnisse größer 0 und kleiner gleich 0,67) führt zur Ergebnismenge mit einer reinkulturell erhöhten Transkription. Die Veränderung der Filtercharakteristika ($FC \geq 1,5$ oder $\leq 0,67$) führt zur Vergrößerung der Ergebnismenge (139 Ergebnisse) sowie zu einer detaillierteren Betrachtungsweise, da bekannt ist, ob die Rein- oder Kokultur die höhere Transkription des jeweiligen Ergebnisses zeigte. (Tabelle 3. und 4.) Diese Ergebnismenge gilt als Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Diese Filtercharakteristika ($FC \geq 1,5$ oder $\leq 0,67$) schließen die Ergebnisse der „Hot Spot“ Suche ($FC \geq 3$ oder $\leq 0,33$) nicht aus. Die 25 „Hot Spots“ sind in der umfassenderen Ergebnismenge enthalten.

Die so gewonnen Daten werden durch Recherche, insofern möglich, in den Gesamtkontext eingegliedert. Die notwendige Literatur wurde hauptsächlich aus dem Internet bezogen. Folgende Internetbibliotheken sind Arbeitsgrundlage:

- “NCBI Entrez” “National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine und National Institutes of Health”
- www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi, incl. PubMed und Unigene
- “Bioinformatic Harvester” (c) 2002-2006, <http://harvester.embl.de>
- GeneCards® Copyright © 1996-2006, Weizmann Institute of Science.
- “UniProt/Swiss-Prot” (entsandten aus einer Kolaboration von: “the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)”, “the Department of Bioinformatics and Structural Biology of the Geneva University”, “the European Bioinformatics Institute (EBI)” und “the Georgetown University Medical Center's Protein Information Resource (PIR)”)
- „KEGG” “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”, www.genome.ad.jp/kegg (Copyright 1995-2006 Kanehisa Laboratories)

4 Ergebnisse

4.1 Einleitung

Im Rahmen der Genexpressionsanalyse wurde die experimentell gewonnene RNA auf 33.000 Gensequenzen überprüft. Woraus nach Durchführung des t-Testes ($\leq 0,05$) 2529 signifikante Ergebnisse hervorgehen. Von dieser Ergebnismenge gelten 1664 Ergebnisse als differentiell exprimierte Gene (Fold Change $\leq 0,67$ oder $\geq 1,5$). Der f-Test ($\leq 0,05$) schränkt die Ergebnismenge auf 139 Ergebnisse ein. Die Problemstellung stellt die Notwendigkeit des Vergleiches zwischen Tumorzellrein- und Tumor-Endothelzellkokultur dar. Die Ergebnisdarstellung gliedert sich zunächst oberflächlich an dem reinen Transkriptionsunterschied, dass heißt, welche RNA Sequenzen in welcher Kultur (Rein- oder Kokultur) und in welchem Ausmaß transkribiert wurden. So werden in Punkt 4.2 solche Stoffe und Stoffgruppen beschrieben, die innerhalb der Tumor-Endothelzellkokultur in Relation zur Reinkultur in stärkerem Ausmaß von den Tumorzellen exprimiert wurden. Punkt 4.3 hingegen stellt die Stoffe und Stoffgruppen dar, die innerhalb der Tumorzellreinkultur eine intensivere RNA-Expression zeigten. Die in der Tumorreinkultur in stärkerem Ausmaß transkribierten Ergebnisse sind wie folgt gegliedert: "Tumor Nekrosis Factors" (TNFs), Interferone, Chemokine, Cytochrome, Interleukine, Serpine, Homeoboxes, Transkription, nukleäre Faktoren, Exo- Endozytose, Zellmotilität, Zellzyklus, Angiogenese, Invasion und Metastasierung. Sequenzen mit tumorendothelzellkokulturell höherer Expression sind nach Signalmolekülen, transkriptioneller Assoziation, Rezeptoren, Zelladhäsion, Zytoskelett, Zellstruktur, Immunität, Onkogenese, molekular und biologisch unklassifizierten Molekülen und Weiteren geordnet. Die Betrachtungsweise der Kulturen, die zu der Bewertung „stärker- oder weniger stark transkribiert“ führte, ist willkürlich. Betrachtet man nicht die Reinkultur in Relation zur Kokultur sondern die Kokultur im Verhältnis zur Reinkultur gilt der Kehrwert aller Ergebnisse. Die Bezeichnung „kokulturell weniger stark exprimiert“ entspricht demnach der Bezeichnung „reinkulturell stärker exprimiert“, beide stellen die gleichen Ergebnisse nur unter anderer Bezeichnung dar. Die Ergebnisse wurden innerhalb des Textes jeweils auf eine Kommastelle gerundet.

4.2 Tumorreinkulturell erhöhte Transkription

4.2.1 TNF-assoziierte Moleküle

Innerhalb der Tumorreinkultur wurden unter anderen einige TNFs („tumor necrosis factors“) stärker exprimiert als kokulturell. Zu diesen TNF-assoziierten Molekülen gehören TNFAIP2 („tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2“) und -3, wobei ersteres einen FC von 0,4 ($1/x=2,9$) und letzteres einen FC von 0,3 ($1/x=2,7$) zeigte. Zudem wurde TNFSF10 („tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3“) mit einem FC von 0,4 ($1/x=2,3$) signifikant differentiell exprimiert. TNFRSF6 („tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6“) zeigte einen Expressionsunterschied um den Faktor 1,7 ($FC=0,6$) und TRAF4 („TNF receptor-associated factor 4“) wurde um das 1,4fache ($FC=0,7$) tumorreinkulturell stärker exprimiert.

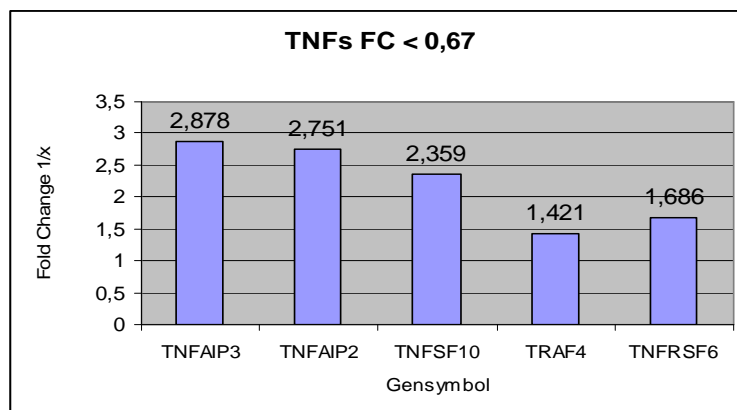


Diagramm 1: TNFs mit $FC < 0,67$

4.2.2 Chemokine

Weitere unterschiedlich exprimierte Moleküle lassen sich der Chemokin-Familie zuordnen. Hierzu gehören CXCL1 („chemokine (C-X-C motif) ligand 1“) und CXCL3 („chemokine (C-X-C motif) ligand 3“), CXCL1 wies einen FC von 0,3 ($1/x=3,5$) und CXCL3 einen FC von 0,3 ($1/x=3,5874$) auf. Außerdem wurde für CCL20 („chemokine (C-C motif) ligand 20“) ein

Expressionsunterschied um das 2,4fache (FC=0,4) angegeben. CKLFSF8 („chemokine-like factor super family 8“) wurde um den Faktor 2 (FC=0,5) reinkulturell verstärkt transkribiert. CX3CL1 („chemokine (C-X3-C motif) ligand 1“), als letztes Molekül dieser Gruppe, hatte einen FC von 0,6 (1/x=1,7).

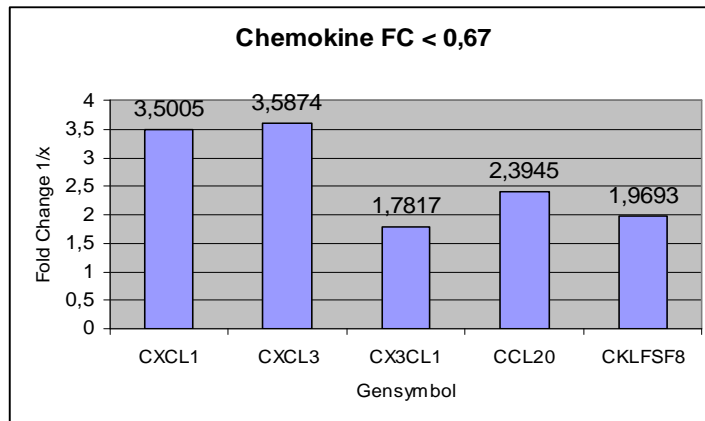


Diagramm 2: Chemokine mit FC < 0,67

4.2.3 Cytochrome und Serpine

Die weitere Auswertung ergab drei signifikant unterschiedlich exprimierte Cytochrome und fünf Serpine. CYC1 („cytochrome c-1“) wurde um den Faktor 1,7 (1/x=0,6) unterschiedlich transkribiert. CYP24A1 („cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1“) wurde reinkulturell 3,8fach stärker transkribiert. CYB561 („cytochrome b-561“) wurde reinkulturell 1,4fach (FC=0,7172) unterschiedlich abgelesen. Aus der Gruppe der Serpine wurden Serpin B3 („serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3“) mit einem FC von 0,1 (1/x=7,1) und Serpin B4 („serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4“) mit einem FC von 0,1 (1/x=6,5) signifikant differenziell exprimiert. Zudem wurden Serpin A3 („serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3“) um das 4,5fache (FC=0,2) und Serpin A5 („serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 5“) um das 3,7fache (FC=0,27) unterschiedlich stark transkribiert. Abschließend ist noch Serpin F2 („serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 2“) zu nennen, dieses wurde reinkulturell um den Faktor 1,5 (FC=0,7) stärker abgelesen.

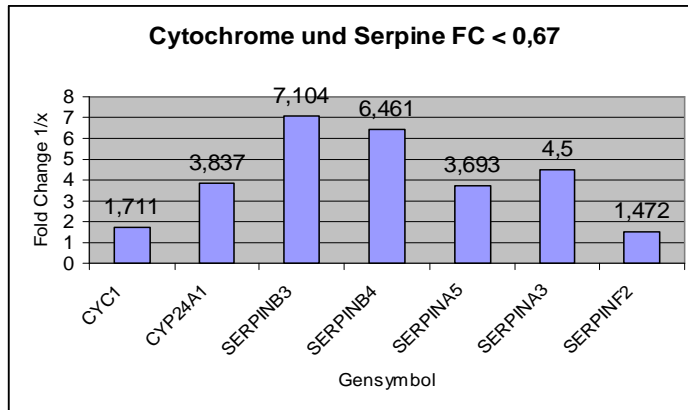


Diagramm 3: Cytochrome und Serpine mit FC < 0,67 (und kleiner)

4.2.4 Interleukine

Aus der Gruppe der Interleukine wurden fünf Moleküle mit einem Fold Change dargestellt, der auf eine reinkulturell erhöhte Transkription hindeutet. So zeigte IL8 („interleukin 8“) einen FC von 0,3 ($1/x=2,9$) und IL6 („interleukin 6“) einen FC von 0,5 ($1/x=1,9$). IL1A („interleukin 1, alpha“) wurde reinkulturell um das 2,3fache erhöht exprimiert (FC=0,4412). IL7R („interleukin 7 receptor“) wies einen Expressionsunterschied von 1,7 (FC=0,6) auf. ILF3 („interleukin enhancer binding factor 3“) wurde um den Faktor 1,1 (FC=0,9) verändert abgelesen.

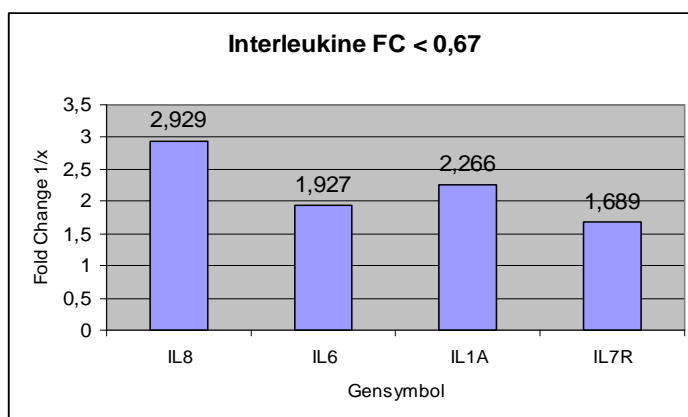


Diagramm 4: Interleukine mit einem FC < 0,67

4.2.5 Interferon-assoziierte Moleküle

Weitere neun Faktoren sind mit Interferon zu assoziieren. Das Ausmaß des Expressionsunterschiedes soll im Folgenden dargestellt werden. IFITM1 („interferon induced transmembrane protein 1“) wurde mit einem FC von 0,2 ($1/x=4,1$) dargestellt. G1P3 („interferon, alpha-inducible protein“) zeigte eine veränderte Transkription um den Faktor 2,8 ($FC=0,3$). ISG20 („interferon stimulated gene 20kDa“) wies einen FC von 0,6 ($1/x=1,7$) auf. GBP2 („guanylate binding protein 2“) wurde reinkulturell um das 2,3fache ($FC=0,4$) verstärkt exprimiert. IFIT1 („interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1“) wurde um das 2 ($FC=0,5$) unterschiedlich abgelesen. IFITM3 („interferon induced transmembrane protein 3“) wurde kokulturell um den Faktor 2,4 ($FC=0,4$) weniger stark exprimiert. IFNAR2 („interferon (alpha, beta and omega) receptor 2“) zeigte einen FC von 0,6 ($1/x=1,5$). IFIT2 („interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2“) wurde um das 1,5fache ($FC=0,6$) unterschiedlich stark abgelesen. G1P2 („interferon, alpha-inducible protein“) wurde mit einem FC von 0,4 ($1/x=2,5$) dargestellt.

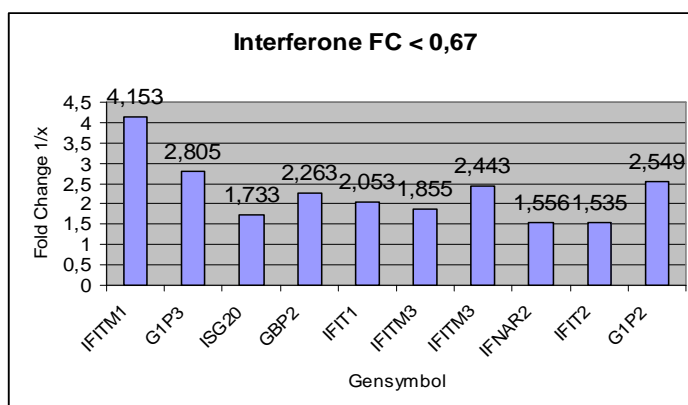


Diagramm 5: Interferon-assoziierte Moleküle mit einem FC < 0,67 und weitere

4.2.6 angiogenetische Faktoren

VCY2IP1 („VCY2 interacting protein 1“) zeigte als potenzieller angiogenetischer Faktor einen FC von 0,2 ($1/x=6$). VHL („von Hippel-Lindau syndrome“) wies einen FC von 0,3 ($1/x=2,7$) auf. FGFR4 („fibroblast growth factor receptor 4“) wurde um das 3,2fache ($FC=0,3$) unterschiedlich stark exprimiert. EFNA5 („ephrin-A5“) wurde reinkulturell um den Faktor 1,8 ($FC=0,6$) stärker exprimiert. ECGF1/SCO2 („endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)/SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2 (yeast)“) zeigte einen FC

von 0,5 ($1/x=1,9$). LYN („v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog“) wurde um das 2,4fache ($FC=0,4$) erhöht dargestellt. ANG („angiogenin“) wies einen Expressionsunterschied von 0,6 ($1/x=1,7$) auf. RNH („ribonuclease/angiogenin inhibitor“) wurde um das 1,4fache ($FC=0,7$) verändert beschrieben. MAP3K5 („mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5“) wurde um den Faktor 1,4 ($FC=0,7$) verändert reguliert. MAP4K4 („mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4“) wurde reinkulturell um den Faktor 1,6 ($FC=0,6$) unterschiedlich abgelesen. HIG2 („hypoxia-inducible protein 2“) zeigte einen FC von 0,8 ($1/x=1,3$). DOC-1R („tumor suppressor deleted in oral cancer-related 1“) hatte einen FC von 0,7 ($1/x=1,3$) und CMG1 („capillary morphogenesis protein 1“) hatte einen FC von 0,8 ($1/x=1,2$).

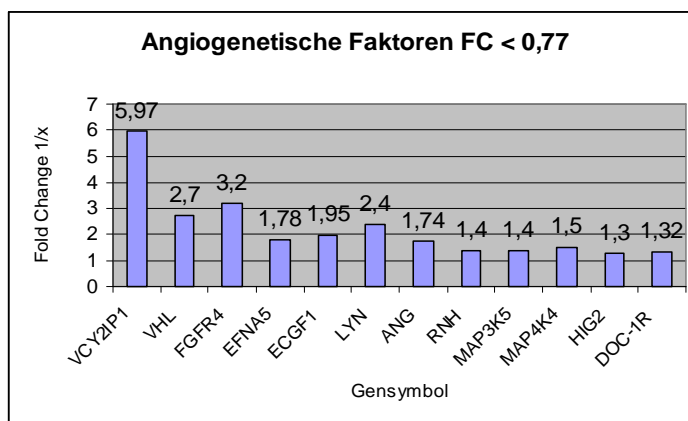


Diagramm 6: angiogenetische Faktoren mit einem FC < 0,67 (und kleiner)

4.2.7 Invasion und Metastasierung

HEI10 („enhancer of invasion 10“) wurde reinkulturell um den Faktor 1,4 ($FC=0,7$) stärker transkribiert. TPT1 („tumor protein, translationally-controlled 1“) zeigte einen FC von 0,6. LENG4 („leukocyte receptor cluster (LRC) member 4“) wurde kokulturell 1,5fach ($FC=0,6$) weniger stark abgelesen. HCCR1 („cervical cancer 1 protooncogene“) wurde um den Faktor 1,7 ($FC=0,6$) unterschiedlich exprimiert.

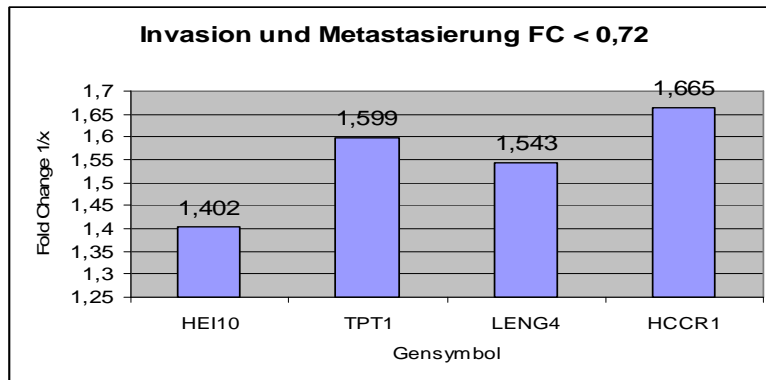


Diagramm 7: Moleküle, die mit Invasion und Metastasierung in Zusammenhang stehen, und bis auf eine Ausnahme dem $FC < 0,67$ entsprechen

4.2.8 Transkriptionelle Faktoren

POLMRT („polymerase (RNA) mitochondrial (DNA directed)“) wurde reinkulturell um den Faktor 1,7 ($FC=0,6$) stärker abgelesen. KLF13 („Kruppel-like factor 13“) zeigte einen Expressionsunterschied um das 2,6fache ($FC=0,4$). POLR2C („polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide C“) wurde um den Faktor 1,4 ($FC=0,7$) verändert dargestellt. POLD4 („polymerase (DNA-directed), delta 4“) wies eine Veränderung um den Faktor 1,5 ($FC=0,7$) auf. HOOK2 („hook2 protein“) zeigte eine Regulation um das 1,6fache ($FC=0,6$). PBXIP („pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1“) zeigte einen FC von 0,7 ($1/x=1,4$). PELP1 („proline and glutamic acid rich nuclear protein“) wurde reinkulturell mit einem FC von 0,7 ($1/x=1,3$) exprimiert. DDIT3 („DNA-damage-inducible transcript 3“) wies kokulturell eine 1,6fach ($FC=0,6$) geringere Expression auf. ZFP64 („zinc finger protein 64 homolog“) hatte einen FC von 0,6 ($1/x=1,6$). GTF3C3 („general transcription factor IIIc, polypeptide 3“) zeigte einen FC von 0,9 und SNAPC1 („small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1“) einen FC von 0,8.

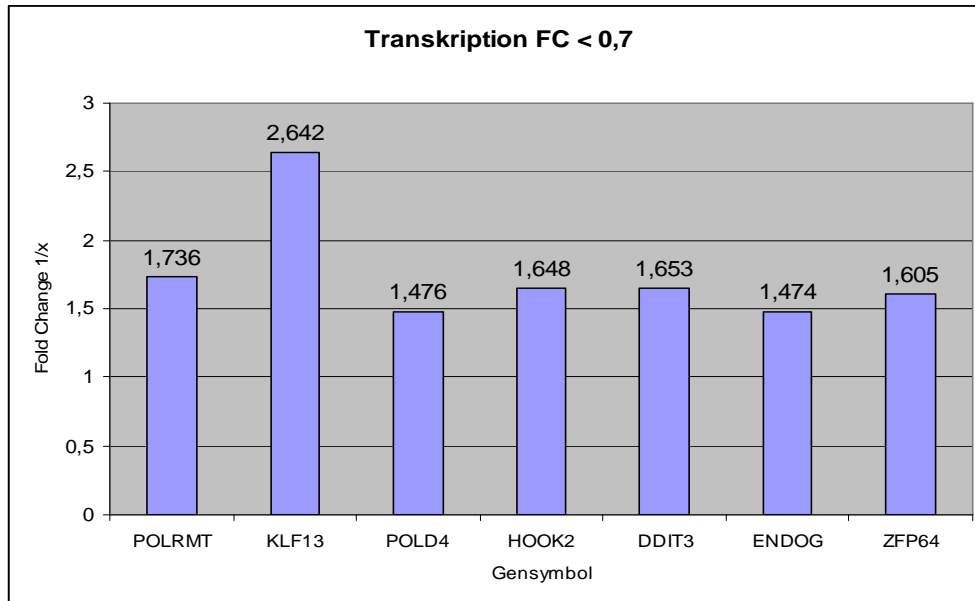


Diagramm 8: mit transkriptionellen Prozessen zu assoziierende Faktoren und kleiner

4.2.9 Homeobox und nukleäre Faktoren

HOXB5 („homeo box B5“) wurde reinkulturell 42,4fach (FC=0,02) stärker exprimiert als kokulturell. NFKBIE („nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon“), ein nukleärer Faktor wurde mit einem FC von 0,6 (1/x=1,6) dargestellt. PLINP1 („papillomavirus L2 interacting nuclear protein 1“) wies einen 1,5fachen (FC=0,6) Expressionsunterschied auf. NME1/NME2 („non-metastatic cells 1/non-metastatic cells 2“) wurde um den Faktor 1,5 (FC=0,6) verändert dargestellt.

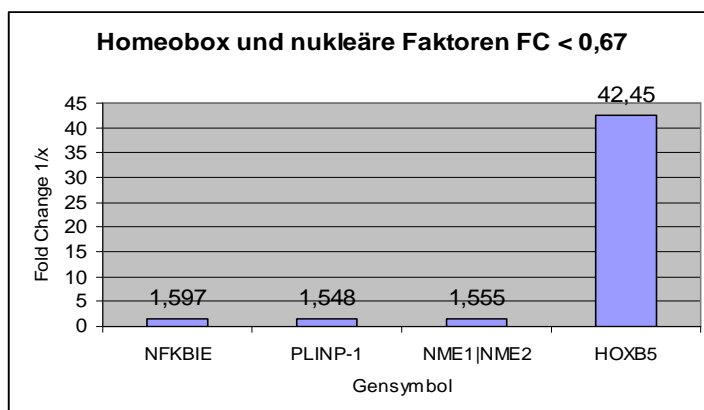


Diagramm 9: Homeobox und nukleäre Faktoren mit FC < 0,67

4.2.10 Endo- und Exocytose

VTI1B („vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B“) zeigte einen FC von 0,6 ($1/x=1,7$). LAMP3 („lysosomal-associated membrane protein 3“) wies einen Expressionsunterschied um den Faktor 2,5 ($FC=0,4$) auf. PHT2 („peptide transporter 3“) wurde reinkulturell um das 2,1fache ($FC=0,5$) stärker exprimiert. GOLGA1 („golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1“) wurde um das 2,2fache ($FC=0,4$) verändert reguliert. SEC23A („Sec23 homolog A“) wies einen FC von 0,5 ($1/x=2$) auf. CLPP („“) wurde um das 1,5fache ($FC=0,7$) verändert dargestellt.

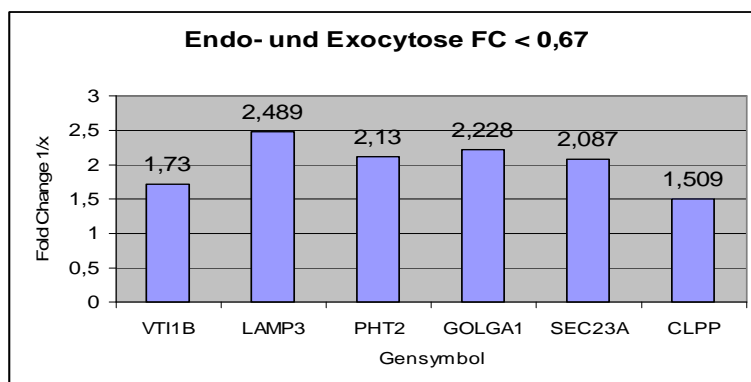


Diagramm 10: Endo- und Exocytose mit einem FC < 0,67

4.3 Tumor-Endothelzellkulturell erhöhte Transkription

4.3.1 Transkriptionsassoziierte Faktoren

Die Expressionsanalyse hob 11 Faktoren hervor, die aufgrund ihrer Funktionen innerhalb des Stoffwechsels der Transkription zuzuordnen sind. So zeigte „engrailed homolog 1“ (EN1) einen FC von 16,8. Alle weiteren Faktoren dieser Gruppe unterlagen geringeren Expressionsunterschieden. So hat C21orf66 („chromosome 21 open reading frame 66“) einen FC von 7,2, FLJ13590 einen FC von 3,3 und GFI1 („growth factor independent 1“) einen FC von 3,3. Der „nuclear factor I/X“ (NFIX) wurde mit einem FC von 2,5 exprimiert. CDX4 („caudal type homeobox transcription factor 4“) wurde um den Faktor 2,3 verändert

transkribiert, während MSL3L1 („male specific lethal 3-like 1“) einen FC von 2,1 hatte und ID3 („inhibitor of DANN binding 3“) einen FC von 1,7 hervorbrachte. HOXC13 („homeobox C 13“) wurde innerhalb beider Kulturen um das 1,5fache-, TIEG („TGFB inducible early growth response“) um das 1,5fache- und TAF9L („TAF9-like RNA polymerase II“) um das 1,5fache unterschiedlich abgelesen.

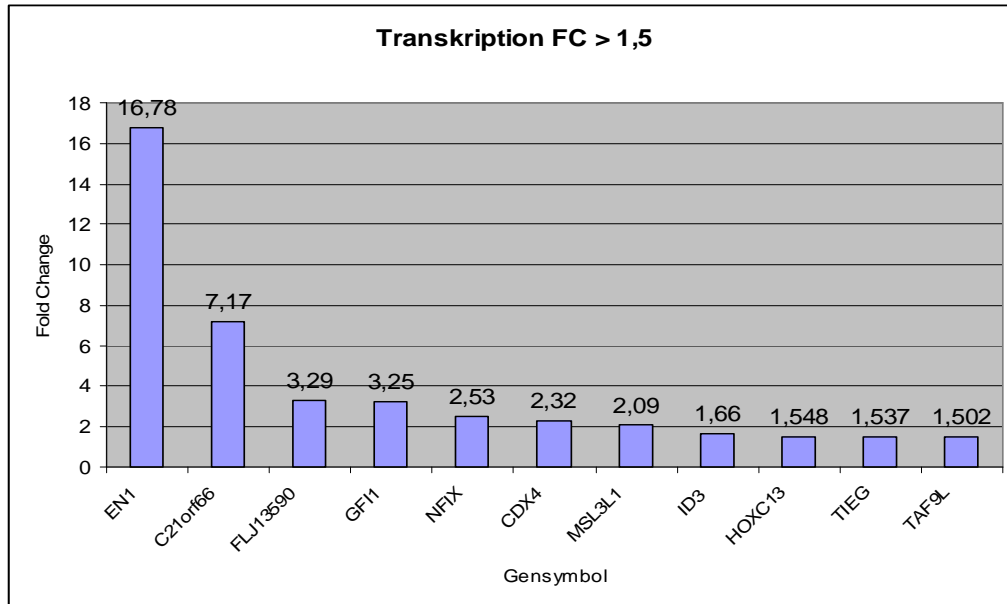


Diagramm 11: kokulturell erhöht exprimierte transkriptionsassoziierte Faktoren

4.3.2 Signalmoleküle

Aus der Gruppe der Signalmoleküle wurden 4 Faktoren signifikant unterschiedlich exprimiert. Hierbei zeigte DKK1 („dickkopf homolog 1“) den größten Fold Change von 2,2 innerhalb dieser Gruppe. INHBB („inhibin beta B“) wurde um den Faktor 1,7- und BDNF („brain-derived neurotrophic factor“) um einen FC von 1,6 verändert exprimiert. Den geringsten Expressionsunterschied innerhalb dieser Gruppe zeigte CXCL11 („chemokine (CXC-motif)ligand 11“) mit einem Expressionsdifferenz von 1,6.

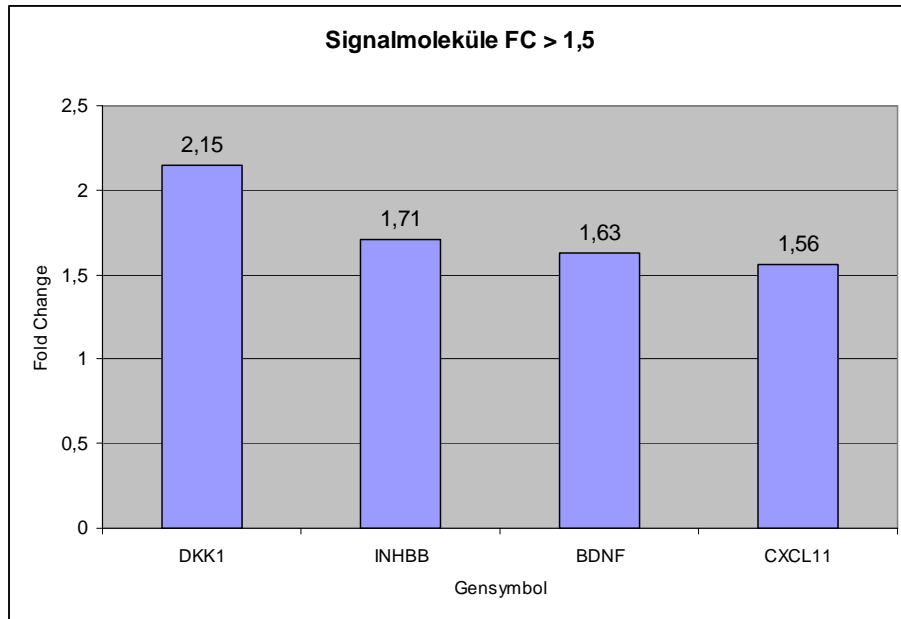


Diagramm 12: kokulturell erhöht exprimierte Signalmoleküle

4.3.3 Rezeptoren

Es waren ebenfalls 11 Rezeptoren, die signifikant kokulturell verstärkt exprimiert wurden. Den deutlichsten Expressionsunterschied lieferte GPR66 („G protein-coupled receptor 66“) mit einem FC von 6,8. Alle weiteren Rezeptoren dieser Gruppe zeigten einen Expressionsunterschied mit einem Faktor, der kleiner als 2 war. RCN3 („reticulocalbin 3“) wies einen FC von 1,9 auf, FLJ30634 („hypothetical protein FLJ30634“) wurde um das 1,8fache und ESDN („endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin“) um das 1,8fache exprimiert. PLAUR („plasminogen activator, urokinase receptor“) lag um das 1,8fache verändert vor. KIR3DL1 („killer cell immunoglobulin like receptor“) wurde um den Faktor 1,8 verändert abgelesen. PTGIR („prostaglandin I2 receptor“) wurde mit einem FC von 1,8 dargestellt. RPS6KL1 („ribosomal protein S6 kinase like 1“) zeigte einen FC von 1,7. MRGX3 („G-protein-coupled receptor MRGX3“) wurde um mit einem FC von 1,7, HRH3 („histamine receptor 3“) mit einem FC von 1,5 und KLRC4 („killer cell lectin like receptor subfamily c“) mit einem FC 1,5 zwischen beiden Kulturen unterschiedlich exprimiert.

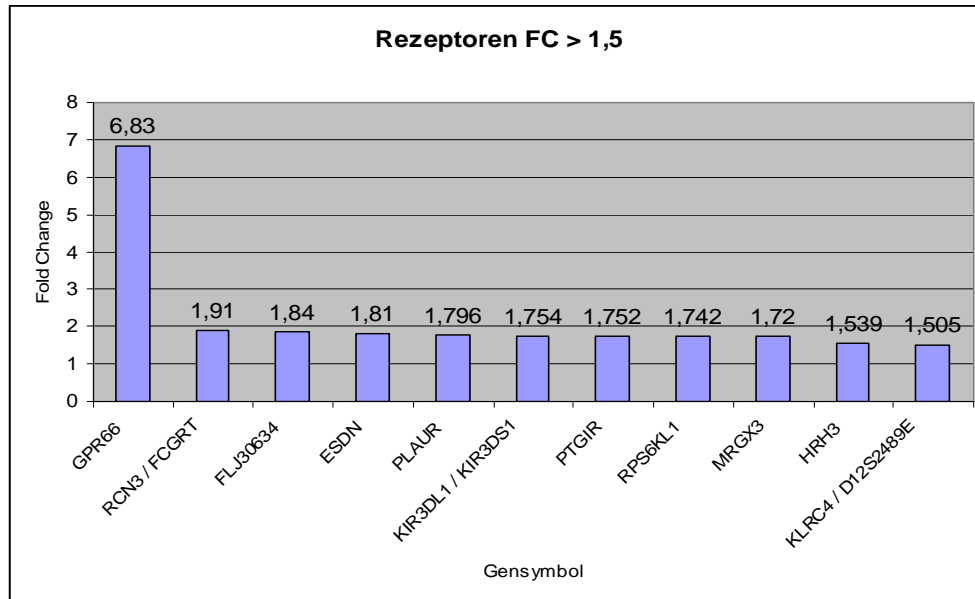


Diagramm 13: kokulturell erhöht exprimierte Rezeptoren

4.3.4 Onkogenet. Faktoren, biolog. oder funktionell unklassifizierte Moleküle

MAGEA4 („melanoma antigen, family A5“) wurde um den Faktor 2,2 verändert abgelesen. TM4SF1 („transmembran 4 superfamily member 1“) wies einen FC von 1,5 auf. ELYS („ELYS transcription factor like protein TMBS62“) wurde 2,3fach, ARHGAP18 („Rho GTPase activating protein 18“) 2fach, PKD1L1 („polycystic disease 1 like 1“) 1,6fach und DLEU2 („deleted in lymphocytic leukaemia 2“) um das 1,5fache dargestellt. CYP1A1 („cytochrom P450 family 1 subfamily A“) wurde mit einem FC von 6,2 transkribiert. CACNG6 („calcium channel voltage dependent gamma subunit 6“) zeigte einen Expressionsunterschied von 3,7. PARG1 („PTLP1 associated RhoGAP1“) differierte hinsichtlich des Expressionsausmaß um das 3,6fache. SH3GLB2 („SH3-domain GRB3-like endophilin B2“) wurde um den Faktor 3,5 unterschiedlich abgelesen. NFAM1 („NFAT activation molecule 1“) wurde um das 3,4fache verändert abgelesen. DUSP 10 („dual specificity phosphatase 10“) wurde mit einem FC von 2,8 dargestellt. COL19A1 („collagen type XIX alpha 1“) zeigte einen FC von 2,7. TAO1/PSK („thousand and one amino acid protein kinase“/ „prostate derived STE20-like kinase PSK“) wies einen FC von 2,7 auf. Alle weiteren Faktoren zeigten einen Expressionsunterschied zwischen beiden Kulturen um einen Faktor der kleiner als 1,8 ist. So zeigte PKP2 („plakophilin2“) einen FC von 1,8, GJB3 („gap junction protein beta3“) eine FC von 1,8, HUMPPA („paraneoplastic antigen“) einen FC von 1,7 und DEFA3 („defensin alpha 3 neutrophil specific“) einen FC von 1,7. Des Weiteren wurde CCND2 („cyclinD2“) um den Faktor 1,6-, HSPA1A („heat shock protein 1A 70kD“) um

den Faktor 1,5- und SSBP1 („single stranded DANN binding protein“) um den Faktor 1,5 erhöht reguliert. GEMINA5 („gem8nuclear organelle) associated protein 5“) wurde um das 1,5fache erhöht exprimiert. MI-ER1 („mesoderm induction early response 1“) zeigte einen Expressionsunterschied von 1,6.

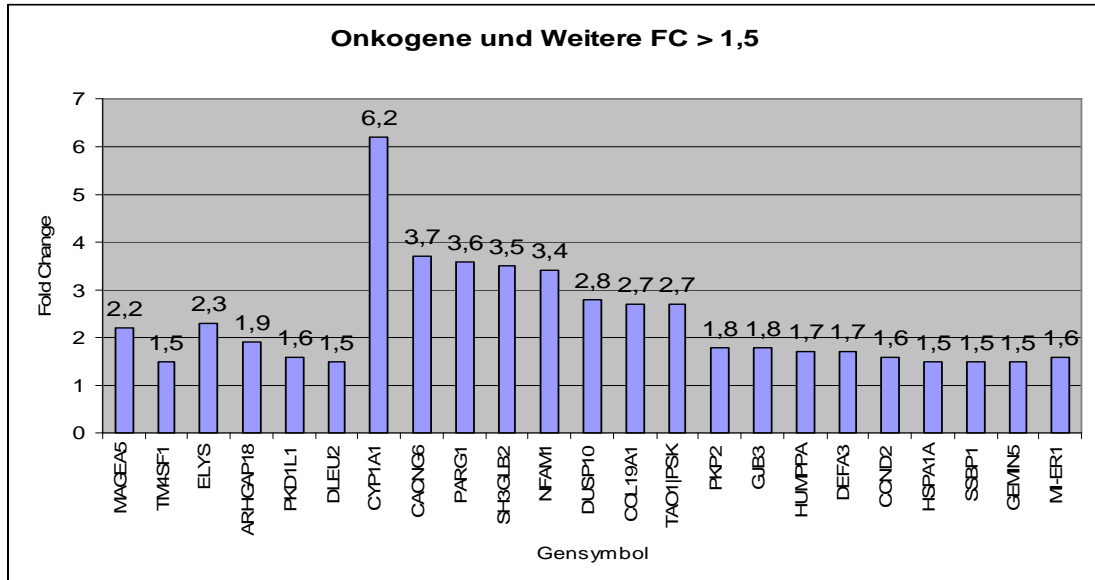


Diagramm 14: kokulturell erhöht exprimierte onkogenetische Faktoren, und Moleküle, die biolog. und funktionell unklassifiziert sind

4.3.5 Zelladhäsion, Zellstruktur und Zytoskelett

Den folgenden Molekülen wird eine Assoziation zur Zelladhäsion, Zellstruktur oder zum Zytoskelet zugesprochen. So wird PCDHA („protocadherin alpha“) kokulturell um das 1,9fache verstärkt abgelesen. GP9 („glycoprotein 9“) wurde um den Faktor 1,6 verändert dargestellt. MYBPC3 („myosin binding protein C“) wurde mit einem FC von 5,8 transkribiert. KRT6IRS („keratin 6irs“) wurde interkulturell 3,2fach unterschiedlich stark exprimiert. KRT13 („keratin 15“) gehört zu den vier weiteren signifikant verschieden stark abgelesenen Keratinen. Des Weiteren sind mit dem jeweiligen Fold Change zu nennen: KRTHA3B („keratin hair acidic 3B“) mit einem FC von 1,9, KRT15 („keratin 15“) mit einem FC von 1,8 und KRTHA1 („keratin hair acidic 1“) mit einem FC von 1,6.

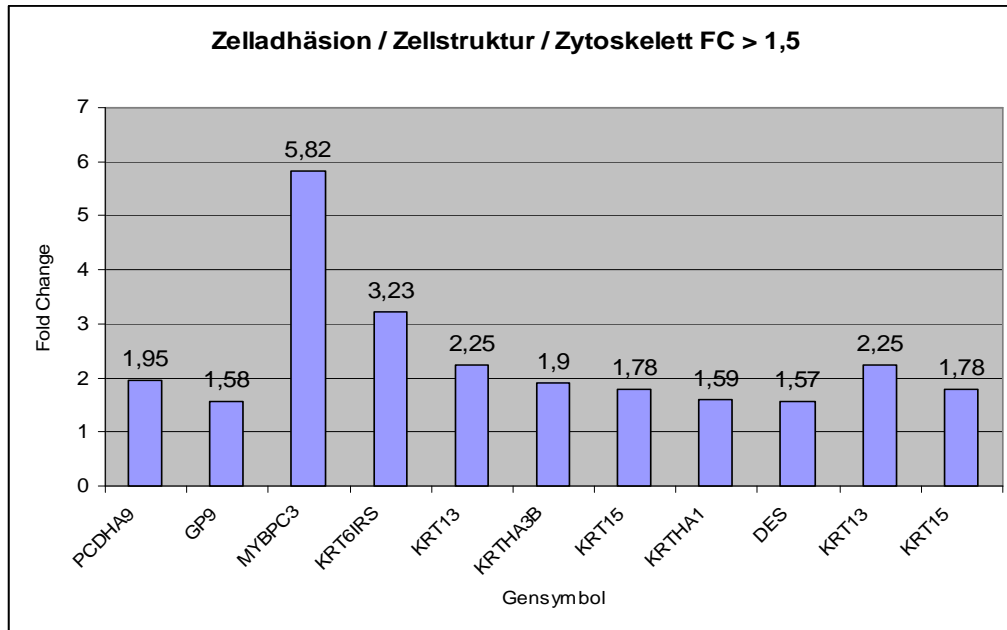


Diagramm 15: kokulturell erhöht exprimierte Faktoren der Zelladhäsion, Zellstruktur und des Zytoskelettes

4.3.6 Immunität

Der Filter der Datenauswahl ergab drei zusätzlich dem Immunsystem zuzuordnende Moleküle. RCN3/FCGRT ist ebenso ein Rezeptor und im entsprechenden Abschnitt aufgeführt, gleiches gilt für KIR3DL1. KLRC4 („killer cell lectin-like receptor subfamily C“) wurde zwischen beiden Kulturen um den Faktor 1,5 unterschiedlich stark exprimiert.

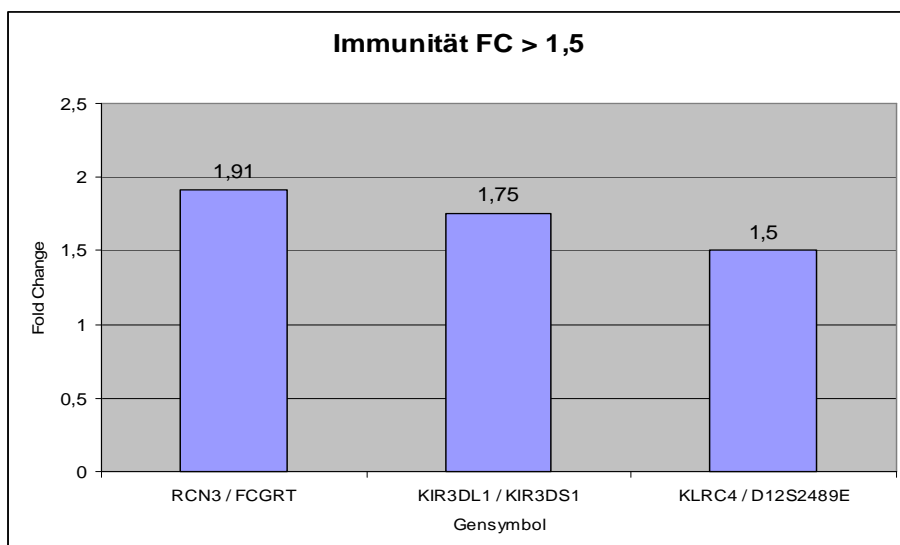


Diagramm 16: kokulturell erhöht exprimierte Faktoren der Immunität

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Datenmanagement erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Zunächst wurde durch relativ grobe Filtercharakteristika ($FC \geq 3$ oder $\leq 0,33$) eine „Hot Spot“ Suche durchgeführt. (Tabelle 2.) Aufbauend auf dem so erlangten Überblick ergab die feinere Filtereinstellung mit einem FC von $\geq 1,5$ oder $\leq 0,67$ die endgültige Ergebnismenge. (Tabelle 3. und 4.)

Gensymbol	Gen-ID	Fold Change
MGC10200	hCG23691.4	4,98
COL23A1	hCG20098.3	3,99
KRT6IRS	hCG2039810	3,23
GFI1	hCG1811334.1	3,25
SLC39A2	hCG41212.2	3,92
CYP1A1	hCG40803.4	6,23
MAWBP	hCG32856.3	3,31
MBNL3	hCG14618.3	13,36
MT3	hCG23904.3	15,79
MYBPC3	hCG1811554.1	5,82
CACNG6	hCG1648888.2	3,75
SIAT7E	hCG1812855.1	4,26
EN1	hCG18272.2	16,78
FLJ90583	hCG42522.2	3,58
NFAM1	hCG1735761.2	3,39
SERPIN2	hCG33721.2	3,77
EPB41L4B FLJ21596	hCG1738334.2	79,58
KCNK12	hCG1640181.3	3,19
GPR66	hCG33978.3	6,83
SCN4A	hCG41815.2	4,43
FLJ12650	hCG1646448.2	7,11
PARG1	hCG32035.3	3,58
FLJ13590	hCG1811687.1	3,29
C21orf66	hCG1789935.2	7,17
SH3GLB2	hCG30604.3	3,46

Tabelle 4: Darstellung der Ergebnisse resultierend aus einem $FC > 3$ oder $< 0,33$

FC ≤ 0,67

Gen-symbol	Gen-ID	FC
TNF		
TNFAIP3	hCG16787.3	0,34
TNFAIP2	hCG22889.3	0,36
TNFSF10	hCG20249.3	0,42
TRAF4	hCG28281.3	0,70
TNFRSF6	hCG22983.3	0,59
Interferone		
IFITM1	hCG1741134.1	0,24
G1P3	hCG1727099.1	0,35
ISG20	hCG1775709.2	0,57
GBP2	hCG1811329.1	0,44
IFIT1	hCG24571.3	0,48
IFITM3	hCG2036716	0,53
IFITM3	hCG2036716	0,40
IFNAR2	hCG2008554.1	0,64
IFIT2	NM_001547.2	0,65
Chemokine		
CXCL1	hCG16368.2	0,28
CXCL3	hCG16366.3	0,27
CX3CL1	hCG15105.2	0,56
CCL20	hCG14841.3	0,41
CKLFSF8	hCG20238.2	0,5
Cytochrome		
CYC1	hCG19558.3	0,58
CYP24A1	hCG37130.3	0,26
CYB561	hCG41832.3	0,71
Interleukine		
IL8	hCG16372.3	0,34
IL6	hCG38231.4	0,51
IL1A	hCG16260.3	0,44
IL7R	hCG37576.2	0,59

FC ≤ 0,67
(Fortsetzung)

Gen-symbol	Gen-ID	FC
Transkription		
POLRMT	hCG20561.2	0,57
KLF13	hCG38887.2	0,37
POLR2C	hCG2025883	0,7
POLD4	hCG1639765.4	0,67
HOOK2	hCG172483.3	0,6
DDIT3	hCG39661.3	0,604
ZFP64	hCG2018581	0,62
Nukleäre Faktoren		
NRBF-2	hCG2024541	0,67
NFKBIE	hCG18999.4	0,62
PLINP-1	hCG172501.2	0,64
NME1 N ME2	hCG2001850	0,64
Exo- und Endocytose		
VTI1B	hCG2028697	0,57
LAMP3	hCG16067.2	0,401
PHT2	hCG40399.2	0,46
GOLGA1	hCG27386.3	0,44
SEC23A	hCG21237.2	0,47
CLPP	hCG23047.4	0,66
GOLGA3	hCG18960.3	0,78
SCAP2	hCG38391.3	0,73
SNARK	hCG14992.2	0,69
Zellmotilität		
MRLC2 M RCL3	hCG1995219	0,72
Zellzyklus		
CCNI	hCG24408.3	0,69
Homeoboxes		
HOXB5	hCG29354.2	0,02
HOXA5	hCG1640626.3	0,75

FC ≤ 0,67 (Fortsetzung)			FC ≥ 1,5		
Gen-symbol	Gen-ID	FC	Gen-symbol	Gen-ID	FC
Angiogenese			Signalmoleküle		
VCY2IP1	hCG1778172.1	0,16	DKK1	hCG27267.2	2,15
VHL	hCG1994953	0,37	INHBB	hCG17320.2	1,71
FGFR4	hCG1821375.1	0,31	BDNF	hCG26491.2	1,63
EFNA5	hCG1736717.3	0,56	CXCL11	hCG23841.2	1,56
ECGF1	hCG1988078.1	0,51	DKK1	hCG27267.2	2,15
LYN	hCG1810958.2	0,41	Transkription		
ANG	hCG40476.3	0,57	EN1	hCG18272.2	16,78
RNH	hCG18617.3	0,7	C21orf66	hCG1789935.2	7,17
MAP3K5	hCG33356.3	0,71	FLJ1359		
MAP4K4	hCG1640439.3	0,65	0	hCG1811687.1	3,29
HIG2	hCG33002.3	0,76	GFI1	hCG1811334.1	3,25
DOC-1R	hCG21052.2	0,75	NFIX	hCG27760.2	2,53
Invasion und Metastasierung			CDX4	hCG17580.3	2,32
HEI10	hCG40484.3	0,71	MSL3L1	hCG401190.3	2,09
TPT1	hCG32792.2	0,62	ID3	hCG1982882	1,66
LENG4	hCG20951.3	0,64	HOXC13	hCG23347.2	1,54
HCCR1	hCG36904.4	0,6	TIEG	hCG15009.2	1,53
Serpine			TAF9L	hCG20033.3	1,502
SERPIN	hCG34089.3	0,14	Rezeptoren		
B3			GPR66	hCG33978.3	6,83
SERPIN	hCG1775797.3	0,15	RCN3	hCG1998059	1,91
B4			FLJ3063		
SERPIN	hCG2029091.1	0,27	4	hCG1811515.2	1,84
A5			ESDN	hCG20139.2	1,81
SERPIN	hCG2039549.1	0,22	PLAUR	hCG39344.3	1,79
A3			KIR3DL1	hCG2039725	1,75
SERPIN	hCG28718.3	0,67	PTGIR	hCG177582.2	1,75
F2			RPS6KL1	hCG22357.3	1,74
			MRGX3	hCG15537.2	1,72
			HRH3	hCG41769.3	1,53
			KLRC4	hCG2009644	1,5
			Zelladhäsion		
			PCDHA	hCG1982192	1,95
			GP9	hCG18658.2	1,58
			FLJ3063		
			4	hCG1811515.2	1,84

Tabelle 5:

Darstellung der Ergebnisse mit einem Fold Change $\leq 0,67$ mit Gliederung nach dem Stoff, der Stoffgruppe oder dem Stoffwechselprozess, dem das jeweilige Ergebnis zuzuordnen ist

FC $\geq 1,5$ (Fortsetzung)		
Gen-symbol	Gen-ID	FC
Immunität		
RCN3	hCG1998059	1,91
KIR3DL1	hCG2039725	1,75
KLRC4	hCG2009644	1,5
Onkogenese		
MAGEA5	hCG1757057.1	2,22
TM4SF1	hCG21217.3	1,51
biologische und molekulare Funktion unklassifiziert		
ELYS	hCG1642121.3	2,26
ARHGAP 18	hCG1816281.1	1,97
PKD1L1	hCG1646254.2	1,64
DLEU2	hCG27742.2	1,5
Weitere		
CYP1A1	hCG40803.4	6,23
CACNG6	hCG1648888.2	3,75
PARG1	hCG32035.3	3,58
SH3GLB2	hCG30604.3	3,46
NFAM1	hCG1735761.2	3,39
DUSP10	hCG25031.3	2,79
COL19A1	hCG15057.2	2,75
TAO1	hCG18349.3	2,74
PKP2	hCG1685949.3	1,82
GJB3	hCG1783754.2	1,77
HUMPPA	hCG29840.2	1,75
DEFA3	NM_005217.2	1,68
CCND2	hCG24964.2	1,59
HSPA1A	hCG1820593.2	1,53
SSBP1	hCG2014251	1,52
GEMIN5	hCG1979691	1,51
MI-ER1	hCG1811270.2	1,65

FC $\geq 1,5$ (Fortsetzung)		
Gen-symbol	Gen-ID	FC
Zytoskelett		
MYBPC3	hCG1811554.1	5,82
KRT6IRS	hCG2039810	3,23
KRT13	hCG1730613.2	2,25
KRTHA3B	hCG1640375.3	1,901
KRT15	hCG1730612.3	1,78
KRTHA1	hCG41569.2	1,59
DES	hCG14764.2	1,57
Zellstruktur		
KRT13	hCG1730613.2	2,25
KRT15	hCG1730612.3	1,78

Tabelle 6:

Darstellung der Ergebnisse mit einem Fold Change $\geq 1,5$ mit Gliederung nach dem Stoff, der Stoffgruppe oder dem Stoffwechselprozess, dem das jeweilige Ergebnis zuzuordnen ist

5 Diskussion

Im Folgenden werden unter Punkt 5.3 solche Ergebnisse dargestellt die tumorreinkulturell stärker transkribiert wurden und weiterhin durch die aufgeführten Referenzen einen Zusammenhang zu dem durchgeführten in vitro Modell zeigen. Punkt 5.4 hat die gleiche Zielstellung für die tumorendothelzellkokulturell stärker exprimierten Ergebnisse.

5.1 Reinkulturell erhöhte Expression

5.1.1 Mitglieder der Chemokin-Familie

Einleitung

Chemokine sind eine Gruppe von kleinen (Molekulargewicht zwischen 8 und 14kDa), meist basischen, positiv geladenen und strukturell ähnlichen Molekülen, die durch ihre jeweiligen Interaktionen mit 7 transmembranösen, G-protein gekoppelten Rezeptoren den Zellstoffwechsel regulieren oder beeinflussen. Des Weiteren zeigen sie fundamentale Beteiligung an Prozessen der Entwicklung, - der Haemostase und der Funktion des Immunsystems; nicht zuletzt sind sie durch ihre Einflüsse auf Endothelzellen an angiogenetischen- oder angiostatischen Abläufen beteiligt. Zudem werden Effekte auf Zellen des zentralen Nervensystems beschrieben. Die Molekülgruppe der Chemokine wird aufgrund ihres strukturellen Arrangements in vier verschiedene Untergruppen untergliedert. Hierfür sind die ersten beiden von insgesamt vier Cysteinanteilen die Grundlage. Werden die ersten beiden Cysteine durch eine einzelne Aminosäure getrennt spricht man von den CXC-Chemokinen, liegen jedoch diese Cysteine direkt benachbart, werden sie als CC-Chemokine bezeichnet. Stehen mehrere Aminosäuren zwischen den Cysteinanteilen spricht man von CX3C-Chemokinen. Außerdem werden C-Chemokine beschrieben (Zlotnik et al. 1997). Anhand einer Glu-Leu-Arg Sequenz im NH²-Terminus des CXC-Motivs wird die CXC-Gruppe entsprechend des Vorhandenseins- oder Fehlens zusätzlich in einen ELR- und non-ELR Subtyp unterteilt. Nach Belperio et al., sind solche CXC-Chemokine, die das ELR-Motiv

enthalten, potente Vermittler der Angiogenese (Bar-Eli M. 1999; Belperio et al. 2000), gegensätzlich dazu werden ELR-negative, und durch Interferon induzierbare CXC-Chemokine als Inhibitoren der Angiogenese dargestellt (Belperio et al. 2000).

Die chemotaktischen Cytokine regulieren durch ihre Bindung an die G-Protein gekoppelten Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von Leukozyten entsprechende Immunantworten. Gegenwärtig sind ungefähr 50 verschiedene humane Chemokine- sowie annähernd 20 humane Chemokinrezeptoren bekannt (Zlotnik et al. 1997). Chemokine werden sekretiert und liegen immobilisiert auf der Zelloberfläche vor, um von dort aus einen gerichteten chemotaktischen Gradienten zum Entzündungsgeschehen hin für Neutrophile zu bieten. Die Bindung und Aktivierung führt zu einer gesteigerten Integrin Haftfähigkeit, was letztendlich in einer Migration der Zellen entlang des Chemokingradienten resultiert (Campbell et al. 1998). Neben diesen primären Funktionen, sind die Chemokine an der Angiogenese und Angiostasis, der Haematopoese und der lymphatischen Organogenese beteiligt. Außerdem deutet die Anwesenheit von Chemokinrezeptoren auf verschiedenen Zellen, wie Keratinozyten und Endothelzellen, darauf hin, dass Chemokine einen Teil zur Regulation von Epithelialisierung, Gewebsumbau und Neovaskularisierung beitragen. Chemokine gelten zudem als entscheidende Parameter für reparative Prozesse wie die Wundheilung der humanen Haut (Gillitzer et al. 2001). ELR-positive CXC Chemokine wie IL-8 und CXCL1 rekrutieren Neutrophile durch ihre Bindung und Aktivierung an die beiden Chemokinrezeptoren, CXCR1 und CXCR2, der Chemokine. CXCR1 bindet dabei spezifisch und ausschließlich, mit nanomolarer Affinität an IL-8. Die Bindungsaktivität von CXCR2 hingegen ist verworrener, CXCR2 bindet mit hoher Affinität alle ELR-CXC Chemokine. Die Rezeptorsignalisierung setzt sich aus zwei Ereignissen zusammen: Als erstes sind die Interaktionen zwischen dem N-terminalen Loop (N-Loop) des Liganden und den N-terminalen Domänenanteilen (N-Domäne) des Rezeptors zu nennen, die sich an der als Seite I bezeichneten Lokalisation abspielen. An der Seite II findet die zweite Interaktion statt, hierbei zwischen dem N-terminalen ELR des Liganden und der juxtamembranen Domäne des Rezeptors. Inwiefern die beiden Seiten die Bindungsaffinität oder Selektivität beeinflussen ist genauso wenig geklärt wie die Frage ob die Bindung einer Seite, die Bindungseigenschaften und Funktion der anderen Seite beeinträchtigt. Wobei die N-Domäne des Rezeptors entscheidend für die Ligandenselektivität sein soll. Rajagopalan et al. schlussfolgert aus seinen Untersuchungen, dass die Interaktionen an der Seite I eine gleichartige Affinität mit sich bringt und das die diversen Bindungsabläufe zwischen der Seite I und II für die beobachteten Unterschiede in der Affinität verantwortlich sind (Rajagopalan L. et al. 2004).

CXCL1/GRO1

Die CXC-Subfamilie der Chemokine ist entscheidend an unterschiedlichsten Abläufen, wie zum Beispiel der Entzündung und der Wundheilung, der Wachstumsregulation und der Angio- und Tumorgenese, beteiligt. Das ELR-CXC-Chemokin, CXCL-1 oder GROalpha/MGSA wurde schon ursprünglich mit einer anziehenden Wirkung auf Neutrophile zu den Entzündungsstellen hin charakterisiert, es ist aus 107 Aminosäuren aufgebaut und hat ein Molekulargewicht von 11301 Da. Die maximale Bindungskapazität des CXCL1 an den CXC-Rezeptor (CXCR) 2 auf HEK293 und CHO-K1 Zellen ist von der Anwesenheit von Heparan-Sulfat-Proteoglykanen (HSPGs) abhängig. Die HSPGs werden für die durch CXCL1 induzierte PAK1 Aktivierung nötig. CXCL10 kann die PAK1- und ERK Aktivierung genauso wie die CXCL1 induzierte Chemotaxis inhibieren (Wang et al. 2003). Für die Initiierung der Chemotaxis durch CXCL1 ist die Aktivierung der cdc42-PAK1 Kaskade erforderlich. Dabei besteht diese Abhängigkeit nicht für die CXCL-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung. Darüber hinaus verläuft die PAK1 Aktivierung durch CXCL1 unabhängig von der ERK1/2 Aktivierung (Wang et al. 2002). GRO1/CXCL1 ist ein autokriner Wachstumsfaktor der u.a. in Melanomen exprimiert wird. Bei der Überprüfung der GRO-1 Expression in 9 oralen „squamous cell carcinoma“ (OSCC) Zelllinien und 94 oscc-Proben zeigte, dass die Expression in den OSCC-Zelllinien variiert, dabei wiesen annähernd 40 % der OSCC Proben eine Korrelation zwischen der GRO1 Expression und der Tumorangiogenese auf, auch die Leukozyteninfiltration und die Lymphknotenmetastasen zeigten einen Zusammenhang zur GRO1 Expression. Schlussfolgernd wird eine Beziehung des GRO1 Expressionslevels zu der Tumorprogression suggeriert (Shintani et al. 2004). GRO-1 wird in murinen SCCs (squamous cell carcinomas) mit metastatischer Tumorprogression überexprimiert. Die gesteigerte Expression von GRO-1 wird durch die Aktivierung des Nuclear Factor-kappaB (NF-kappaB) reguliert und führt so auch in vivo zu beschleunigtem Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung. Loukinova et al. untersuchte den Effekt verschiedener regulatorischer Cytokine, wie IL-1alpha, EGF und TGF-beta1, auf die Aktivierung von NF-kappaB und GRO-1 in primären und metastatischen Linien der murinen SCC PAM 212 Zellreihe, auch einer Plattenepithelkarzinomzellreihe. Diese Untersuchung zeigte eine GRO-1 Expressionsinduktion durch IL-1alpha und EGF in denjenigen PAM212 Zellreihen mit geringer Cytokinproduktion. LY-2 Zellen zeigten eine hohe Cytokinproduktion, metastatische Eigenschaften und keine signifikante Induktion für GRO-1 oder NF-kappaB. Sowohl in PAM212- als auch LY-2 Zellen unterdrückte TGF-beta1 grundlegend die durch IL-1alpha und EGF induzierte Produktion von GRO-1. Somit wird deutlich, dass IL-1alpha, EGF und TGF-beta1 entscheidend modulierend auf die GRO-1 Expression in SCCs wirkt. Es wurden verschiedene Wirkungen dieser Modulatoren in SCCs mit metastatischer Progression beobachtet, dies wird erklärt durch zum einen eine Abhängigkeit von bestimmten Faktoren und ein unabhängiges Stadium, gekennzeichnet

durch NF-kappaB Aktivierung – es werden also verschiedene Transitionsmechanismen für GRO-1 suggeriert (Loukinova E. et al. 2001). Die NF-kappaB Aktivierung wird für die MGSA/GRO1 induzierte Melanozytentransformation durch die RAS/MEKK1/p38 Kaskade in Melanozyten benötigt. Diesbezüglich wurde gezeigt, dass entweder die exogene Zugabe oder die kontinuierliche Expression von GRO1 in immortalisierten Melanozyten die NF-kappaB Aktivierung, genauso wie die Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinase Kinase Kinase (MEK) 1-, die MAP Kinase Kinase (MEK) 3/6- und die p38 Map Kinase Aktivierung steigert (Wang et al. 2001). Barcelos et al. untersuchte die zeitlichen Beziehung zwischen der Angiogenese und einer Leukozytenakkumulation zu einer endogenen Herstellung der proinflammatorischen Chemokine CXCL1-3/KC und CCL2/JE. Die exogene Verabreichung von CXCL1-3/KC genauso wie von CCL2/JE resultierten in einer gesteigerten Neovaskularisierung, also Angiogenese, und einer erhöhten Akkumulation von Makrophagen (Barcelos et al. 2004). GRO-1 stimuliert das Wachstum humaner Nabelschnurvenen (HUVECS- human umbilical vein endothelial cells) in vitro durch autokrine Mechanismen auf die Endothelzellen. Die Proliferation wurde durch 100nm rekombinantes humanes (rh) GRO-1 signifikant gesteigert. Antileukinate (Interleukin Hemmstoffe) inhibieren die autokrine GRO-1 Rezeptorbindung auf HUVECs und unterdrücken somit die Proliferationsstimulation. Das Vorliegen von Antileukinaten in einer Konzentration von 100µM wirkt nicht zytotoxisch und reduziert die zelluläre Lebensfähigkeit nicht. Abschließend ist festzuhalten, dass die Antileukinate, durch ihre Wirkung auf die Angiogenese, als wichtiger Parameter des Tumorwachstums, die Krebsbehandlung u.U. verändern könnten (Fujisawa N. et al. 1999).

CXCL3

Drei unterschiedliche humane GRO Gene kodieren für drei höchst ähnliche Chemokine: GROalpha, -beta und -gamma (CXCL1-3), alle drei Proteine binden mit unterschiedlicher Affinität an die gleichen Rezeptoren. Funktionelle Unterschiede bestehen zwischen CXCL1-3 abgesehen von ihrer Rezeptoraffinität kaum. Owen et al. verglich die Tumorgenese in Melanozyten bezüglich der Effekte von CXCL1-3 und beschreibt für alle drei Faktoren eine angiogenetische Induktion (Owen et al. 1997). Die biologische Potenz bzw. -Variabilität der Chemokine entsteht durch deren posttranslationelle Modifikation (Wuyts et al. 1999).

CX3CL1

CX3CL1 wird in Endothelzellen als Membranprotein synthetisiert. CX3CR1, der spezifische Rezeptor für CX3CL1 wird auf Monozyten und Lymphozyten exprimiert. Das membrangebundene CX3CL1 wirkt als Adhäsionsmolekül für Leukozyten, die sekretierte Form fungiert als chemotaktischer Faktor. Die CX3CL1 Produktion innerhalb der

Endothelzellen ist durch TNF-alpha, IL-1, Lipopolysaccharide und Interferon-gamma stimulierbar. Eine Inhibierung der endothelialen Expression entsteht durch die lösliche Form des IL-6-RA (receptor alpha), 15-deoxy-Delta(12,14)-Prostaglandin J(2) und Hypoxie. Die CX3CL1 Expression wird streng reguliert und ist entscheidend an der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen beteiligt (Imaizumi et al. 2004). Sun et al. untersuchte mittels des Oligonukleotid Arrays von Affymetrix das Genexpressionsprofil während der kapillären Morphogenese von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMVECs). Dabei wird geschildert, dass nach einer Versuchslaufzeit von 24h Chemokine wie CX3CL1, CCL2/MCP-1 und CCL5/RANTES als spezifisch „hoch-reguliert“ identifiziert werden konnten. Bei dem Zeitpunkt von 24h charakterisiert das Sprießen der Gefäße die morphologische Veränderung. Die daraus folgenden Schlussfolgerungen suggerieren, dass diese Chemokine eine ausschlaggebende Rolle in den frühen Stadien der Angiogenese einnehmen (Sun et al. 2005). CX3CL1 wird als ein potenter angiogener Mediator in der rheumatischen Arthritis dargestellt. (Ruth et al. 2001) CX3CL/Fraktalkin (fkn) wurde nach seiner fraktalen geometrischen Struktur bezeichnet und unterscheidet sich, durch das Vorhandensein von drei Aminosäuren zwischen den beiden terminalen Cysteinen, entscheidend von anderen Chemokinen (Bazan et al. 1997). FKN ist auch insofern einzigartig, dass es ein transmembranes Protein ist, dessen Chemokin-Domäne über eine 241 Aminosäuren langen, negativ geladenen, muzin-ähnlichen „Stängel“, relativ weit von der Zelloberfläche weggestreckt liegt. Zudem ist fkn, bestehend aus 373 Aminosäuren wesentlich größer als alle anderen Chemokine (Bazan et al. 1997; Schall 1997).

CCL20

CCL20 ist ein 9kDa schweres CC-Chemokin, das durch die Keratinozyten der epidermalen Hautschichten (Charbonnier et al. 1999; Homey et al. 2000), der intestinalen Mukosa, den epithelialen Krypten der Tonsillen und in den „Peyer's Patches“ exprimiert wird (Cook et al. 2000). Murines CCL20 wird im Thymus, kleinem Intestinum und Colon exprimiert. Einige Chemokine und Chemokinrezeptoren sind bezüglich ihrer Interaktionen verworren; CCL20 ist dabei in seiner löslichen Form Ligand und Aktivator des CC Chemokin Rezeptor-6 (CCR6) (Hoover et al. 2002). CCL20 zeigt als einzigstes Chemokin eine spezifische Bindungsstelle an CCR6. Zudem bindet und aktiviert humanes Beta-Defensin-1, -2 und die „small cationic antimicrobial peptides CCR6“ ebenfalls an CCR6 (Hoover et al. 2002). Der genaue Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und der Tumorangio-genese ist weitestgehend ungeklärt. Conejo-Garcia et al. beschrieben einen neuen Mechanismus der Tumorangio-genese, wobei dendritische Zellvorläufer angeregt durch Beta-Defensin und VEGF-A in den Tumor infiltrieren um dort zu Tumorgefäßen migrieren und so in vivo eine Neovaskularisierung bieten. Dabei wirkt CCR6 durch Beta Defensin aktivierend

chemotaktisch auf die Vorläuferzellen während VEGF-A über VEGFR2 deren endothel-ähnliche Spezialisierung und „Gefäßmigration“ hervorbringt (Conejo-Garcia et al. 2004).

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Chemokine sind durch ihre Rezeptoren auf Leukozyten oder Endothelzellen an der Inflammation und Angiogenese beteiligt. Die in der Angiostasis vermittelten Reaktionen laufen über den CXCR3 Rezeptor an den Chemokine wie CXCL4, CXCL9, CXCL10 und CXCL11 binden können (Romagnani P. et al. 2004). Die geringer exprimierten CXC Gene sind einer angiogenetischen Funktion zuzuordnen, was zu den vorliegenden Ergebnissen passt. Denn sowohl CXCL1 als auch CXCL3 wurden in der Endothelzell-Tumorzell-Kokultur im Vergleich zu Tumorzellreinkultur um den 3,5 fachen Faktor weniger stark exprimiert. Die Tumorzellen haben in der Kokultur über das Medium Kontakt zu den Endothelzellen – ihnen wird sinnbildlich gesprochen die Anwesenheit eines Mikrovaskularsystems vorgetäuscht. Somit ist die geringere Expression der eigentlichen Angiogenesefaktoren in der Kokultur im Sinne einer negativen Rückkopplung durch Endothelpräsenz zu erklären. Geht man zudem mutig davon aus, dass CCL20 imstande ist durch seine Rezeptorbindung an CCR6 einen ähnlichen Ablauf in Gang zu setzen wie die durch Beta Defensin eingeleitete Tumovaskulogenese (Conejo-Garcia et al. 2004), dann ist die 2,3fach erhöhte Expression von CCL20 innerhalb der Tumorreinkultur im Vergleich zur Tumor-Endothel-Kokultur, als proangiogener Einfluss zu betrachten wenn ebenfalls VEGF-A in ausreichendem Umfang vorliegt. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob innerhalb einer Endothelzell- vs. Endothel-Tumorzellkokultur Anhaltspunkte für eine entsprechende VEGF-A Expression oder Wirkung gegeben werden. Sun et al. identifizierte CX3CL1 mittels eines Oligonukleotid Arrays von Affymetrix schon als erhöht exprimierten Parameter für die kapillären Morphogenese von humanen mikrovaskulären Endothelzellen und schlussfolgerte so dessen Bedeutung für die frühen Stadien der Angiogenese (Sun et al. 2005). Auch die Interpretation der vorliegenden Datentabelle spricht diesem, in der Tumorkultur 1,9fach stärker transkribierten Faktor, angiogenes Potential zu.

5.1.2 Interleukine oder Interleukinrezeptoren

Interleukin 8

Das für IL-8 kodierende Gen ist ein Mitglied der CXC-Chemokin Familie. Dieses Chemokin ist ein Mediator der Immunantwort und wird durch verschiedenste Zelltypen sekretiert. Es

fungiert als chemotaktischer Faktor für Neutrophile, Basophile und T-Zellen jedoch nicht für Monozyten, ist zudem an der Aktivierung von Neutrophilen beteiligt und gilt als potenter angiogener Faktor. Dieses Gen formt mit 10 weiteren Mitgliedern der CXC-Chemokin Familie einen Gencluster auf dem Chromosom 4q. IL-8 ist ein transkriptionelles Ziel der Ras Signalwirkung. Sparman et al. zeigten, dass die Ras abhängige IL-8 Sekretion für die Initiierung der tumor-assoziierten Inflammation und Neovaskularisierung benötigt wird (Sparman et al. 2004). Interleukin-8 bindet spezifisch und ausschließlich, mit nanomolarer Affinität an den CXC-Chemokinrezeptor CXCR1. Die strukturellen Eigenschaften des CXC-Rezeptors werden innerhalb der Erläuterungen zu den Mitgliedern der Chemokin Familie dargestellt. Ergänzend dazu bindet IL-8 die N-Domäne in signifikant höherer Affinität in Micellen als in Lösung (ca. 1µM versus ca. 20µM) (Rajagopalan et al. 2004). In humanen Plattenepithelkarzinomzellreihen des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) wird NF-kappaB (nuclear factor-kappaB) und AP-1 (activator protein1) durch IL-1alpha koaktiviert. NF-kappaB und AP-1 wiederum begünstigen die Expression von sowohl IL-8 und VEGF. Dabei kann der MEK-Pathway (mitogen-activated/extracellular signal regulated kinase) die NF-kappaB und AP-1 Aktivierung potentiell modulieren (Bancroft et al. 2002). IL-8 und VEGF sind bedeutende Vermittler der Tumorangiogenese, des -wachstums, der Metastasierung und werden sowohl in HNSCCs als auch in weiteren Krebserkrankungen koexprimiert. Die Promotoren der IL-8 oder VEGF Gene enthalten verschiedene Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF-kappaB und AP-1, welche ebenfalls in HNSCCs koaktiviert vorliegen. Dabei können AP-1 und NF-kappaB durch die MAPK (mitogen activated protein kinase) und die IKK (inhibitor kappaB kinase) modulierend beeinflusst werden. So konnte durch Bancroft et al., gezeigt werden, dass durch die kombinierte Inhibition der MAPK und IKK Signalleitungswege eine Verdrängung bzw. Unterdrückung der für die VEGF- und IL-8 Sekretion verantwortlichen Mechanismen in HNSCCs möglich ist (Bancroft et al. 2001).

Interleukin 6

IL-6 ist ein Cytokin mit einem weiten Spektrum von biologischen Funktionen: es ist essentiell an der finalen Differenzierung der B-Zellen in Ig-sekretierende Zellen beteiligt, es induziert das Myeloma- und Plasmazytoma Wachstum, es leitet die Differenzierung der Nervenzellen ein und in Hepatozyten veranlasst es die Bildung von akute Phase Edukten. IL 6 gilt als einer der potentesten autokrinen und parakrinen Faktoren für die Aktivierung des STAT3 (signal-transducer-and-activator-of-transcription-3). Dabei wird die STAT3 Aktivierung häufig für das anormale Wachstum der HNSCCs verantwortlich gemacht. Die STAT3 Aktivierung durch IL6 oder durch andere Cytokine wird unter Vermittlung der gp130 Rezeptor Familie basierend auf einer autokrinen/parakrinen Aktivierungsschleife vermittelt. Diese autokrine/parakrine Schleife trägt möglicherweise das Potential für Überleben und

Proliferation während der Malignität (Sriuranpong et al. 2003). IL-1 und IL-6 werden u.a. in hSCC (human squamous cell carcinomas) produziert, dabei steigert IL-1 die Sekretion von IL-6 in verschiedenen getesteten Zellreihen deutlich (Woods et al. 1998).

Interleukin-1 Alpha

Das für IL1A kodierende Gen ist ein Mitglied der Interleukin 1 Cytokin Familie, dieses pleiotrope Cytokin ist in verschiedene Immunantworten, inflammatorische Prozesse und die Haematopoese involviert. Das Proprotein wird durch Makrohagen und Monocyten produziert und infolge einer Zellbeschädigung und der darauf folgenden Apoptose proteolytisch gespalten und freigesetzt. Das Gen bildet mit 8 weiteren Genen der Interleukin 1 Familie einen Cytokingencluster auf dem Chromsom 2.

Interleukin 1 alpha ist ein regulatorisches Cytokin, dass nach einer Zellbeschädigung die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF-kappaB und AP-1 induzieren kann. Diese wiederum beeinflussen die Expression von Genen, die für Proliferation, Überleben und Angiogenese verantwortlich sind positiv. Die nach Wolf et al. autonome Expression von IL-1A in HNSCCs (und in anderen Krebserkrankungen) bietet einen autokrinen Aktivierungsstimulus für Transkriptionsfaktoren die u.a. Überleben und Angiogenese positiv beeinflussen. HNSCCs sekretieren und reagieren auf funktionelles IL-1A. Darüber hinaus konnte Wolf et al. nachweisen, dass IL-1A den proangiogenen Faktor IL-8 zum einen durch einen autokrinen Mechanismus induziert und zum anderen durch die durch IL-1A eingeleitete Koexpression von NF-kappaB und Ap-1 eine Expressionssteigerung von IL-8 herbeiführt. Dabei führte sowohl exogenes- als auch endogenes IL-1A über eine transkriptionelle Aktivierung von NF-kappaB und AP-1 zur Expression von IL-8. Zudem wurden in vitro über die gleichen Mechanismen Zellwachstum und –überleben in HNSCCs positiv beeinflusst (Wolf et al. 2001).

In humanen Plattenepithelkarzinomen (hSCC), welche ICAM-1 („intercellular adhesion molecule-1“) schwach ausbilden, wird diese Expression durch IFN-gamma (Interferon-gamma), TNF-alpha (tumor necrosis factor), Il-1 und Lipopolysaccharide (LPS) gesteigert (Fujisawa et al. 1997).

IL-7R

IL-7 ist an normalen Entwicklungsprozessen und der Aufrechterhaltung des Immunsystems beteiligt. Die IL-7-Effekte werden durch den entsprechenden Rezeptor IL-7R vermittelt. Die Ergebnisse der Ligand-Rezeptor-Reaktion führen in eine Kaskade von Phosphorylierungen, diese Abläufe betreffen verschiedene Moleküle wie die Janus Kinasen (Jak1 und Jak3), PI3-Kinasen, STATs und andere Moleküle. Die IL-7 Aktivierung resultiert in Überleben, Proliferation, Differenzierung und Reifung von heamatopoetischen Zellen einschließlich B-

und T-Lymphozyten. Dabei kann IL-7 durch verschiedene humane Tumorzellen produziert werden und ist zudem an der Tumorentwicklung und Progression beteiligt (Al-Rawi et al. 2003). IL-7R besteht aus einer spezifischen alpha-Kette (CD127) und einer unter mehreren Cytokinenrezeptoren: IL-2, IL-4, IL-9 and IL-15 vorkommenden gamma-Kette (CD132) (Dus D. et al. 2003). Die IL-7R alpha Kette ist dem Typ I der Cytokinrezeptorfamilie zuzuordnen, dabei handelt es sich um ein Membranglykoprotein mit einer einzelnen 25 Aminosäuren (As) transmembranen Domäne. Die intrazelluläre Domäne, bestehend aus 195 As (Venkitaraman et al. 1992), hat zwar nicht die Eigenschaften einer Signalkinase besitzt trotzdem potentielle Bindungsstellen für Signalmoleküle. Eine Region besitzt viele saure Anteile (A-Region), eine weitere Serin reiche Region wird als S-Region bezeichnet und eine dritte T-Region enthält drei Tyrosinanteile: Tyr401, Tyr449, und Tyr456, diese sind aus der Evolution sowohl in humanen als auch murinen IL-7R alpha Ketten vorhanden. Zudem liegt proximal der Membran ein 8 As Motiv, welches als Box1 bezeichnet wird (Murakami et al. 1991), dieses kann die Janus-Kinase 1 (Jak1) binden (Jiang et al. 2004). Eine IL-7 Bindung an seinen Rezeptor bringt die alpha und gamma Kette- und somit deren assoziierte Kinasen, soll heißen die Jak1 (gebunden an Box1) und Jak3 zusammen. Diese beiden Kinasen phosphorylieren eine weitere und steigern deren enzymatische Aktivität. Diese Kinasen wiederum phosphorylieren Y449. Y449 dient als Bindungsstelle für STAT5 und weitere unbekannte Proteine, die für die Bcl2-Synthese, die zytosolische Bax Retention und die Zellproliferation benötigt werden. Ein zweiter von Y449 unabhängiger „Pathway“ leitet die Phosphorylierung von Bad, STAT1 und STAT3 ein. Letztendlich resultiert aus der IL-7 Bindung ein positives Überlebens- und Proliferationssignal (Jiang et al. 2004). Die Kinase Jak3 ist mit IL-7Rgamma zu assoziieren (Cao et al. 1995; DiSanto et al. 1995; Maki et al. 1996; Nosaka et al. 1995; Park et al. 1995; Peschon et al. 1998, 1994; Thomis et al. 1995; von-Freeden-Jeffry et al. 1995). IL-7 induziert die Synthese des antiapoptotischen Bcl2 (Khaled et al. 1999), und zugleich blockiert es die proapoptotischen Proteine Bad und Bax durch posttranslationelle Mechanismen. IL-7 Signale zwingen Bax ins Zytosol, verhindert so dessen Eintritt ins Mitochondrium und eine Initiierung der Apoptose (Kim et al. 2003). Untersuchungen von Dus et al. zeigten, dass IL-7R auch auf humanen Endothelzellen des Mikrovaskularsystems lokalisiert ist. IL-7R ist in höherer Konzentration auf mesenterischen- als auf peripheren Endothelzellen vorhanden. Auf mukosa-assoziierten Lymphknotenendothelzellen liegt es in noch geringerem Ausmaß vor. Eine RT-PCR bestätigte, dass der endotheliale IL-7R dem IL-7R der Lymphozyten identisch ist (Dus D. et al. 2003). Der IL-7 Rezeptor besteht zusammenfassend aus einer alpha- und einer beta-Kette. Der Rezeptoraktivierung folgt die Aktivierung verschiedener Klassen von Kinasen, einschließlich der Janus-Kinase, der Src-Familie und der PI3-Kinase. Daraufhin wird eine Anzahl von Transkriptionsfaktoren, wie die STATs, c-myc, NFAT und AP-1 aktiviert. Referenzen, die eine klare Zuordnung des IL-7 Rezeptors zu Plattenepithelkarzinomen darlegen fehlen.

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Nachdem die Stoffwechselbeziehungen der o.g. Mitglieder der Interleukinfamilie erörtert wurden, suggerieren diese Erläuterungen einen gemeinsamen Stoffwechselkontext für IL-1A, IL-6, IL-8 und IL-7R. IL1A, durch Zellbeschädigung und Hypoxie induziert, vermittelt bei einer 2,6fach erhöhten Transkription in der Tumorreinkultur, über NF-kappaB und AP-1 eine Steigerung der IL-8 Expression (selbst in der Tumorreinkultur 2,9fach erhöht). Parallel dazu triggert IL-1A über die MAPK, welche tumorkulturell erhöht exprimiert wurde, NF-kappaB, und wirkt somit nochmals positiv auf die IL-8 Expression. Die somit mehrfach beeinflusste IL-8 Synthese und Sekretion führt über angiogenetische Prozesse zur Neovaskularisierung. Zudem wird eine mindestens sekretionssteigernde Wirkung von IL-1 auf IL-6 beschrieben. Letzteres wird 1,9fach stärker in der Tumorkultur exprimiert, und führt nach seiner Rezeptorbindung über die Januskinasen, STAT3 und PI-3Kinase zu Wachstum und Zellproliferation. Der Interleukinrezeptor-7R kommt unter anderen auf den mesenterischen und peripheren Endothelzellen vor und wird, nach bestehenden Tumormodellen, durch eine IL-7 Bildung durch die Tumorzellen selbst, aktiviert. IL-7R wurde in der Tumorkultur 1,7fach erhöht exprimiert und führt ähnlich wie IL-6 über Januskinasen (Jak1 und Jak3), die Src-Familie und PI3-Kinase zur positiven Beeinflussung folgender Transkriptionsfaktoren: STAT3, AP-1, c-myc und NFAT, die ihrerseits antiapoptotisch- und positiv auf die Zellproliferation wirken. Dabei fällt auf, dass bestimmte Transkriptionsfaktoren innerhalb dieses „Interleukinkontextes“ mehrfach auftreten oder beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang sind NF-kappaB, AP-1 und STAT3 zu nennen. Ebenso wird deutlich, dass die genannten Interleukine „quasi“ synergistisch zur Zellproliferation im angiogenen Sinne führen. Hinzufügend ist die positive Wirkung von IL-1A auf CXCL1 und CX3CL1 (beide wie o.g. in der Tumorkultur erhöht exprimiert), deren angiogenes Potential ebenfalls bekannt ist, zu nennen. In den schlussfolgernden Ausführungen zu den Chemokinen kommt es zur Indikationsstellung einer Endothel- vs. Tumorendothelzellkokultur. Diese wird auch durch die Erörterungen zu den Interleukinen unterstrichen. Es stellt sich die Frage nach einer eventuellen transkriptionellen endothelialen Reaktion auf IL-8. Des Weiteren bleibt die Beeinflussung durch IL-6 und IL-7R auf Genexpressionsebene genau zu klären.

5.1.3 Moleküle, die mit TNF zu assoziieren sind

Der TNF (tumor necrosis factor) ist ein Cytokin das u.a. nekrotische- und apoptotische Formen des Zelltodes einleitet. Die letztendlich zur Apoptose oder Nekrose führenden Mechanismen unterscheiden sich teilweise, und werden dementsprechend verschieden

reguliert (Heyninck K. et al. 1999). Folgende Sequenzen wurden im Vergleich zwischen Tumoreinkultur und Tumorendothelzellkultur differenziell transkribiert:

TRAF4

Das durch dieses Gen kodierte Protein ist eines von 6 Mitglied der TRAF (TNF receptor associated factor) Protein Familie. TRAF Proteine dienen und vermitteln die Signaltransduktion ausgehend von den Angehörigen der TNF Rezeptor Superfamilie. Dieses Protein interagiert mit Neurotrophin, p75 (NTR, NTSR1), und reguliert den durch NTR eingeleiteten Zelltod (sowie die NF-kappaB Aktivierung negativ). TRAF4 bindet an p47phox, einem zytosolischen regulierenden Faktor der zu dem Multi-Protein Komplex der NADP(P)H Oxidase gehört. Folglich wird diesem Protein funktionelle Beteiligung an der oxidativen Aktivierung der MAPK8/JNK zugeschrieben. Für dieses Protein entstehen aus zwei unterschiedlichen alternativ gespleißten Transkriptvarianten zwei verschiedene Isoformen. TRAF4 wurde ursprünglich als CART1 (cysteinrich motif associated with RING and TRAF domains) bezeichnet und wurde durch differentielle Untersuchungen von Lymphknoten cDNA Sammlungen mit metastatischen Tumorzellen identifiziert (Regnier et al. 1995). Der Zusammenhang zwischen TRAF4 und apoptotischen Prozessen bleibt auch nach eingehender Recherche relativ unklar. So wird TRAF4 zum einen als ein Mitglied signaltransduzierender Proteine dargestellt, die letztendlich durch Einflussnahme auf Genexpressionsebene apoptotische „Pathways“ negativ regulieren und zum anderen das zelluläre Überleben begünstigen (Fleckenstein et al. 2003). Gegensätzlich dazu wirkt die von Sax et al. suggerierte Beteiligung an der durch p-53 vermittelten pro-apoptotischen Signalisierung als Reaktion auf zellulären Stress (Sax et al. 2003). p70S6K ist eine intrazelluläre Serin/Threonin Kinase die die Zellzyklusprogression und Gentranskription vermittelt. Diese Serin/Threonin Kinase liegt i.d.R. zytoplasmatisch-, nach Cytokinstimulation auch nukleär vor. Auf die Annahme hin, dass p70S6K mit nukleären Transkriptionsfaktoren interagiert oder neben dem S6-Protein weitere zytoplasmatische Proteine bindet, wurde festgestellt, dass TRAF4 ein weiterer Bindungspartner von p70S6K ist. Durch Immunopräzipitation zeigte sich, dass eine Anregung der TNF-Rezeptoren die Formation eines TRAF4/p70S6K Komplexes herbeiführt. TRAF4 wird als Mediator der durch TNF induzierten Signalleitungswege beschrieben und inhibiert in hoher Expression die Fas-induzierte Apoptose (Fleckenstein et al. 2003). Der genaue funktionelle Zusammenhang von TRAF4 und TNFR-bezogenen Proteinen erscheint trotz zahlreicher Studien rätselhaft. Esparza et al. beschreiben für T-, B-Zellen und Makrophagen eine auf die NF-kappaB Aktivierung steigernde Wirkung. Diese Wirkung wird jedoch in Abhängigkeit eines auf den genannten Zellen exprimierten Rezeptors, dem GITR (glucocorticoid-induced TNFR), beschrieben (Esparza et al. 2004). In vitro Studien zeigten eine schwache Interaktion mit LTbetaR und dem p75-nerve growth factor receptor. Nach Krajewska et al., besteht keine

Interaktion mit TNFR1, TNFR2, Fas oder CD40 (Krajewska et al. 1998). TRAF4 wird in Mäusen während der Embryogenese in höchstem Maß exprimiert und das mit Schwerpunkt auf das zentrale und periphere Nervensystem (Masson et al. 1998). In ausgewachsenen Mäusen wird es hauptsächlich im Hippocampus und dem olfaktorischen Bulbus- aber nicht in weiteren normalen Geweben exprimiert (Bradley et al. 2001).

Die zugrunde liegenden Referenzen ermöglichen zwar keine klare eindeutige Übertragung dieser Informationen auf die vorliegende Kokultur, lassen aber dennoch die Annahme zu, dass TRAF4 negativ regulierend auf NF-kappaB wirkt und zudem durch die hohe Expression in der Tumoreinkultur ($FC=0,7$ entspricht $1/x=1,4$) nach Fleckenstein et al. inhibierend auf die Fas-induzierte Apoptose wirkt. Diese im ersten Moment ambivalente erscheinende Darstellung ergibt letztendlich innerhalb eines Gesamtstoffwechselkonzeptes dieser Kokultur doch Sinn.

TNFRSF6 (Fas, Fas1, Apo-1)

Das durch das Gen TNFRSF6 kodierte Protein ist ein Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie. Dieser Rezeptor enthält eine „death domain“. TNFRSF6 zeigt entscheidende Beteiligung an der physiologischen Regulation des programmierten Zelltodes und steht mit der Pathogenese verschiedener Malignitäten und Erkrankungen des Immunsystems in Verbindung. Die Interaktion dieses Rezeptors mit seinem Liganden führt zur Formation des „death-inducing signaling complex“ (DISC), dieser umfasst FADD (Fas-associated death domain protein), Caspase 8 und Caspase 10. Die autoproteolytische Bearbeitung der Caspasen innerhalb des Komplexes löst eine stromabwärts gelegene Caspasen-Kaskade aus und führt so letztendlich auch zur Apoptose. Dieser Rezeptor zeigt aber ebenfalls aktivierende Wirkung auf NF-kappaB, MAPK3/ERK1 und MAPK8/JNK, wird zudem als Teil der transduzierenden Mechanismen von proliferativen Signalen in normalen diploiden Fibroblasten und T-Zellen beschrieben. Nicht zuletzt ergeben sich aus alternativem Spleißen 8 unterschiedliche Transkriptvarianten die für 7 Isoformen kodieren. Diejenigen Isoformen, denen die transmembrane Domain fehlt werden als negative Regulatoren der Apoptose dargestellt. Diese Darstellung schildert eine Verknüpfung der eigentlich absolut gegensätzlich erscheinenden Prozesse von Zelltod und Zellproliferation bzw. -wachstum. Der sich daraus offensichtlich gerechtfertigt ergebende Zweifel ist jedoch relativierbar: Die klassische Funktion eines Todesrezeptors wird durch Fas(CD95/APO-1) verkörpert (Nagata et al. 1995). Trimerisation bis Oligomerisation von Fas, führt zur Formation des DISC (death-inducing signal complex). Beginnend bei der Rekrutierung des Fas-Adapter Proteins FADD durch beiderseitige „death domains“ (DD) (Krammer et al. 1999). Die andere FADD Seite enthält „death effector domains“ (DEDs), welche die Caspase 8 oder dessen enzymatisch inaktives Homologon, das Fas inhibierende FLICE inhibitorische Protein (FLIP) rekrutieren. Caspase 8 ist die erste in einer Serie von Proteasen die sich im Folgenden

spalten. Caspase 8 ist ebenso in der Lage das Bcl-2-Homologon Bid abzubauen. Daraus entsteht das aktiv abgetrennte Fragment tBid („truncated Bid“). tBid komplexiert mit- und inhibiert deshalb Bcl-2 in der äußeren mitochondrialen Membran. Wodurch letztendlich durch einen mitochondrialen Signalleitungsweg der Zelltod eingeleitet wird (Kim et al. 2000; Li H. et al. 1998). Die im folgenden dargestellte Beteiligung der „death receptors“ an zellproliferativen Stoffwechselwegen erscheint zunächst kontrovers zu den obigen Ausführungen, basiert aber einfach auf dem Einfluß weiterer Mitglieder der DISCs, die ihrerseits die Proliferation vermitteln. So wird zum einen beschrieben, dass die Spaltung der Caspasen für z.B. die T-Zellproliferation benötigt wird, dies wird u.a. insofern gestützt, dass Caspase-Blocker die T-Zellproliferation teilweise inhibieren (Alam A. et al. 1999; Kennedy et al. 1999). Das Switch-Molekül FLIP divertiert Fas Signale vom Zelltod zur Proliferation. FLIP ist ein Homologon zur Caspase 8 und enthält zwei DEDs, die mit FADD und DED interagieren können, aber dessen Caspasen Domain ist nicht funktionstüchtig. FLIP ist physiologischerweise mit Raf-1, TRAF1 und TRAF2 zu assoziieren, welche durch den ERK und NF-kappaB Signalisierungsweg zur Zellproliferation und Differenzierung führen. Insofern sind Zellen mit hoch exprimierten Levels von FLIP nicht nur zunächst Resistent gegen den zellulären Untergang sondern ebenso Empfänger eines proliferativen Signals (Budd et al. 2002). Verschiedene Karzinomtypen entkommen der Erkennung durch das Immunsystem durch konstitutive Resistenz gegen die durch den Fas-Rezeptor (Fas) vermittelte Apoptose. Eine Untersuchung von drei Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCCs) Zelllinien nach deren Sensitivität gegenüber der Fas vermittelten Apoptose zeigte, dass diese Zellreihen zwar das Fas Protein- aber nicht dessen Fas-Liganden-, vielmehr dessen mRNA, exprimieren (Otani et al. 2000). Zunächst scheint sich Fas mit einem Fold Change von 0,6 ($1/x=1,7$) in den Darstellungen von Otani et al. einzureihen. Da der positiv apoptotischen Signalmechanismus innerhalb der Tumorreinkultur keinen Sinn ergibt, ist diese erhöhte Expression vorerst als Schutz gegen immunologische Reaktionen zu betrachten. TRAF4 wurde durch Fleckenstein et al. als negativer Regulator der Fas-induzierten Apoptose beschrieben und ist ähnlich dem Fas reguliert. Letzteres verhärtet die Annahme, dass es sich bei der vorliegenden Fas Regulation um einen Schutz der Tumorzelle gegen das Immunsystem handelt.

TNFSF10 (Apo-2L/TL2/ TRAIL/TRAIL-PEN/Apo-2 ligand)

Das durch dieses Gen kodierte Protein ist ein Cytokin das zur Familie der TNF-Liganden gehört. Dieses Protein induziert in transformierten Zellen und Tumorzellen apoptotische Prozesse, wobei es in normalen Zellen in den meisten Geweben in signifikantem Level exprimiert wird und nicht apoptotisch wirkt. TNFSF10 bindet an verschiedene Mitglieder der TNF-Rezeptor Superfamilie einschließlich TNFRSF10A/TRAILR1, TNFRSF10B/TRAILR2, TNFRSF10C/TRAILR3, TNFRSF10D/TRAILR4 und möglicherweise auch an

TNFRSF11B/OPG. Die Aktivität dieses Proteins wird durch Bindung an die lockenden Rezeptoren TNFRSF10C/TRAILR3, TNFRSF10D/TRAILR4 und TNFRSF11B/OPG moduliert, diese Rezeptoren können die Apoptose nicht einleiten. Die Bindung dieses Proteins an seine Rezeptoren bewirkt eine Aktivierung der MAPK8/JNK, Caspase 8, and Caspase 3. TNFSF10 wurde durch seine hohe Sequenzhomologie zu anderen TNF Familienmitgliedern identifiziert. Die Rezeptoren dieses Proteins sind insofern ungewöhnlich komplex, dass sie vier membrangebundenen Vertreter haben. TRAIL-R1 (DR4) und -R2 (DR5, Killer, and TRICK2) sind "Todesrezeptoren" und enthalten in ihrer intrazellulären Domäne ein DD-Motiv ähnlich dem von CD95/Fas/APO-1 und TNF-R1. Die Komplexbildung von TRAIL mit dessen Rezeptoren, DR4 und DR5, löst durch die Oligomerisierung intrazellulärer „death domains“ die Apoptose aus. Die zwei weiteren Rezeptoren sind TRAIL-R3 (DcR1, LIT und TRID) und -R4 (DcR2 und TRUNDD) in beiden ist das DD Motiv inkomplett oder nicht anwesend- folglich ist keine apoptotische Induktion nachweisbar. Eine ektopische Expression von TRAIL-R3 und -R4 folgt eine Dämpfung /Milderung der TRAIL induzierten Apoptose; in diesem Sinne erfolgte die Bezeichnung als „decoy receptors“. TRAIL signalisiert die Apoptose durch Formation des "death-inducing signaling complex" (DISC). Die Ligation von TRAIL-R1 und -R2 durch TRAIL führt zur schnellen Rekrutierung des Adaptor Proteins FADD/MORT1 (Bodmer et al. 2000; Kirschkel et al. 2000; Sprick et al. 2000). FADD ist ein zweiteiliges Molekül mit einem c-terminalem DD und einer n-terminalem „death effector domain“ und scheint ein universelles Adaptorprotein zu sein, da es auch von anderen „death receptor subfamily“ Mitgliedern benötigt wird. Neben der FADD Bindung an seinen Rezeptor, bewirkt durch homophile DD Interaktionen, vermittelt die „death effector domain“ Interaktionen mit einigen Motiven der Prodomain der Initiator Caspase, der Caspase 8. Die Procaspase 8 wird an den DISC durch autokatalytische Mechanismen aktiviert, diese sind von der Nähe der Procaspase 8 Moleküle abhängig. Nach der Aktivierung vermittelt die Caspase 8 die Apoptose durch entweder direkte Aktivierung abwärts gelegener Caspasen oder durch Spaltung von pro-apoptotischen Molekülen wie dem Bcl-2 Homologon, Bid. Das therapeutische Potential von TRAIL (Fulda et al. 2002; Ichikawa et al. 2001) wird durch die selektive Toxizität auf transformierte Zellen und Tumorzellen ersichtlich, gegensätzlich dazu besteht keine Zytotoxizität für die Mehrheit normaler Zellen. Diese Beobachtungen wurden durch in vivo Studien bestätigt, hierbei reduzierte TRAIL in Tumorzell-Xenografts das Wachstum solider Tumore und leitete die Regression derselben ein, dabei fehlt den TRAIL Charakteristika jegliche systemische Toxizität. Der Mechanismus dieser differentiellen Toxizität wurde ursprünglich der Anwesenheit von TRAIL „decoy receptors“ auf normalen Zellen zugesprochen. Aktuelle Studien konnten jedoch keine Korrelation zwischen den decoy receptors und der TRAIL Sensitivität nachweisen diesbezüglich wird suggeriert, dass die TRAIL Resistenz stattdessen intrazellulär reguliert wird (Harper et al. 2003). Verschiedene intrazelluläre Proteine wurden mit der Resistenz gegen die TRAIL induzierte Apoptose in Verbindung gebracht. Das

inaktive Caspase 8 Homologon, c-FLIP („cellular FLICE-inhibitor protein“), interferiert mit der Aktivierung der Procaspase 8 an dem DISC, unterdessen korreliert eine hohe basale FLIP Expression oft mit einer TRAIL Resistenz. Diesbezüglich führt eine Modulation der c-FLIP Levels durch metabolische Inhibitoren eine Sensitivierung eigentlich resistenter Zelltypen für die durch TRAIL induzierte Apoptose. Signalisierungswege, die sich positiv auf das Überleben auswirken und mit der TRAIL Resistenz impliziert sind, beinhalten die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB. Dieser fungierte im Fall TNF durch die hoch-Regulierung anti-apoptotischer Gene, einschließlich c-IAP1 und -2. Studien zeigten, dass die TRAIL Sensitivität durch die Aktivierung oder Inhibierung von NF-kappaB beeinflusst werden kann. Womöglich ist die Modulation der NF-kappaB Aktivierung an den DISCs eine Schlüsseldeterminante der Sensitivität für eine durch TRAIL induzierte Apoptose (Harper et al. 2001). Li J.H. et al. untersuchten u.a. die Wirkung von rekombinatem TRAIL auf humane Nabelschnurvenen (HUVECs) und humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMECs) und fassen schlussfolgernd zusammen, dass TRAIL unter in vitro- und in vivo Verhältnissen sowohl aktivierende- als auch beschädigende Wirkung auf Endothelzellen zeigt (Li J.H. et al. 2003). Trail wurde hauptsächlich als pro-apoptotischer Faktor beschrieben. In dieser Funktion und mit einem Fold Change von 0,4 ($1/x=2,3$) ist der Kontext zur Tumorreinkultur unklar. Inwiefern die von Li J.H. et al. dargestellte endotheliale Aktivierung, wodurch auch dieses Molekül potentiell mit dem Tumor-Gefäßsystem zu assoziieren ist, mit der Tumorreinkultur in Zusammenhang gebracht werden darf muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

TNFAIP2 (B94)

Die Genexpression von TNFAIP2 wird in Endothelzellen aus Nabelschnurvenen durch TNF induziert. TNF ist ein proinflammatorisches Cytokin mit pleiotropen Effekten auf Zellen die zu einem großen Anteil durch Veränderungen auf der Genexpressionsebene entstehen. Eine Untersuchung mit der Fragestellung welche primären Antwortelemente der TNF-Reiz in Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene (HUVECs) auslöst, beschreibt das 4kb Transkript von TNFAIP2/B94 als schnell induziert bzw. als superinduziert durch die zusätzliche Anwesenheit von Cycloheximiden. Neben TNF sind auch IL-1beta oder verschiedene Lipopolysaccharide in der Lage die TNFAIP2 mRNA Expression zu steigern. Die Aktivierung von TNFAIP2 durch TNF findet auf transkriptioneller Ebene statt. Das TNFAIP2 Gen ist auf dem Chromsom 14 q32 lokalisiert, diese Region ist in lymphoiden Neoplasmen oft umstrukturiert. In einem in vitro Modell für Mäuse, das die endotheliale kapilläre Tubenformation untersucht zeigte sich TNFAIP2 als proangiogen reguliert. Dabei ist zu bemerken, dass verschiedene durch TNF induzierte Transkripte während der kapillären Tubenformation aktiviert sind wobei hierbei auch eine Überlappung von angiogenetischen- und durch TNF aktivierten Genen vorliegen kann (Sarma et al. 1992). V-

erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2; Syn.: HER2, NEU) kodiert für ein transmembranes Glykoprotein mit spezifischer Tyrosinkinaseaktivität das als Hauptschalter in verschiedenen Signaltransduktionswegen auftritt. ERBB2 Amplifikation und Überexpression wird für eine Anzahl humaner Krebserkrankungen beschrieben. Eine ERBB2 Überexpression unterdrückt die Expression antiangiogener Faktoren (u.a. Sparc, Timp3, Serpinf1) und steigert zeitgleich die Expression proangiogener Faktoren, so auch von TNFAIP2 (z.B. Klf5, Sema3c) (Beckers et al. 2005). Der Fold Change von 0,4 ($1/x=2,7$) spricht für eine erhöhte Transkription innerhalb der Tumorreinkultur, was schon an sich auf ein pro-angiogenes Potential hindeutet und die Ausführungen von Beckers et al. bestätigt.

TNFAIP3 (A20)

Das durch dieses Gen verschlüsselte Protein ist ein zytoplasmatisches Zinkfingerprotein das sowohl die NF-kappaB Aktivität als auch den durch TNF vermittelten programmierten Zelltod (PCD – programmed cell death) unterbindet. TNF steigert dabei die TNFAIP3 mRNA Expression in allen Geweben erheblich (Lee et al. 2000). TNFAIP3/A20 ist ein, aus 790 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem einzigartigen Zink Finger Motiv. Das TNFAIP3 Transkript wird als eine primäre Antwort auf TNF (tumor necrosis factor) gebildet und beschützt die exprimierende Zelle in einer Vielzahl von Zelllinien vor der durch TNF induzierten Zytotoxizität. TNF aktiviert TNFAIP3 auf transkriptioneller Ebene. Krikos et al. beschreiben TNF ansprechende Elemente innerhalb des TNFAIP3 Promotors. Zudem reguliert TNFAIP3 die eigene Expression negativ (Krikos et al. 1992). Das Zink Finger Protein TNFAIP3/A20 ist ein durch TNF und Interleukin 1 induzierbares Protein das die NF-kappaB abhängige Expression negativ beeinflusst. Dabei zeigten Heyninck et al. dass TNFAIP3 die durch TNF eingeleitete nukleäre Translokation und DNA-Bindung von NF-kappaB nicht inhibiert. Auch folgende NF-kappaB Stationen werden nicht direkt inhibiert. TNFAIP3 unterbindet die NF-kappaB Genexpression durch eine TNF induzierte und RIP- oder TRAF2 vermittelte Reaktionsfolge, die von dem NIK-IkappaB Kinase Weg abweicht und trotzdem spezifisch in NF-kappaB Transaktivierung eingreift (Heyninck et al. 1999). TNFAIP3 ist ein potenter Inhibitor der NF-kappaB Signalisierung. Die Herabregulierung von NF-kappaB wird durch die kooperative Aktivität von zwei Ubiquitin bearbeitenden Domänen vermittelt. Die aminoternale Domäne von TNFAIP3 ist ein DUB (de-ubiquinating) Enzym der OTU (ovarian tumour) Familie, dieses entfernt Lysin-63 (K63) gebundene Ubiquitin Ketten von RIP (receptor interacting protein), letzterer ist ein essentieller Mediator des proximalen TNF Rezeptor 1 (TNFR1) Signalisierungskomplex. Die carboxyterminale Domäne von TNFAIP3 besteht aus 7 C2/C2 Zink Fingern. Diese fungieren durch die Polyubiquinierung von mit K46 gebundenen Ubiquitin Ketten als Ubiquitin Ligasen und bereiten somit RIP für die proteasomale Spaltung vor (Wertz et al. 2004). Im Weiteren wird

die Expression des TNFAIP3 Zink Finger Proteins durch die gleichen Agenzien induziert die NF-kappaB aktivieren. TNFAIP3 interagiert mit TRAF1 und TRAF2. Beide formen einen oligomeren Komplex der mit den zytoplasmatischen Domains verschiedener Mitglieder der TNF-Rezeptor Superfamilie in Verbindung steht. Sowohl TNF als auch CD40 sind Liganden des TRAF2, welcher wiederum NF-kappaB aktiviert (Song et al. 1996). Der TNF (tumor necrosis factor) ist ein Cytokin das u.a. nekrotische- und apoptotische Formen des Zelltodes einleitet. Die letztendlich zur Apoptose oder Nekrose führenden Mechanismen unterscheiden sich teilweise, und werden dementsprechend verschieden reguliert. TNFAIP3/A20 inhibiert durch TNF verursachte apoptotische Abläufe. In einer TNF sensitiven Fibroblasten Zelllinie schützte TNFAIP3 die Zelle vor einen TNF vermittelten nekrotischen Zelltod. Heyninck et al. schlussfolgern aus dieser Korrelation zwischen Apoptose- und Nekrosenregulation, dass TNFAIP3 an einem frühen Punkt der TNF-Signalisierung eingreift um so beide Typen des Zelltodes beeinflussen zu können (Heyninck et al. 1999). Heyninck De Valck et al. stellen die anti-NF-kappaB Wirkung von TNFAIP3 in Abhängigkeit von RIP oder TRAF2 dar. Da beiden Faktoren durch die beschriebenen Filtercharakteristika die Signifikanz in dieser Versuchsreihe fehlt ist auch nicht von einem, auf die NF-kappaB Expression, negativ wirkenden Einfluss auszugehen. Da weitere theoretische Ansätze derzeit fehlen verbleibt der Fold Change von 0,3 ($1/x = 2,9$) zunächst ohne weitere Interpretationen.

5.1.4 Weitere Faktoren mit angiogenem Potential

ECGF

Der Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) ist ein einkettiges Polypeptid bestehend aus 155 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 17kDa. Er zeigt signifikante Beteiligung am Prozess der Wundheilung und stellt einen Induktor der Angiogenese dar. Seine Bindung an Heparin potenziert die ursprüngliche biologische Aktivität und schützt FGF zudem vor der Proteolyse. Dieser Wachstumsfaktor zeigt sowohl chemotaktische- als auch mitogene Aktivität, und ist zudem für ein breites Spektrum von Zelltypen aus mesodermen- und neuroektodermen Linien ein äußerst potenter Induktor der DNA-Synthese (Burgess W.H. and Maciag T. 1989). Eine ursprüngliche Bezeichnung lautete acidic fibroblast growth factor (aFGF), diese stellte so dessen chemische Eigenschaften dar und ermöglichte eine Unterscheidung zum basic fibroblast growth factor. Durch die mitogenen Wirkung dieses angiogenen Wachstumsfaktor auf Endothelzellen wird er auch als endothelial cell growth factor (ECGF) beschrieben (Marciag et al. 1984). FGF1 stellt einen mitogenen Einfluß für

kultivierte Endothelzellen dar und wird in vivo als angiogener Wachstumsfaktor beschrieben (Thomas et al. 1983). FGF1 wird im Zusammenhang mit der Herzentwicklung, Vasodilatation, Gewebereparatur, Wundheilung und in pathologisch angiogenen Ereignissen wie der Neovaskularisierung von soliden Tumoren beschrieben (Takahashi et al. 1990). Das humane FGF-1 Gen umfasst über 100 kbp, es enthält drei proteinkodierende Exons und vier stromaufwärts liegende untranslatierte Exons. Diese werden als IA, IB, IC und ID bezeichnet (Myers et al. 1993; Payson et al. 1993). Die durch Spleißen generierbaren verschiedenen mRNA Formen von FGF1 werden als 1.A, 1.B, 1.C und 1.D bezeichnet. Die unterschiedlichen mRNA Formen werden gewebsspezifisch exprimiert. FGF-1 kann sowohl auf der Zelloberfläche- als auch im Inneren der Zelle agieren (Imamura et al. 1990; Wiedlocha et al. 1994,1996; Zhan et al. 1992). Dabei resultiert die Wachstumsfaktorbindung an der Zelloberfläche über Tyrosinkinaseaktivierung in einer intrazellulärer Aktivierung der Phospholipase C γ oder des MAP Kinase Stoffwechsels und so einer unmittelbaren Expression von Genen wie c-jun oder c-fos (Mason 1994; Szebenyi and Fallon 1999). Unter in vitro Verhältnissen wurde FGF1 und FGF2 durch die Protein Kinase 2 (CK2) phosphoryliert. Zudem zeigte sich, dass sich unter Anwesenheit von FGF1 und FGF2 die Autophosphorylierung der CK2 α steigert. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen dem mitogenen Potential einiger FGF1-Mutanten und deren Bindungsfähigkeit an CK2 α beobachtet. Die mögliche Beteiligung der CK2 an der FGF vermittelten Stimulation der DNA Synthese wird untersucht (Skiple Skjerpen et al. 2002). FGF1 wird als zytosolisches Protein synthetisiert (Burgess & Marciag 1989; Friesel and Marciag 1995) und kann bei entsprechenden Umwelteinflüssen sekretiert werden. Verschiedene Publikationen deuten an, dass exogenes FGF1 in der Lage ist das Zytosol und darauf auch den Nukleus zu erreichen und dass es sich dabei um einen mitogenen Einfluß innerhalb verschiedener Zellreihen handeln könne (Imamura et al. 1994; Prudowsky et al. 1996; Wiedlocha et al. 1994, 1995; Zhan et al. 1992). Der nukleäre Transport von FGF1 erfolgt in der G1 Phase des Zellzyklus (Zhan et al. 1993). Bouche et al. und Baldin et al. beschreiben die nukleäre Translokation eines FGF1 entsprechenden Proteins innerhalb des G1 Stadiums. Informationen über die zugrunde liegenden Mechanismen fehlen (Bouche et al. 1987 und Baldin et al. 1990). Die bisherigen Erläuterungen beschränken sich auf die Notwendigkeiten der PI3 Kinase Aktivität (Klingenberg et al. 2000) und eines vesikulären transmembranen Potentials (Malecki et al. 2002). Der nukleären Lokalisation folgt die Induktion der DNA-Synthese Zudem kann FGF1 an Cystein-reiche Rezeptoren auf dem Golgi Apparat binden ohne dass die biologische Funktion dieser Bindung bekannt ist. Für die intrazelluläre Fortbewegung und Funktion werden verschiedene Proteine wie das FGF1 intracellular binding protein (FIBP) und Mortalin benötigt. Synaptotagmin und S100A13 sind an der zellulären Freisetzung von FGF1 beteiligt und bilden dabei Komplexe mit FGF1 (Carreira et al. 1998; Tarantini et al. 1998). Das Problem an Versuchsreihen die die Translokation beschreiben sollen ist zum Ersten die Induzierbarkeit von endogenem FGF1 oder FGF2

durch exogen zugegebenes FGF (Cowan et al. 2003; Hurley et al. 1994; Peng et al. 2001). Zweitens stellt sich die mögliche Bindung an spezielle Rezeptoren die mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen als Risiko für eine falsch positive Translokation dar. Um Fehlinterpretation über tatsächliche Translokation über die Membran hinweg ins Zytosol und zum Nukleus oder über eine Induktion zu vermeiden ist eine Markierung des zugegebenen Wachstumsfaktors nötig. Die Farnesyl Transferase ist ein Enzym, das nur im Zytosol und im Nukleus vorkommt. Wird nun ein exogen zugeführtes Protein durch eine c-terminales Farnesyl Signal, die CaaX-Box, modifiziert und in das Zytosol oder den Nukleus übertragen kommt es zur Spaltung der Proteinmodifikation. Diese Reaktion wird als Indikator für den Übertritt über die Zellmembran betrachtet. Diese Strategie wurde erfolgreich zur Demonstration der Translokation von FGF1 und des Diphtherie Toxins verwendet. Zudem fand diese Strategie auch bei Studien betreffend der FGF2 Translokation Anwendung (Małeckı J. et al. 2004). PD-ECGF (FGF1) wird als eindeutig angiogener Wachstumsfaktor beschrieben (Dobbs et al. 2000; Li Z. et al. 2000; Yao L. et al 2002;) und das für unterschiedlichste solide Tumore wie z.B. Lungen-, Colorektale- oder renale Tumore (Dobbs et al. 2000). Diese Ausföhrung finden auch für u.a. ösophageale SCCs Gültigkeit (Li Z. et al. 2000). Der Fold Change von 0,5 ($1/x = 1,9$) von ECGF deutet auf eine annähernd doppelt so hohe Expression innerhalb der Tumorreinkultur im Vergleich zur Tumor-Endothelzellkultur hin. Dies lässt sich sinngemäß direkt in bestehende Modelle tumorangiogenetischer Prozesse eingliedern. Dementsprechend liegt der vaskulär unversorgten Tumorzelle nichts näher als die Anregung angiogenetischer Prozesse durch angiogenetische Faktoren wie ECGF.

FGFR4

FGF – Rezeptoren

Die FGF Rezeptoren werden durch vier Gene (Fgfr1 bis Fgfr4) kodiert; durch alternatives Spleißen von Fgfr1, -2 und -3 entstehen jedoch 7 Prototyp-Rezeptoren (Johnson D. et al. 1993; Mckeehan W.L. et al 1998). Jeder Rezeptorprototyp hat eine unterschiedliche Liganden-Bindungskapazität und Gewebszuordnung (Ornitz et al. 1996; Orr-Urtreger et al. 1993; Partanen et al. 1992; Peters et al. 1992, 1993; Stark et al. 1991). Die Rezeptoren bestehen aus einem externen Anteil der aus zwei bis drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen besteht, aus einem transmembranen Element das den externen Teil mit der zytoplasmatischen Tyrosin Kinase verbindet. Die proximalen Ig-ähnlichen Domänen werden auch als Loops bezeichnet und entsprechend der Ig-Domänen aufsteigend zur Membran hin nummeriert. Zwischen dem ersten und zweiten Ig-ähnlichem Loop liegt eine azide Box. Die Loops stellen die Bindungsdomänen für entsprechende Liganden dar. Durch die Bindung kommt es in Verbindung mit dem erwähnten Proteoglykan zur Dimerisierung des FGF-Rezeptor Komplexes, dieser resultiert lokal in einer Aktivierung der Tyrosin Kinase durch

Autophosphorylierung (Plontnikov et al. 1999). Daraufhin kommt es zur Bindung und Aktivierung von second messenger Proteinen die ihrerseits intrazelluläre Stoffwechselwege aktivieren (Klint P. et al. 1999). Entscheidend ist, dass durch alternatives Spleißen hervorgebrachte Isoformen sich nicht in der FGF-Bindungsdomäne-, sondern bezüglich anderer funktioneller- oder struktureller Aspekte unterscheiden (Dickson et al. 2000). Dementsprechend erhöht alternatives Spleißen die funktionelle Diversität (Ornitz D.M. 2004). Im Unterschied zu anderen Rezeptor Tyrosin Kinasen binden die FGF Rezeptoren nicht direkt an GRB2 (Initiator des MAPK-Stoffwechsels). Die Aktivierung des Ras/MEK/MAPK Weges erfolgt in diesem Fall durch die Phosphorylierung eines 90 kDa schweren Proteins das mit FRS2 bezeichnet wird (Klint et al. 1995; Kouhara et al. 1997). FRS2 fehlt eine SH2 Domäne aber es enthält eine Phosphotyrosin Bindungsdomäne (PTB), diese ermöglicht eine Bindung von FRS2 an die juxtamembranöse Region von z.B. FGFR1 (Xu et al. 1998). Aktivierung des FGFR1 führt so zur Tyrosinphosphorylierung, die wiederum eine Bindung an GRB2 und die Phosphotyrosin Phosphatase Shp-2 ermöglicht. Für die maximale Aktivierung der MAP Kinase ist die Bindung an beide Moleküle erforderlich (Hadari et al. 1998). Die genaue Lokalisation der Bindungsstellen für Wachstumsfaktoren wird für die zweite Hälfte des dritten Ig-ähnlichen Loops angegeben. Drei unterschiedliche Exons kodieren für drei unterschiedliche Varianten dieser Region: IIIa, IIIb und IIIc. Die IIIa Sequenz ist ausschließlich im FGFR1 enthalten (Johnson et al. 1991), während IIIb und IIIc sowohl in FGFR1, FGFR2 (Johnson and Williams 1993) als auch in FGFR3 vorhanden sind. Studien über das Bindungsverhalten der einzelnen Rezeptoren belegen der IIIc Variante ein breites Spektrum von Liganden (Johnson and Williams 1993; Ornitz et al. 1996). So waren FGFR1-4 mit der IIIc Variante in der Lage eine uPA (urokinase-type plasminogen activator) Hochregulierung zu transduzieren (Rusnati et al. 1996). In solche Zellen, in denen FGFR-Derivate exprimiert werden wird eine Aktivierung von Stat1 und-3 beobachtet. Zudem stimulieren FGRF-Derivate die Aktivierung der PI3-Kinase. Hart et al. zeigten, dass neben FGFR1 und FGFR3 auch FGFR4 die zelluläre Transformation induzieren kann, wobei Hart et al. darauf hinweisen, dass die Stat Aktivierung eine entscheidende Komponente der FGFRs auf ihrem Weg zum Onkogen sind (Hart et al. 2000). Streit et al. untersuchten die Expressionsmuster und die klinische Signifikanz des Gly/Arg Polymorphismus (388) in HNSCCs der oralen Kavität und des Oropharynx. Daraus folgt zusammengefasst, dass eine hohe Expression des FGFR4 Arg388 Allels mit einer reduzierten Überlebensrate und einem fortgeschrittenem Tumorstadium einhergeht. Die Expression des Gly388 Allels zeigt keine Beziehung zur Krankheitsprogression. FGFR4 wird somit in Abhängigkeit der Expression und der Anwesenheit des Arg388 Allels für humane HNSCCs als diagnostischer Marker und als potentielles Ziel therapeutischer Intervention beschrieben (Streit et al. 2004). Die von Streit et al. dargestellte hohe Expression von FGFR4 in HNSCCs wird durch die durchgeführte Untersuchung bestätigt. Der Fold Change von 0,3 entspricht einer 3,2fach erhöhten Expression in der Tumorreinkultur. Das zusätzliche Vorliegen eines Arg388 Allels

kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Interessant ist dabei der Zusammenhang zur Stat-Aktivierung, der weitere transkriptionelle Prozesse anregt, die sich wiederum positiv auf zellproliferative Abläufe auswirken.

VHL

Das von Hippel-Lindau Syndrom (VHL) ist ein dominant vererbtes, für verschiedene maligne und benigne Tumore prädisponierendes Syndrom. Die Basis dieser familiären Erbschaft ist eine Keimbahnmutation dieses Gens. Das durch dieses Gen kodierte Protein ist eine Komponente eines Proteinkomplexes zu dem außerdem Elongin B, Elongin C und Cullin 2 zuzuordnen sind. Zusätzlich zeigt Proteinkomplex Ubiquitin Ligase E3 Aktivität auf. Dieses Protein ist an der Ubiquitinierung und der Spaltung des hypoxia-inducible-factor (HIF) beteiligt. HIF ist ein „zentraler“ Transkriptionsfaktor, der Genexpressionsregulation durch Sauerstoff. Die RNA Polymerase II Untereinheit POLR2G/RPB7 wird ebenfalls als Reaktionspartner oder Ziel dieses Proteins beschrieben. Alternative Spleißvarianten bringen unterschiedliche Isoformen hervor. Unter hypoxischen Bedingungen steigt die HIF-1alpha Expression als Resultat einer reduzierten Ubiquitinierung und Spaltung. Und da wie gesagt VHL und p53 neben anderem HIF-1alpha ubiquinieren steigert deren Inaktivierung in Tumorzellen die Halbwertszeit für HIF-1alpha (Laughner et al. 2001). Eine Inaktivierung des von Hippel-Lindau (VHL) Tumorsuppressorgenproduktes pVHL entsteht aus der vererbten VHL Erkrankung und tritt sporadisch mit Magenkrebs auf. pVHL ist mit den Elonginen B/C, Cul2 und Rbx1 in einem Multiproteinkomplex enthalten und ist somit an der Bildung einer E3 Ubiquitin Ligase, welche als VEC bezeichnet wird, aufgebaut. Dieses modulierende Enzym reagiert mit der alpha Untereinheit des „hypoxia inducible factor“ (HIF-1alpha) um diesen Ubiquitin-vermittelt abzubauen. Demzufolge produzieren solche Tumorzellen denen das funktionstüchtige pVHL fehlt ein Übermaß an durch HIF induzierte Proteine, wie z.B. VEGF. Somit wird das angiogene Potential erkennbar und umso deutlicher wird es wenn man sich die Hypervaskularität in VHL-assoziierten Neoplasmen vor Augen hält. Im Weiteren steht pVHL mit dem Zellzyklus, der Differenzierung, der Regulation der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und der Gewebsinvasivität in Verbindung (Leung et al. 2002). Der Fold Change von 0,4 deutet auf eine 2,7fache Expression in der Tumorreinkultur hin. Dieses Ergebnis entspricht nicht der Erwartung. Einfach dargestellt entspricht viel VHL einer quantitativ hohen Spaltung von HIF-1alpha und folglich einer vergleichsweise geringen Induktion weiterer pro-angiogener Faktoren. Die Erklärungsversuche dieses Ergebnisses bleiben derzeit Mutmaßungen. Unter Umständen ist von einem falsch-positivem Ergebnis auszugehen.

Angiogenin (Ang)

Humanes Angiogenin ist ein einkettiges Polypeptid, das sowohl in konditioniertem Tumorzellmedium als auch in normalem Serum vorliegt. Dieser Induktor der Neovaskularisierung wird durch verschiedene humane Tumorzelltypen sekretiert und erscheint entscheidend für dessen Wachstum (Leonidas et al. 1999, 2002; Olson et al. 1995; Sheen-Chen et al. 2000). Das sekretierte Angiogenin bindet spezifisch an Endothelzellen (Badet et al. 1989) und löst in diesen second messenger Antworten aus. Das besondere an Angiogenin unter den angiogenen Faktoren ist dessen katalytische Leistung als ribonukleolytisches Protein, dabei spaltet Angiogenin Pyrimidine vorzugsweise am 3'Ende und folgt einem transphosphorylierendem/hydrolysierendem Mechanismus. Angiogenin fungiert demnach als tRNA spezifische Ribonuklease, die auf der Oberfläche von Endothelzellen Aktin bindet. Direkt auf die Bindung folgen die Endozytose und die nukleäre Translokation. Hieraus ergibt sich eine Begünstigung der endothelialen Invasivität im Rahmen der Blutgefäßformation. Angiogenin beeinflusst die Protein Synthese durch spezifische Hydrolyse zellulärer tRNAs und induziert wahrscheinlich so die Vaskularisierung in normalen und malignen Geweben. Aus den vorliegenden Datentabellen geht für Angiogenin ein Fold Change von 0,6 ($1/x = 1,7$) hervor. Die somit in der Tumorreinkultur erhöhte Expression bestätigt die obigen Ausführungen, unterstreicht zudem das Potential Angiogenins zur Angiogeneseinduktion und deutet letztendlich auch auf dessen Relevanz für diese Tumorzelllinie hin. Weitere Untersuchungen die die Signifikanz dieses Faktors darstellen fehlen bisher.

5.2 Kokulturell erhöhte Expression

Durch die heterogene Verteilung der Moleküle in dieser Datengruppe ist eine Gliederung nach Molekülfamilien nicht sinnvoll. Insofern sind die folgenden Moleküle ausnahmslos in der Tumor-Endothelzellkokultur erhöht exprimiert und sind entsprechend ihrer Stoffwechselfunktion (Panther Pathway) gegliedert.

5.2.1 Rezeptoren

RCN3 (FCGRT)

FCRN ist ein Heterodimer bestehend aus einer alpha Kette und Beta(2)-Mikroglobulin (beta(2)m) und unterscheidet sich insofern von anderen IgG Fc Rezeptoren, dass es strukturelle Ähnlichkeiten zu MHC-Klasse I Molekülen aufweist. Verschiedene der FcRn-Funktionen wurden in Beta(2)-Mikroglobulin defizienten Mäusen beobachtet (Zijlstra et al. 1990), woraus folglich suggeriert wird, dass die alpha Kette ohne das beta(2)m keinen funktionellen Rezeptor bilden kann. Eine Expressionsuntersuchung der humanen FcRn alpha Kette alleine oder in Kombination mit beta(2)m in humanen Melanoma FO-1 Zellen stellt die Notwendigkeit von beta(2)m für eine zelloberflächliche Expression des FcRn dar. Weiter heißt es, dass bei Abwesenheit von beta(2)m die alpha Kette im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird. Die beta(2)m Defizienz geht im Vergleich mit einem nativen FcRn mit einer reduzierten IgG Bindung einher. Folglich ist der Zusammenschluss von beta(2)m und der alpha Kette einerseits für den Transport vom ER zur Zelloberfläche als auch für eine effiziente pH-abhängige IgG Bindung entscheidend (Praetor A. et al. 2002). FCGRT/FcRn ist ein MHC Klasse I ähnlicher Rezeptor, der an der Bindung und den Transport von IgG, sowohl in- als auch durch die Zelle, beteiligt ist. Dabei bindet humanes FCGRT im Gegensatz zu dem FCGRT von Mäusen streng spezifisch und zeigte, dass solche Anteile, die sich in der Umgebung der Interaktionsstelle auf der alpha2 Helix von FCGRT befinden eine signifikant indirekte Rolle für die FCGRT-IgG Interaktionen besitzen (Zhou J. et al. 2005). FcRn spielt eine zentrale Rolle innerhalb der Regulierung des IgG Serumlevels. Durch die Expression von FcRn auf Endothelzellen, sind diese Zellen an der Aufrechterhaltung eines IgG Levels beteiligt (Ober R.J. et al. 2004). Das humane FCGRT vermittelt den bidirektionellen Transport von IgG über die mukosale Barriere (Claypool S.M. et al. 2004). IgG Transport in- und durch Zellen ist essentiell für die humorale Immunität. Durch biochemische- und in vivo Analysen, ist es möglich dem MHC-Klasse I ähnlichen Rezeptor FCGRT eine zentrale Beteiligung an der Transzytose von IgG zuzusprechen

(Ober R.J. et al. 2004). RCN3/FCGRT wurde in der Tumor-Endothelzell Kokulturell 1,9fach stärker exprimiert. Beta(2)-Mikroglobulin wird allerdings in der vorliegenden Datentabelle nicht aufgeführt, was darauf schließen lässt, dass auch bei erhöht exprimierter alpha-Kette die Ausbildung eines funktionstüchtigen Membranrezeptors ausbleibt. Das Fehlen des bidirektionellen IgG Transportes resultiert in einer Beeinträchtigung der humoralen Abwehr.

ESDN (CLCP1)

Die Membrangebundene Isoform I ist ein Rezeptor, der in die Entwicklung des kardiovaskulären Systems- und in angiogenetische Prozesse verwickelt ist und zeigt zudem Beteiligung an der Formation neuronaler Schaltungen und der Organogenese außerhalb des Nervensystems. Es vermittelt die chemorepulsive Aktivität der Semaphorine. Die Isoform I bindet an Semaphorin 3a, die PLGF-2 Isoform von PGF und die VEGF-165 Isoform von VEGF und VEGF-b. Die Koexpression mit KDR resultiert in einer gesteigerten VEGF-165-Bindung an KDR und zudem wird dann eine gesteigerte Chemotaxis beschrieben. Die Isoform I wirkt möglicherweise regulierend auf die VEGF induzierte Angiogenese. Die lösliche Isoform II bindet an VEGF-165 und scheint dessen Bindung an die Zielzelle zu inhibieren. Ebenso scheint es durch Sequestrierung von VEGF-165 die Apoptose zu induzieren. Zudem wird die Isoform II die Bindung an verschiedene Mitglieder der Semaphorinfamilie zugesprochen. Die Expression der Isoform II zeigt einen negativen Einfluss auf die Blutgefäßanzahl und deren Integrität. Das CLCP1 Gen kodiert für ein 775 Aminosäuren großes Protein dass nicht nur in LNM35 Lungenkrebszelllinien eine Assoziation einer hohen Expression mit einem metastatischen Phänotyp zeigt (Koshikawa K. et al. 2002). ESDN ist ein Typ I Trans-Membranprotein mit der längsten bekannten spaltbaren sekretorischen Signalsequenz in Eukaryonten. ESDN enthält eine CUB Domäne und eine „Coagulation Factor V/VIII Homology“ Domäne. ESDN wird in verschiedensten Geweben exprimiert; wird aber in höchstem Maße in kultivierten VSMCs („vascular smooth muscle cells“) exprimiert. ESDN wird in vitro in PDGF-BB („platelet derived growth factor-bb“) stimulierten Zellen positiv exprimiert und in vivo in der Neointima der Ballon geschädigten Karotisarterie ebenfalls erhöht exprimiert. Letztendlich kommt ESDN in Betracht, entscheidend an der Regulation des vaskulären Zellwachstums beteiligt zu sein zudem werden ihm verschiedene Funktionen in weiteren Geweben, einschließlich des nervalen Systems, ähnlich den Neurolipinen zugesprochen (Kobuke K. et al. 2001). Nach Kobuke et al. führt eine erhöhte Regulation von ESDN in der Neointima in VSMCs zu einer Transformation ausgehend vom ruhenden- zum proliferierenden Phänotyp hin und letztendlich wieder zum ruhenden Phänotyp zurück; daraus folgend wird eine funktionelle Beteiligung von ESDN an der Wachstumsregulation beschrieben. Dabei wird die ESDN mRNA Expression positiv und spezifisch durch PDGF-BB Stimulation kontrolliert. ESDN wird in verschiedensten Organen exprimiert, in höchstem Maße in kultivierten glatten

Muskelzellen der Aorta, jedoch nicht in allen Blutgefäßen (Kobuke K. et al. 2001). Dieses Molekül wurde kokulturell 1,8fach stärker exprimiert. Dieser Wachstumsregulator vermag in VSMCs eine Transformation vom ruhenden in den proliferierenden Phänotyp auszulösen. Ob diese Wachstumsbeeinflussung ausschließlich auf endothelialer Ebene vorliegt ist unklar. Möglicherweise handelt es sich hierbei auch um einen endothelial ausgelösten Mechanismus der die Proliferation der Tumorzelle selbst verändert. Auch die Assoziation der Expression dieses Faktors mit dem metastatischen Potential anderer Tumorentitäten weckt weiteres Interesse.

PLAUR

Dieses Gen kodiert für den Rezeptor des Urokinase Plasminogen Aktivators (u-PA) was schlussfolgernd seine Funktion während der Lokalisierung und Entstehung einer Plasmin Formation darstellt. Somit kommt diesem Rezeptor eine Beteiligung an verschiedensten normalen- und pathologischen Abläufen zu; diesen Prozessen ist die zelloberflächliche Aktivierung des Plasminogens - und die lokalisierte Spaltung extrazellulärer Matrix gemein. Der Rezeptor bindet sowohl an das Proprotein als auch an die vollentwickelte Form von u-PA und ermöglicht so die Aktivierung des Rezeptor gebundenen Por-Enzyms durch Plasmin. Das PLAUR (auch bekannt als „Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor“) Protein lässt eine transmembranöse oder zytoplasmatische Domäne vermissen und ist möglicherweise durch einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Teil in der Plasmamembran verankert. Durch einige Zellformen wird auch eine lösliche Form dieses Proteins hergestellt. PLAUR vermittelt also die Proteolyse unabhängige Signaltransduktion der aktivierenden Effekte von u-PA und stellt somit eine zentrale Funktion in der perizellulären Plasminogenaktivierung dar (Casey et al. 1994). Da uPA PLAUR in eine inaktive Form spaltet, wird PLAUR als negativer Rückkopplungsmechanismus betrachtet. PLAUR besteht aus 313 Aminosäuren, einschließlich von 28 Cysteinanteilen in einem Muster von drei homologen Wiederholungen (Casey et al. 1994). PLAUR ist ein gut beschriebener Rezeptor für Matrix spaltende Proteasen, die an der Tumorzellinvasion beteiligt sind (Blasi and Carmeliet 2002; Sidenius and Blasi 2003). Zudem wird PLAUR eine entscheidende Rolle für die Wundheilung zugesprochen (Akiri et al. 2003; Gum et al. 1998; Ignar et al. 1998; Kohonen-Corish M.R. et al. 1996; Nishihira et al. 2003; Nozaki et al. 1998; Sidenius and Blasi 2003). Woraus wiederum geschlussfolgert wird, dass die koordinierte Induktion des Wundheilungsprogrammes in Karzinomen die Tumorzellinvasion und Metastasenbildung positiv beeinflusst. Das Phänomen der tumor-assoziierten Proteolyse ist längst als ein ausschlaggebender Schritt während der Tumorprogression bekannt (Fuchs et al. 2003). PLAUR ist ein spezifisch zelloberflächlicher Rezeptor für seinen Liganden u-PA, welcher wiederum die Formation von Plasminogen zu Plasmin katalysiert, somit eine proteolytische Kaskade generiert, resultierend in dem lokalisierten Zusammenbruch der extrazellulären

Matrix – dies stellt eine Schlüsselposition für metastatische Prozesse dar. Die PLAUR Promotor Region ist definiert für ein 188 bp Fragment zwischen -141 und +47 entsprechend der Transkriptionsstartseite. Der PLAUR ist ein schwer glykosyliertes Protein der Zelloberfläche und bindet spezifisch und mit hoher Affinität an die Serin Protease Urokinase. Das PLAUR Gen besteht aus 7 Exons und ist auf Chromsom 19q13 lokalisiert. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren (Sp1, Ap-2, NF-kappaB und zwei Ap-1) an die PLAUR Promotorregion aktiviert die basale Transkription dieses Gens. Die transkriptionelle Aktivierung der PLAUR Promotor Region kann durch Bindung diverser Transkriptionsfaktoren (Sp1, Ap-1 und -2, NFKappaB) induziert werden (Fuchs et al. 2003). Es besteht eine eindeutige Korrelation zwischen der PLAUR Expression und dem invasiven Phänotypus einer Krebszelle. Dementsprechend wird PLAUR eine entscheidende Beteiligung an den Prozessen der Invasion und Metastasierung zugesprochen (Gellert et al. 2004; Reuning et al. 2003; Wang Y. 2001). Eine Blockierung der PLAUR (uPAR) Expression in humanen epidermalen Karzinoma-Zellen beeinflusst zum einen die Invasivität der Tumorzellen negativ und initiiert außerdem nach Yu W. et al einen Übergang in das Stadium des Tumorschlafes, wie es auch während metastatischer Prozessen zu beobachten ist. Dabei wird das zelluläre Überleben mit einem Ausbleiben progressiven Wachstums als Charakteristika einer solchen Hemmung dargestellt (Yu W. et al. 1997). Lo Muzio beschreibt PLAUR als Ergebnis einer Transaktivierung durch Beta-Catenin, assoziiert mit TCF (Lo Muzio 2001). Kugler M.C. et al. beschreiben PLAUR als cis-agierenden Integrin Liganden. Dementsprechend wird PLAUR neben den bisher beschriebenen Eigenschaften auch das Potential zu Interaktionen mit Integrinen zugesprochen. Dabei wird geschildert, dass unter in vivo Bedingungen sowohl die Integrin Funktionen- als auch die Zellmigration negativ beeinflusst werden wenn die PLAUR-Integrin Interaktionen beeinträchtigt werden (Kugler M.C. et al. 2003). Die immunohistochemische Untersuchung des u-PA System (u-PA, Plaur, PAI-1 und II) in 34 verschiedenen primären oralen Plattenepithelkarzinomen (squamous cell carcinomas (SCCs)) zeigte positive Raten für alle untersuchten Faktoren. Dabei korrelierte auch die PLAUR Expression mit dem Modus der Invasion. Insbesondere waren dabei die u-PA- und PLAUR-positiven Proben entsprechend des klinischen Vergleiches höchst invasiv. Schlussfolgernd wird somit suggeriert, dass dem u-PA System auch für orale SCCs eine entscheidende Bedeutung während invasiver und metastatischer Prozesse zukommt. Was das u-PA System daraus folgend zu einem potenten Hilfsmittel in der Abschätzung des klinischen Verlaufes und somit der weiteren Prognose für orale Krebserkrankungen macht (Nozaki et al. 1998). Die Bedeutung dieses tumorreinkulturell 1,8fach weniger stark exprimierten Rezeptors ist somit sowohl für Invasion als auch für die Metastasierung deutlich geworden. Dieser Rezeptor begünstigt zum einen die Tumorzellinvasion durch seine Affinität zu matrixspaltenden Proteasen (Blasi and Carmeliet 2002; Sidenius and Blasi 2003) und beeinflusst zudem durch die koordinierte Induktion des Wundheilungsprogrammes die Metastasierung positiv (Akiri et al. 2003; Gum et al. 1998;

Ignar et al. 1998; Kohonen-Corish M.R. et al. 1996; Nishihira et al. 2003; Nozaki et al. 1998; Sidenius and Blasi 2003). Die Korrelation zwischen der PLAU-Expression und einem invasivem Phänotypus (Gellert et al. 2004; Reuning et al. 2003; Wang Y. 2001) wurde nicht nur für orale Plattenepithelkarzinome beschrieben (Nozaki et al. 1998). Woraus sich schlussfolgernd eine erhebliche Relevanz für prognostische Aussagen ergeben kann.

KIR3DL1/KIR3DS1 (NKB1B)

Killer-cell Ig-like receptors (KIR) sind strukturell und funktionell unterschiedlich, ermöglichen aber den natürlichen Killerzellen (NK) die individuelle Expression der HLA Klasse I Moleküle zu überprüfen, dieser Mechanismus ist häufig während Infektionen oder auch Tumorerkrankungen verändert. Multiple Ereignisse von non-reziproker Rekombination führten zu einer raschen Anhäufung mehrerer unterschiedlicher KIRs. Untersuchungen von Gomez-Lozano et al. zeigten, dass ca. 4,5% der Individuen einer Kaukasoiden Population ein rekombinantes Allel von KIR3DP1 (offizielle Bezeichnung: KIR3DP*004) tragen, dieses wiederum ist eng mit der Genduplikation von KIR3DP1, KIR2DL4 und KIR3DL1/KIR3DS1 assoziiert (Gomez-Lozano N. et al. 2005). Die humane KIR Rezeptor Familie besitzt entweder zwei oder drei Immunglobulin ähnliche Domänen, und wird dementsprechend mit dem Suffix 2D oder 3D bezeichnet (Long EO. et al. 2001). Die inhibitorischen Isoformen dieser Rezeptorfamilie haben eine lange zytoplasmatische Domäne (dementsprechender Suffix: L), diese enthält zwei ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs), ist spezifisch für verschiedene HLA/MHC Allele und zeigt zudem eine Art Selbsttoleranz. Im Allgemeinen erkennt KIR2D HLA-C während KIR3D HLA-A und -B erkennt (Long E.O. et al. 2001). Zudem verfügt die KIR Rezeptor Familie über stimulatorische Isoformen. Entsprechend der inhibitorischen Isoformen enthalten auch die stimulatorischen Isoformen entweder zwei oder drei Immunglobulin Domänen und werden ebenfalls dementsprechend mit KIR2D oder KIR3D bezeichnet (Long EO. et al. 2001). Der Unterschied liegt in der zytoplasmatischen Domäne: diese fällt bei den stimulatorischen Isoformen kürzer aus und wird mit einem „S“ als Suffix dargestellt. Zudem sind KIR2DS/KIR3DS mit dem ITAM enthaltenden DAP12 assoziiert, durch das sie zugleich auch signalisieren (Lanier et al. 1998). Diese Isoformen erkennen ebenfalls HLA-A bis -C. KIR3DL1 und KIR3DS1 werden nach Wilson MJ. Et al. unabhängig voneinander sekretiert was suggeriert, dass es sich bei beiden um Allele handelt (Wilson M.J. et al. 2000). Die humanen KIR Haplotypen sind durch den Geninhalt verschiedenartig (Uhrberg M. et al. 1997; Wilson, M.J. et al. 2000) und stellen zudem allele Polymorphismen (Shilling, H.G. et al. 2002). Solche Gene, die für die inhibitorischen HLA-C Rezeptoren (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3) kodieren, befinden sich im centromeren Part des Locus, wohingegen sich die Gene für die HLA-B- bzw. HLA-A inhibitorischen Rezeptoren (KIR3DL1 bzw. KIR3DL2) auf den telomeren Anteilen befinden. Die KIR Haplotypen werden entsprechend den Genen die sie enthalten in zwei Gruppen (A

und B) eingeteilt (Uhrberg M. et al. 1997). Die einfachere Gruppe A der Haplotypen zeigt eine gemeinsame Organisation von sieben Genen und zwei Pseudogenen, diese Gruppe zeichnet sich durch ihre Allelkombinationen aus. Die Gruppe B der Haplotypen zeichnet sich einen variableren Geninhalt aus, der zu den schon in der Gruppe A enthaltenen Genen mindestens eines von weiteren fünf (für die Gruppe B) spezifischen Genen enthält. Zu dieser Gruppe gehören: KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3 und KIR2DS5. KIR2DL2 (ein Allel von KIR3DL3) und KIR3DS1 (ein Allel von KIR3DL1) sind ebenfalls spezifisch für die Gruppe B der Haplotypen. Die KIR Familie ist insofern von Interesse, da individuelle Mitglieder dieser Familie spezifisch an Untergruppen von HLA Allelprodukte binden (Mandelboim et al. 1996; Mitwin et al. 1994; Winter et al. 1997). Sie ermöglichen der Population von natürlichen Killerzellen (NK) Veränderungen im HLA Expressionsmuster zu erkennen und erklären so das Vermögen der NKs ihre Funktion innerhalb der Immunüberwachung wahrzunehmen. Tumorzellen und einige Virusinfizierte-Zellen können verschiedene HLA Klasse I Moleküle reduziert exprimieren (Cohen et al. 1999; Garrido et al. 1997; Lopez-Botet et al. 2001). Einige dieser HLA-expressiv reduzierten Formen beeinträchtigen die Reaktionen der T-Zellen, was durch die Spezifität inhibitorischer NK Rezeptoren für kleine Gruppen der HLA Klasse I Allotypen erklärt wird (Stewart et al. 2003). Die KIR Gene haben ein einzigartiges Expressionsmuster. Die meisten KIR Loci, werden auf eine stochastische Art und Weise auf unterschiedliche NK Klone verteilt exprimiert. Dementsprechend bildet jede NK-Zelle nur eine Untermenge der verfügbaren KIR Gene aus (Husain et al. 2002; Litwin et al. 1994; Moretta et al. 1990; Valiante et al. 1997). Die Expression eines KIR wird auf transkriptioneller Ebene bestimmt und ist sowohl in NK Klonen als auch NK Populationen stabil (Gumperz et al. 1996; Litwin et al. 1994; Moretta et al. 1990; Shilling et al. 2002; Valiante et al. 1997). Die Untersuchung der Genetik des KIR Clusters brachte interessante Ergebnisse bezüglich der Regulation der KIR Expression hervor. Die KIR Gene sind, mit einem durchschnittlichen Abstand von 2kb zwischen den meisten Genen, relativ eng gepackt und sind auch dem Chromosom 19q13.4 lokalisiert. Die KIR Gene zeigen hohe Ähnlichkeiten und sind fortlaufend in einem Kopf-zu-Schwanz Muster angeordnet. Der KIR3DL1 Promotor zeigt zwar ein eher geringes Expressionsausmaß ist dabei jedoch auch in einem weiteren Spektrum von Geweben vertreten (Wilson et al. 2000). KIR3DL1 wurde tumorkokulturell 1,7fach stärker exprimiert als in der Tumorreinkultur. Es liegen keine Studien vor, die einen direkten Zusammenhang zwischen einer KIR3DL1/KIR3DS1 Expression zu oralen Plattenepithelkarzinomen untersuchten. Das Ergebnis ist möglicherweise als ein Resultat der von Gomez-Lozano et al. beschriebenen Polymorphismeninzidenz von KIR3DP1 innerhalb der kaukasoiden Population zu verstehen. Diese Polymorphismen führen auch zu einer Genduplikation von KIR3DL1/KIR3DS1.

PTGIR Prostaglandin I₂ (prostacyclin) receptor (IP)

Das durch dieses Gen kodierte Protein ist ein Mitglied der G-Protein-gekoppelten Rezeptor Familie I und ist der Rezeptor für Prostacyclin. Prostacyclin ist ein Hauptprodukt der Cyclooxygenase innerhalb des makrovaskulären Endotheliums, Prostacyclin löst eine potente Vasodilatation aus und inhibiert die Plättchenaggregation durch Bindung an die jeweiligen Rezeptoren. Für Prostacyclin wird-, ebenso wie für TGF- β und NO, eine endotheliale Sekretion mit darauf folgendem antimitogenen Effekt auf die benachbarten SMCs (smooth muscle cells) in normalen Gefäßen beschrieben (Cucina et al. 1998; Topper et al. 1996). Eine Untersuchung von Prostacyclin auf SMCs (early-passage murine aortic SMCs) zeigte, dass Prostacyclin den Übergang in die S-Phase inhibiert. Dies geschieht zum einen durch die Verhinderung der Phosphorylierung so genannter „pocket proteins“ und zum zweiten durch eine Hemmung der CREB/phosphoCREB (cAMP response element-binding protein) Bindung an den Cyclin A Promotor (Kothapalli D. et al. 2003). Diese Effekte werden durch den Prostacyclin Rezeptor IP vermittelt. Eine IP Deletion in Mäusen führte zu einer erhöhten proliferativen Antwort auf eine Gefäßverletzung (Cheng Y. et al. 2002). Prostanoid Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die durch eine Reihe von lokal wirkenden hormonellen Substanzen in den initialen Abläufen zwischen der Cyclooxygenase 1 und -2 mit Arachnoidensäure eingreifen (Breyer R.M. et al. 2001; Narumiya S. and Fitz Gerald G.A. 2001) Diese lokalen hormonellen Substanzen sind: Prostaglandin E₂ (PGE₂), Prostaglandin D₂ (PGD₂), Prostaglandin F_{2a} (PDF_{2a}), Thromboxane A₂ (TxA₂) und Prostacyclin (PGI₂), diese werden als Prostanoiden bezeichnet. Jedes dieser Prostanoiden greift auf seinen eigenen Rezeptor zurück, diese werden dementsprechend als EP, DP, FP, TP und IP bezeichnet. Es werden für den EP-Typ vier Untertypen (EP1, EP2, EP3 und EP4) beschrieben, für den DP-Typ bestehen hingegen zwei Untertypen (1 und 2). Alle weiteren Prostanoiden haben keine Untertypen. Die Untertypen entsprechen den Produkten separater Gene. Somit ergeben sich aus alternativem Spleißen Isoformen für EP1, EP3, FP und TP Rezeptoren (Pierce K.L. and Regan J.W. 1998). Allein schon diese Schilderungen lassen von einer deutlichen physiologischen Diversität der Prostanoiden ausgehen. Dieses funktionelle Spektrum erstreckt sich von der Beteiligung der Prostanoiden an der Schmerzentstehung über die lokalen Entzündungsreaktionen bis hin zu Effekten der Prostanoiden auf das vaskuläre-, reproduktive-, knöchernen- und Immunsystem (Narumiya S. et al. 1999). In einer Untersuchung des Prostacyclin Synthase Gens in Ballongeschädigten arteriellen Modellen von Ratten wird suggeriert, dass eine gesteigerte vaskuläre Prostaglandin I₂ Formation zu einer beschleunigten Bedeckung endothelialer Beschädigung und zu einer reduzierten Bildung der Neointima kommt (Todaka et al. 1999). Dieser Rezeptor wurde kokulturell um den Faktor 1,7 erhöht exprimiert. Grundsätzlich lässt sich die über den Prostacyclin Rezeptor vermittelte Vasodilatation und Plättchenaggregation gut in den vorliegenden Kontext einordnen. Denn die Tumorendothelzellkultur simuliert

unter in vitro Bedingungen auch Prozesse die mit der Invasion und Metastasierung vergleichbar sind. Wobei die Aufrechterhaltung einer vaskulären Zirkulation auch durch die Gefäßweitstellung sowie die Verhinderung der Thrombenbildung gewährleistet wird. Die definitive Bedeutung der Expression dieses Rezeptors auf der Tumorzelle bleibt dennoch offen, da die daraus folgenden Regulationen möglicherweise nicht absolut geklärt sind.

5.2.2 Signalmoleküle

DKK1 dickkopf homolog 1 (*Xenopus laevis*)

Dieses Gen kodiert für ein Mitglied der Dickkopf Familie. Hierbei handelt es sich um ein sekretiertes Protein mit zwei Cystein reichten Regionen, es ist durch seine inhibierende Wirkung auf den WNT-Stoffwechselweg an der embryonalen Entwicklung beteiligt.

Die Wnt Signalisierung besitzt einen „regelrechten“ („canonical“) und einen alternativen („non-canonical“) Signalisierungsweg. Als „canonical“ wird der zytosolische Verlauf über die Beta-Catenin Stabilisierung- hin zur nukleären Translokation führende und in der Genregulation endende Ablauf bezeichnet. Dieser Weg agiert als Ko-Aktivator für die T-Zell Faktor (TCF) Proteine. Alternativ dazu endet der „noncanonical pathway“ in einer Aktivierung von Rho, Rac, JNK und PKC oder in einer Modulation des Calcium Levels. Dickkopf 1 (Dkk1) kodiert für einen sekretierten Wnt Antagonisten der über die Bindung an LRP5/6 seine eigene Endozytose induziert und eine Hemmung den „canonical pathways“ einleitet (Gonzalez-Sancho JM. et al. 2005). Wnt Liganden binden an- und signalisieren über die Mitglieder der „frizzled family“ von sieben transmembranen Rezeptoren und über die „low-density lipoprotein receptor proteins“ (LRPP) LRP5 und LRP6, welche als Wnt Ko-Rezeptoren fungieren (Mao J. et al. 2001; Pinson K. I. et al. 2000; Tamai K. et al. 2000; Wehrli M. et al. 2000). Diese Signalisierung wird durch Heparansulfat Proteoglykane moduliert (Perrimon N. et al. 2000). Zudem wird die Wnt Signalisierung durch verschiedene extrazelluläre Antagonisten, wie die Frizzled-related Proteins, Cerberus und WIF-1 reguliert. Diese Inhibitoren binden Wnt Liganden und beschränken so deren Signalisierung innerhalb eines Gewebes. Zudem gehört zu der Gruppe der Wnt-Antagonisten, die Dickkopf (Dkk) Familie. Dabei interagieren die Dkks mit den Wnt Ko-Rezeptoren LRP5 und LRP6 (Bafico A. et al. 2001; Mao B. et al. 2001; Semenov M. et al. 2001) wobei Dkk1 die Wnt Signalisierung durch Störung der Bindung von LRP6 an den Wnt/frizzled Liganden-Rezeptor Komplex inhibiert. Dickkopf (Dkk) Proteine sind extrazellulären Modulatoren der Wnt Signalisierung mit hoher Interaktionsaffinität zu LRP 5 und -6. So konnte mehrfach gezeigt werden, dass Dkk1 durch die Bindung an LRP5/6 spezifisch die Wnt/beta-catenin

Signalisierung inhibiert (Bafico A. et al. 2001; Mao B. et al. 2001; Semenov M. et al. 2001). Dkks enthalten zwei Cystein reiche Domänen, diese sind durch eine Spacer Region mit variabler Länge getrennt. Beide Domänen sind dabei in allen vier Mitgliedern der Dkks gut erhalten. Im Vergleich zeigen Dkk1 und Dkk2 in ihrer n-terminalen Cystein reichen Region 50%- und in ihrer c-terminalen Cytsein reichen Region 70%-Übereinstimmung. Die Struktur der c-terminalen Domänen zeigt eine geringfügige Ähnlichkeit zu Kolipasen; trotz alledem bleibt die funktionelle Signifikanz der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Dkk1 und Dkk2 ungeklärt. Wnt selbst, wird als Proto-Onkogen bezeichnet welches über die Zellproliferation und Transformation die Tumorformation begünstigen kann. Wang J. et al suggerieren schlussfolgernd aus ihren Untersuchungen eine Dkk1 vermittelte P53 Tumorsuppression durch eine Antagonisierung auf den Wnt Pathway (mit speziellem Bezug zum Brustgewebe). Dabei wurde deutlich dargestellt, dass Dkk1 in nicht Wnt transformierten Zellen keinen Einfluss auf die Zellproliferation zeigt (Wang J. et al. 2000). Die Dkk1 abhängige Inhibierung des Wnt/Beta-Catenin Stoffwechsels resultiert offensichtlich in der Induktion der Apoptose. Dkk1 wird als potenter Initiator der Apoptose beschrieben, der zudem durch ein „Variété“ verschiedener Stimuli eingeleitet werden kann (Kawano Y. et al. 2003). Der Dkk1 Promotor enthält p53-Antwort Elemente und zudem wird die Dkk1 Expression durch p53 induziert (Wang et al. 2000). Darüber hinaus steigert genotoxischer Stress wie UV-Bestrahlung oder chemotherapeutische Agentien die Dkk1 Expression (Shou et al. 2002). Die durch verschiedene apoptotische Faktoren gesteigerte Expression von Dkk1 scheint die Beteiligung des Transkriptionsfaktors Jun vorauszusetzen (Grotewald and Ruther 2002). DKK1 wurde kokulturell um das 2,1fache stärker exprimiert als in der Tumorreinkultur. Den vorliegenden Referenzen folgend, zieht die durch DKK1 verursachte WNT-Inhibierung in Wnt-positiven Zellen eine Apoptoseinduktion nach sich. DKK1 zeigt somit eine negative Wirkung auf den canonischen WNT-Stoffwechselweg durch Hemmung von LRP5/6. Dies resultiert in einem negativen Einfluss auf die Zellzyklusprogression. Ein direkter Zusammenhang zwischen DKK1 und oralen Plattenepithelkarzinomen wird in den vorliegenden Studien nicht beschrieben.

INHBB inhibin, beta B (activin AB beta polypeptide)

Die Inhibin beta B Untereinheit verbindet die Alpha Untereinheiten und bildet so einen hypophysären FSH Sekretionsinhibitor. Inhibin reguliert die gonadale Keimzellproliferation negativ und besitzt Tumorsuppressoraktivität. Der Serum Level von Inhibin korreliert mit der Größe von Granulosa-Zell-Tumoren und könnte hier als Marker für sowohl primäre als auch rekurrende Erkrankung genutzt werden. Durch seine gewebsabhängige Expression werden Inhibine funktionell zwischen Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren und Hormonen eingeteilt. Die Beta B Untereinheit kann Homodimere, Activin A, bilden und zudem auch mit der Beta A Subunit Heterodimere, Activin AB, bilden. Beide stimulieren die

FSH Sekretion. Inhibin beta B wird im Gewebe von Brustkarzinomen unabhängig der Karzinomeigenschaften erhöht exprimiert, dies jedoch ohne statistische Signifikanzen. Innerhalb der entsprechenden metastatisch infiltrierten Lymphknoten zeigte sich eine geringere Expression der Inhibine, was einen Zusammenhang zwischen der Inhibinexpression zum Differenzierungsgrad und der Aggressivität der Tumorzellen im Primärtumor darstellen kann (Mylonas I. et al. 2005). Für neoplastische- und proliferative Prozesse in der Glandula thyroidea wird ebenfalls eine erhöhte Expression von Activin B und -A beschrieben (Matsuo S.E. et al. 2003) Inhibin beta b wurde in der Tumorendothelzellkultur um den Faktor 1,7 erhöht exprimiert.

BDNF

Das durch dieses Gen kodierte Protein ist ein Mitglied der "nerve growth factor family". Es wird durch kortikale Neuronen induziert und ist nötig für das striatale neuronale Überleben im Gehirn. Die Expression dieses Gens ist sowohl während der Alzheimer- als auch während der Huntington-Erkrankung reduziert exprimiert. Dieses Gen ist an der Regulation der Stressantwort- und an der Biologie von Stimmungsschwankungen beteiligt. Verschiedene Transkriptvarianten führen zu unterschiedlichsten Isoformen für dieses Gen, aber nur einige dieser Isoformen sind ausführlich untersucht. Für Säugetiere werden vier Neutrophine (NGF, BDNF, NT-3 und NT-4) beschrieben, und jedes davon aktiviert eine- oder mehrere Tyrosinkinase Rezeptoren der Trk Familie. Über die Trk Rezeptoren aktivieren die Neutrophine intrazelluläre Signalisierungswege einschließlich solcher die durch Ras-, die Cdc42/Rac/RhoG Protein Familie-, die MAPK-, PI3K- und PLC-gamma kontrolliert werden. Somit greifen die Neurophiline sowohl in die Entwicklung als auch Funktion des Nervensystems ein (Patapoutian A. et al. 2001). Weston et al. untersuchten mittels einer Mikroarray Analyse die VEGF Antwortelemente in myometrialen Endothelzellen. Dabei wurden ganze 110 Gene als erhöht exprimiert dargestellt, wovon im Vorfeld nur 19% (21 Gene) als erhöht reguliert durch VEGF oder angiogenetische Einflüsse beschrieben wurde (Weston et al. 2002). Zu den erhöht exprimierten Genen dieser Untersuchung zählt u.a. auch das zuvor weniger mit angiogenetischen Abläufen assoziierte Gen des BDNF. Ebenso wenig wurde BDNF zuvor in Zusammenhang mit dem humanen Uterus beschrieben (Weston et al. 2002), trotz der Tatsache, dass es von HUVECs sekretiert wird (Nakabashi et al. 2000) und als endothelialer Überlebensfaktor gilt (Donovan et al. 2000). In Abhängigkeit der endothelialen Lokalisation unterscheidet sich der Einfluss von TNF-alpha auf die BDNF Expression. So zeigten human cerebral endothel cells (HCEC) eine erhöhte BDNF Expression unter TNF-alpha Einfluss wohingegen in humanen Nabelschnurvenen („HUVECs“: „humanen umbilical endothelial cells“) die BDNF Expression durch TNF-alpha reduziert wird (Bayas A. et al. 2002). Entsprechend den Schilderungen von Donovan M.J. et al. resultiert die Defizienz von BDNF in einer Reduktion

der endothelialen Zell-Zellkontakte und einer endothelialen Apoptose. Was schlussfolgernd zur Darstellung der essentiellen Bedeutung von BDNF für den Erhalt der Gefäßstabilität (bes. im Herz) durch direkte angiogene Effekte auf endothelialer Ebene führt (Donovan et al. 2000). BDNF wurde kokulturell 1,6fach stärker exprimiert. Dies kann auf eine durch die Tumorzelle selbst ausgelöste sowohl strukturelle als auch proliferative endotheliale Stabilisierung hindeuten.

CXCL11

Dieses Gen ist ein CXC Mitglied der Chemokin Superfamilie das daraus entstehende Protein induziert eine chemotaktische Antwort in aktivierten T-Zellen und ist ein dominanter Ligand des CXC-Rezeptors 3. Das für dieses Protein kodierende Gen enthält vier Exons und drei Poly-A Signale welche möglicherweise der zellspezifischen Expressionsregulation dienen. IFN-gamma gilt als potenter Induktor der Transkription dieses Gens. Die chemotaktile Wirkung auf T-Zellen besteht nur für Interleukin-aktivierte T-Zellen, nicht für unaktivierte T-Zellen, Neutrophile und Monozyten. Innerhalb der aktivierten T-Zellen induziert CXCL11 eine Calciumfreisetzung. Die angiostatischen Effekte von u.a. CXCL11 auf humane mikrovaskuläre Endothelzellen („HMVECs“: „human microvasculare endothelial cells“) werden durch den Rezeptor CXCR3 vermittelt (Belperio et al. 2000; Homey et al. 2002; Romagnani et al. 2001; Salcedo et al. 2000; Strieter et al. 2002). Dabei resultiert die Interaktion zwischen CXCL11 und CXCR3 in einer Chemotaxis für aktivierte Th1 Zellen, ebenso für natürliche Killerzellen, für Makrophagen und dendritische Zellen (Penna et al. 2001). So wird nach Lasagni et al., 2003 zwischen dem klassischen CXCR3-A und dem seid kürzerem bekannten CXCR3-B unterschieden. Der klassische CXCR3-A vermittelt in HVMECs als Antwort auf u.a. CXCL11 die Proliferation derselben und steigerte somit das endotheliale Überleben sowie die angiogene Aktivität (Lasagni et al. 2003). Die Nomenklatur des CXCR3 erzeugt Unklarheiten bei der Darstellung der Funktionen der betreffenden Chemokine oder des Rezeptors. Dabei scheint dennoch allgemein anerkannt, dass CXCL11 über CXCR3 verschiedene Leukozyten Untergruppen rekrutiert und zudem die Kapazität zur Induktion vaskulärer Periozyten hat (Lazzeri E. et al. 2005). Kawada et al. beschrieben für Melanoma Zellen unter in vitro Verhältnissen durch konstitutionelle Expression des CXCR3 Rezeptors, Prozesse wie Aktin Polymeristaion, Migration, Invasion sowie zelluläres Überleben. Dabei wurde deutlich, dass CXCR3 sowohl im Primärtumor als auch in metastatischen Lymphknoten vorzufinden ist (Kawada et al. 2004). Somit hat CXCR3 u.U. generelle therapeutische Bedeutung (Kawada et al. 2004), kann aber nicht als Indikator für Progressivität oder Metastasierung gelten. (Kawada et al. 2004) Der Expressionsunterschied zwischen Kokultur zur Reinkultur beträgt 1,6. In Abhängigkeit des Vorliegens von CXCR3 ist somit von einer angiogenen Aktivierung auszugehen.

5.2.3 Transkriptionsfaktoren

GFI-1

GFI-1 (Growth Factor Independence-1) ist ein zelluläres Proto-Onkogen das ursprünglich in einem "insertional mutagenesis survey" von T-Zell-Lymphomas der Maus identifiziert wurde, GFI-1 wird dabei für eine Wachstumsunabhängigkeit von IL-2 benötigt. GFI-1 inhibiert den T-Zell-Tod durch Hemmung proapoptotischer Faktoren und durch Übergehen eines G1-Zellzyklus Checkpoints. GFI-1 reguliert die IL-4/STAT6 abhängige TH2 Zellproliferation (Zhu J. et al. 2002) und die IL-6/STAT3 vermittelte proliferative Antwort auf antigene Stimulation. Humane hereditäre GFI-1 Mutationen führen zu Neutropenien und weisen ein Ausbleiben der ELA2 („encoding neutrophil elastase“) Unterdrückung auf. ELA2 verschlüsselt für die neutrophile Elastase. Diese Mutation wird als Hauptgrund für die vererbten humanen neutropenischen Syndrome dargestellt (Dale et al. 2000). Ein zellulärer Promotor, der durch GFI-1 inhibiert wird, ist der antiapoptotische Faktor Bax. Wenn sich GFI1 und ELA2 in einem gemeinsamen Stoffwechselweg befinden kann man davon ausgehen, das GFI1 ELA2 unterdrückt, beide wirken auch in der myeloiden Differenzierung (Person R.E. et al. 2003). Growth Factor Independence 1 ist ein transkriptioneller Repressor mit einem Molekulargewicht zwischen 47 und 55kDa. Dieses Protein hat 6 c-terminale C₂H₂ Zinkfinger Domänen und einen charakteristischen „Stretch“ von 20 Aminosäuren (SNAG-Domain) am N-Terminus. Die GFI1 Expression ist im hämatopoetischen und lymphoiden System vorzufinden zudem wird die Expression im sensorischen Epithel, der Lunge und Teilen des ZNS beschrieben (Moroy T. 2005). GFI1 Bindung an seine cis-Element Sequenz (in Ratte, Maus und Mensch erhalten) vermittelt eine direkte und potente transkriptionelle Repression (Doan L.L. et al. 2004). GFI-1 kooperiert mit den Zellzyklusregulatoren PIM-1 und cMyc. Zudem scheint GFI-1 durch die Regulation von Zellzyklusfaktoren auch einen Bezug zur Granulopoese zu zeigen (Duan et al. 2003). STAT Faktoren sind an der Signalübermittlung und an der transkriptionellen Aktivierung beteiligt. Das Protein PIAS3 kann an diesen Faktor binden und so die transkriptionelle Aktivierung hemmen. Das Zinkfinger-Protein GFI1 kann jedoch die STAT3 vermittelte Signaltransduktion insofern beeinflussen, dass die durch PIAS3 Inhibition vermittelte transkriptionelle Aktivierung durch die kolokalisierte Bindung von GFI1 an STAT3 zusätzlich erhöht wird. Und zwar um ein erhebliches Maß über das der Hemmung hinaus. GFI1 und GFI1B sind transkriptionelle Repressoren die über die Stoffwechselwege der Zytokinaktivierung das Lymphozytenwachstum und -überleben anregen. Dabei wird die GFI1 Expression durch die Induktion des T-Zellprogramms eingeleitet, im Weiteren potenziert GFI1 die TCR Stimulation. Somit ist GFI1 an der Integration von Aktivierungen und Überlebenssignalen beteiligt (Doan L.L. et al. 2003). GFI1 ist zudem ein Transkriptionsrepressor und verleiht

Tumorzellen eine Unabhängigkeit der Wachstumsfaktoren (Liu S. et al. 2000). Innerhalb einer Lungen Karzinom Zelllinie wird für das Onkoprotein GF11 eine inhibierende Interaktion zur Notch Signalisierung beschrieben. Zudem fungierte GF11 in dieser Lungenkrebslinie als DNA bindender transkriptioneller Repressor, dies resultiert in diesen Lungenkarzinoma-Zellen bei verstärkter GF11 Expression in einer potenzierten Tumorformation (Kazanjian A. et al. 2004). Eine GF11 Induktion trägt zur T-Zell Aktivierung bei und durch Inhibierung verschiedener Gene die die zelluläre Proliferation unterdrücken, ist GF11 auch mit der Tumorprogression zu assoziieren. Allgemein gilt: GF1-1 begünstigt die zelluläre Proliferation und vermeidet zeitgleich die Apoptose (Duan et al. 2003). Womit sich dieses Proto-Onkogen, das kokulturell um den Faktor 3,2 stärker exprimiert wurde als reinkulturell, gut in den vorliegenden Kontext eingliedern lässt. Konkrete Aussagen zum Expressionsmuster dieses Moleküls in Plattenepithelkarzinomen fehlten zum Zeitpunkt der Recherche.

ID-3 (inhibitor of DNA binding 3; HEIR-1)

Dabei werden drei ID Proteine (ID1 bis ID3) in Neuroblastoma-Zellen während der Differenzierungsinduktion herabreguliert. Dies wird durch Jogi et al. als Hilfestellung für den Tumor auf dem Weg zu einem undifferenzierten Zustand gewertet (Jogi et al. 2002). Sakurai et al. zeigten das in Endothelzellen ID-Proteine während inflammatorischer- und angiogenetischer Prozesse durch VEGF- und TGFbeta induziert werden (in HUVECs) (Sakurai et al. 2004). Dabei resultiert eine ID Überexpression in einer gesteigerten Expression von ICAM-1 und E-Selektin, und induziert zudem angiogene Prozesse, wie die Transmigration, die Matrixmetalloproteinase-2- und-9 Expression, sowie die Tubenformation. Es wird also geschildert, dass ID die VEGF induzierten Signale auf Endothelzellen in ihrer Wirkung während angiogener Prozesse potenziert. Dementsprechend wird suggeriert, dass sich ID1 und ID3 therapeutischen Wert für pathologische Prozesse mit angiogener Komponente besitzen. In Fibroblasten bewirkt eine TGF-beta Stimulation eine erhöhte Induktion von ID1 und ID3 (Chambers et al. 2003). Die Anteilnahme der ID Proteine an dem Entstehen- und dem Fortschreiten humaner Malignitäten, begründet sich durch die entscheidende Beteiligung der ID Moleküle an Veränderungen die gemeinsam- oder besser allesamt das maligne Wachstum mit definieren. Begonnen bei einer unnachgiebigen Proliferation assoziiert mit der Selbstversorgung von Wachstumssignalen und einer Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen-, sowie durch die fortwährende Neoangiogenese-, und letztendlich auch durch die Gewebsinvasivität- und die Fähigkeit der Tumorzelle zur Migration werden tumorcharakteristische Abläufe deskriptiv dargestellt (Norton et al. 2000; Wilson J.W. et al. 2001). Allesamt sind von einer uneingeschränkten Verfügbarkeit von ID Proteinen abhängig (Lasorella A. et al. 2001). ID1 und ID3 Gene werden für die Vaskularisierung, das Wachstum und die Metastasierung von ‚Tumorexografts‘ benötigt.

In ID-defizienten Mäusen waren weder die Tumortransplantation selbst noch die proangiogenen Faktoren in der Lage im Transplantatbett eine ausreichende Mobilisierung- sowie Rekrutierung zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen- und hämatopoetischer Zellen zu erreichen. Dies bedeutet, dass diese ID-negativen Tumormodelle eine gestörte- oder fehlerhafte Tumorangio-genese aufweisen (Li H. et al. 2004). So wird eine Deregulation der ID Expression in verschiedenen primären humanen Tumoren wie den Seminomas, pankreatischen Adenokarzinomen, Plattenepithelkarzinome (Langlands et al. 2000) und in Brusttumoren (Lin Q. et al. 2000) beschrieben. In humanen kolorektalen Adenokarzinomen korreliert die ID Expression mit dem mitotischen Index und dem p53 Expressionslevel (einem Marker für die veränderte Modulation der p53 Funktion), wobei die deregulierte ID-Protein-Expression in kolorektalen Karzinomen möglicherweise als Resultat des Verlustes der p53 Funktionen zu betrachten, was so eine Grundlage der unkontrollierten Proliferation darstellt (Wilson J.W. et al. 2001). ID Moleküle binden nicht ausschließlich an die basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktoren, was zu einem Gleichgewicht zwischen Wachstum und Differenzierung führen würde, sondern ebenfalls an die Ets Transkriptionsfaktoren und an Proteine der pRB (retinoblastoma tumour suppressor protein) Familie. Somit werden nachhaltig regulatorische Proteine des Zellzyklus, der Transformation und der Tumorsuppression beeinflusst. Dies entspricht der Charakterisierung ID Kontrolle über normale und unnormale Zellzyklusprogression (Zebedee et al. 2001). Den Schilderungen zufolge war eine kokulturell erhöhte Expression zu erwarten. Der Expressionsunterschied beläuft sich auf den Faktor 1,7. Dies scheint, auch wenn dieser Faktor eher gering ist, ein wesentliches Kriterium für eine adäquate Tumorangio-genese zu sein.

TAF9L

Die Initiierung der Transkription durch die RNA-Polymerase II benötigt die Aktivität von mehr als 70 Polypeptiden. Das Protein, dass diese Aktivitäten koordiniert ist der Transkriptionsfaktor IID (TFIID), dieser bindet an das Kernprotein um die Polymerase regelrecht zu positionieren, dient als Gerüst für den Aufbau des restlichen Transkriptionskomplexes und agiert letztendlich auch als Kanal für regulatorische Signale. TFIID ist aus TATA bindenden Proteinen (TBP: TATA-binding proteins) und einer Gruppe von evolutionär erhaltenen Proteinen, die als TBP-assoziierte Faktoren (TBP-associated factors: TAFs) bekannt sind, aufgebaut. TAFs sind an der basalen Transkription beteiligt, fungieren als Koaktivator, in der Promotorerkennung oder modifizieren generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs) um so eine Komplexzusammenstellung und eine Transkriptionsinitiierung zu bewirken. TAF9L verschlüsselt für ein Protein, das einer der kleinen Untereinheiten der TFIID ähnelt, dem TBP-assoziierten Faktor 9. Chen et al. konnten nachweisen, dass TAF9L funktionell an der transkriptionellen Repression und/oder der Reduzierung der transkriptionellen Leistung beteiligt ist (Chen et al. 2003). TAF9L wurde

kokulturell 1,5fach stärker exprimiert als reinkulturell. Der Ansatz der transkriptionellen Repression lässt dabei einige Vermutungen zu, diese gewinnen durch den Mangel an Referenzen jedoch kaum an Bedeutung.

5.2.4 Zytoskelett

KRT13

Das durch dieses Gen verschlüsselte Protein ist ein Mitglied der Keratin Genfamilie. Die Keratine sind intermediäre Filamente und dementsprechend für die strukturelle Integrität von Epithelzellen verantwortlich und werden in die Untergruppen der Cytokeratine und Haarkeratine untergliedert. Die meisten der Typ I Cytokeratine bestehen aus aziden Proteinen, welche in Paaren von heterotypischen Keratinketten angeordnet sind. Dieses Cytokeratin kombiniert sich mit einer Keratinkette des Keratins 4 und wird in den suprabasalen Schichten der nichtverhornten mehrschichtigen Epithelien exprimiert. Mutationen in Keratin13 und Keratin4 werden mit dem autosomal dominanten „White Spong Nevus“ assoziiert. Die Typ I Cytokeratine sind innerhalb einer Region auf dem Chromosom 17q21.2. versammelt. Alternatives Spleißen dieses Genes resultiert in verschiedenen Transkriptvarianten; wovon nicht alle Varianten beschrieben sind (Shinohara M. et al. 1998). Desmosomen sind intrazelluläre Junctions, die die Verankerung der intermediären Filamente des Cytoskeletts ermöglichen. Somit trägt das Desmosomen-Cytokeratin Netzwerk substantiell zur epithelialen Infrastruktur bei. Komponenten des Desmosom-Cytokeratin Netzwerkes, wie unter anderen auch das Cytokeratin 13 (CK13) zeigen dabei ein mögliches Potential als Marker für die Differenzierung und das Verhalten von Plattenepithelkarzinomen. Cytokeratin 13 wird mit fast jedem Differenzierungsgrad in Verbindung gebracht, fehlt jedoch bei dem schwächsten Differenzierungsgrad. Anscheinend scheint eine Kombination aus Cytokeratin 13 und -19 signifikant für invasive- und metastatische Attribute zu sein (Shinohara M. et al. 1998). Keratin 13, so wird suggeriert, spielt möglicherweise eine wichtige Rolle in der laryngealen Karzinogenese, dieses Cytokeratin wird auch als Tumorsuppressor mit Relevanz für die Diagnose und Prognose von Plattenepithelkarzinomen beschrieben. Baker et al. verglichen die Proteinexpression in histologisch normalem Plattenepithel mit der von Plattenepithelkarzinomen (Baker H. et al. 2005). Keratine wurden dabei in sehr hohen Mengen vorgefunden, wobei Keratin13 in den Tumorproben in geringerem Ausmaß vorlag. Die statistische Auswertung der Cytokeratinexpression in oralen- und pharyngealen Plattenepithelkarzinomen durch Depondt et al. ergaben, dass die Cytokeratinexpression sowohl als diagnostischer als auch

als prognostischer Marker zur Beurteilung dieser Tumorentitäten dienen könne. Dabei wird nur zu einer Abwesenheit von Cytokeratin 13 Stellung bezogen, diese sei demzufolge mit rezidivierenden, metachronen Tumoren und Fernmetastasen zu assoziieren (Depondt J. et al. 1999). Vaidya et al. untersuchten Plattenepithelkarzinome der Zunge und der Alveolarmukosa auf Cytokeratine (mittels SDS Page, immunoblotting, two dimensional electrophoresis) und beschreiben u.a. eine Cytokeratin 13-Expression (CK13) in normalem adultem ventralem Zungengewebe sowie in gleichartiger Alveolarmukosa (Vaidya M.M. et al. 1996)). Gegensätzlich zu Depondt et al. wurde hier keine Assoziation zwischen CK13 und den untersuchten Plattenepithelkarzinomen festgestellt (Vaidya M.M. et al. 1996). Eine Herabregulierung von Cytokeratin 13 u.a. in Plattenepithelkarzinomen zeigt einen Zusammenhang zum invasiven- und metastatischen Potential. Woraus weiterhin geschlussfolgert wird, dass die Cytokeratine durch ihre Stellung innerhalb des cytoskeletalen Systems mit zu einem malignen Phänotyp beitragen (Morifuji M. et al. 2000). Cytokeratin13 zeigte in der Mischkultur eine 2,2fach erhöhte Expression. Dieses Ergebnis gliedert sich in die widersprüchlichen Aussagen der zugrunde liegenden Referenzen ein. Dabei bleibt festzuhalten, dass solche Versuchsreihen, die die Cytokeratinexpression untersuchten, signifikante wenn auch geringe Expressionen des Cytokeratin13 beschreiben. Die Untersuchungen, die eine posttranslationelle Modifikation mit berücksichtigen, und ihr Augenmerk auf die intrazellulär vorliegende Proteinexpression legen, bieten keine relevanten Ergebnisse für KRT13 erreichten.

5.2.5 Zelladhäsion

Protocadherin alpha 9

Cadherine sind Calciumabhängige interzelluläre Adhäsionsmoleküle und vermitteln neurale Zell-Zellinteraktionen. Sperry et al. prägte 1963 die Vorstellung, dass Neuronen ihre synaptischen Partner durch Schlüssel-Schlüsseloch Interaktionen, vermittelt durch spezifische Moleküle, erkennen (Sperry et al. 1963). Dabei sind Cadherine basierend auf ihrer neuronalen Lokalisation, ihrer adhäsiven Diversität und durch die strukturelle Biologie ihrer adhäsiven Interaktionen, eine Komponente dieser Interaktionen (Shapiro and Colman et al. 1999). Neuronale Cadherine (CDH2) haben genauso wie epitheliale- (CDH1), plazentale- (CDH3) und auch retinale Cadherine (CDH4) homophile Bindungsspezifitäten. An diesen adhären sie auf solchen Zellen, die den gleichen Cadherintyp exprimieren, bevorzugt. Cadherine des „klassischen Typs“ haben ein hoch erhaltenes extrazelluläres Sequenzmotiv von annähernd 110 Aminosäuren dieses Motiv wiederholt sich fünfmal.

Zudem weisen die klassischen Cadherine ein hoch erhaltenes zytoplasmatisches Motiv auf, dieses besteht aus ca. 200 Aminosäuren, für letzteres besteht eine Assoziation über die Catenine zu intrazellulären Aktinmikrofilamenten. „Nicht klassische Cadherine“ sind solche, die entweder 6 oder 7 Wiederholungen der extrazellulären Domäne aufweisen oder deren zytoplasmatische Domänen mit intermediären Filamenten, wie z.B. Desmin anstelle von Aktin, assoziiert sind. Protocadherine stellen eine Untergruppe der „Nicht-klassischen Cadherine“ dar. Bei den Protocadherinen sind nur innerhalb der strukturellen Eigenschaften einige Gemeinsamkeiten zu finden, für die zytoplasmatischen Domänen werden keine Homologien innerhalb der Protocadherin Subfamilie beschrieben (Wolverton T. et al. 2001). Demnach ist die Anwesenheit von Ektodomänen oder extrazellulären Wiederholungsdomänen das Charakteristikum der verschiedenen Mitglieder der Cadherin Superfamilie. Zusätzliche funktionelle- oder strukturelle Eigenschaften untergliedern diese Mitglieder in sechs Cadherinunterfamilien (Sano K. et al. 1995): die klassischen (Typ1) Cadherine, atypischen-nicht klassischen (Typ2) Cadherine, Semocolline, Desmogleine, Flamingocadherine und Protocadherine (Nollet F. et al. 2000). Die initiale Klassifikation der Protocadherine war dabei allein abhängig von der Anzahl extrazellulärer Wiederholungsdomänen (Sano K. et al. 1995; Suzuki S. T. 1996). Protocadherine vermitteln genauso wie Cadherine selbst die Adhäsion in „synaptischen Junctions“ (Kohmura N. et al. 1998). Ein weiteres Unterscheidungskriterium zwischen Cadherinen und Protocadherinen ist das Nichtvorhandensein einer für die Cadherine charakteristische Aminosäuresequenz innerhalb der dritten- und fünften extrazellulären Domänenwiederholungen (EC3 und EC5) in den Protocadherinen (Suzuki S.T. et al. 1996). Zudem haben klassische Cadherine fünf Ektodomänen (EC 1-5) denen ein Prosegment und ein Signalpeptid voraus geht. Gegensätzlich dazu fehlt den Protocadherinen das Prosegment (Wu Q. et al. 2000). Protocadherin-alpha und Protocadherin-gamma werden putativ als Zellerkennungs oder -adhäsionsmoleküle im Gehirn beschrieben (Murata Ye et al. 2004). Die Expressionslevel der Cadherine erscheinen während der Entwicklung strengstens reguliert zu sein und zudem zeigt jedes Gewebe bzw. jeder Zelltyp ein charakteristisches Expressionsmuster für Cadherine (Nollet F. et al. 2000). Eine Herabregulierung der Cadherinexpression oder funktionelle Veränderungen wurden dabei bei verschiedenen humanen Malignitäten beobachtet und resultieren in einer Verschlimmerung der Invasion und Metastasierung (Perl A.K. et al. 1998), weshalb suggeriert wird, dass einige Cadherine als Tumorsuppressor agieren (Bex G. et al. 1995). Die Expressionserhöhung beläuft sich auf den Faktor 1,9. PCDHA9 wird laut einiger Referenzen spezifisch im Gehirn exprimiert um dort neuronal interzellulär regulierend zu wirken. Auch die lt. Perl et al. oder Bex et al. dargestellte Bedeutung der Herabregulierung mit der Schlussfolgerung einer negativen Wirkung auf Tumorzellen lässt sich so durch das vorliegende Ergebnis nicht bekräftigen.

GP9 glycoprotein IX (platelet)

GP9 (platelet glycoprotein IX) ist ein kleines Membranglykoprotein auf der Oberfläche von humanen Plättchen. Es bildet einen eins-zu-eins nicht kovalenten Komplex mit dem Glykoprotein Ib (GPIb), dieser Komplex fungiert als Rezeptor für den von-Willebrandt Faktor (vWF). Der Hauptanteil dieses Rezeptors besteht aus dem Heterodimer-, bzw. der alpha-(GPIba) und beta (GPIbb) Kette von GPIb. Beide Ketten sind über Disulfidbrücken aneinander gebunden. Die Ausbildung des gesamten Rezeptorkomplexes benötigt jedoch zudem die nichtkovalente Assoziation von GP9 und GP5 (platelet glycoprotein V). Hinzufügend sei auf eine Modifikation des GPIb/V/IX Komplexes hingewiesen, dabei wird die entsprechende Kinase durch Prostacyclin aktiviert, woraus eine Phosphorylierung des Komplexes an der Position Ser166 resultiert. Darüber hinaus verhindert Prostacyclin, als einer der potentesten Inhibitoren der Plättchenaggregation, auch eine Mobilisierung der Plättchen GPIIb/IIIa in Thrombin-aktivierte Plättchen. Die extrazelluläre Domäne des Glykoprotein GP-Ib-IX Komplexes bindet den von-Willebrandt Faktor an der Stelle der Gefäßbeschädigung woraufhin intrazelluläre Stoffwechselwege initiiert werden. Dabei zeigte sich, dass GPIb-IX Komplex Interaktionen mit dem von Willebrandt Faktor zu Reorganisationsvorgängen innerhalb des Cytoskelletons führen. Diese Reorganisationen werden durch die cytoplasmatische Domäne von GPIba (alpha) reguliert und selbige ist absolut notwendig für die Verankerung des Komplexes am Zytoskelleton. Der Glykoprotein (GP) Ib/V/IX Rezeptor Komplex ist ein wichtiges Adhäsionsmolekül das ursprünglich nur der megakaryozytischen Linie zugesprochen wurde. Die Anwesenheit des funktionellen Komplexes in Tumorzellen einer Brustkrebszelllinie lässt darauf schließen, dass dieser Komplex am Prozess der hämatogenen Brustkrebsmetastasierung beteiligt ist (Suter C.M. et al. 2001). GP9 wurde reinkulturell 1,6fach weniger stark exprimiert. Die Bedeutung dieses Sachverhaltes ist schwer zu beurteilen da die zur Ausbildung eines funktionstüchtigen Komplexes notwendigen Kofaktoren (GPIb und GPV) fehlen. Keine der vorliegenden Publikationen beschreibt Funktionen, die ausschließlich GP9 zuzuordnen.

5.2.6 Weitere

Cytochrom P450 (**CYP450**) ist eine Sammelbezeichnung für die Gruppe der Monooxygenasen, oder mischfunktionellen Hydroxylasen mit mehr als 100 verschiedenen Typen die in grob 12 Gruppen eingeteilt werden – alles in allem können so über eine Million verschiedene Substrate umgesetzt werden. Diese Enzymgruppen zeichnen sich dadurch aus, dass ein Sauerstoffatom von molekularem O₂ unter Bildung einer Hydroxylgruppe in

das Substrat eingebaut wird, das zweite Atom jedoch der Wasserbildung dient. Im Cytochrom P450 bindet Eisen zum einen Cystein, zum anderen Wasser, das durch die Aktivierung von Sauerstoff während der katalytischen Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen verdrängt wird. Dieses Enzym ist an der Aktivierung von Kanzerogenen beteiligt, so werden unter der Beteiligung von Cytochrom P450 im endoplasmatischen Retikulum polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe zu Epoxiden oder Radikalen umgewandelt. Weitere Funktionen der Cytochrom P450 Monooxygenasen, die in hoher Konzentration in den Mikrosomen der Leber lokalisiert sind, ist die Beteiligung dieses Enzyms an einem NADPH-abhängigen Elektronentransport, es oxidiert strukturell unabhängige Präparate wie Steroide, Fettsäuren und Xenobiotics (Pflanzentoxine, Pestizide, Pharmaka, verschiedene Kohlenwasserstoffe und andere toxische Verbindungen, die vom Organismus aus der Umwelt aufgenommen wurden). So werden z.B. Prä-Onkogene oder auch Xenobiotics im Nasopharynx durch CYP450 aktiviert und zu Kanzerogenen, dabei wurde eine große Anzahl von exprimierten CYP450 Genen im Nasopharynx beschrieben wovon einige wie z.B. **CYP1A1**, CYP1B1, CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, und CYP4B1 in einem Vergleich zwischen tumorösen und gesundem Gewebe mit einem positiven Level exprimiert wurden (Ai Zheng et al. 2004; Han Xm et al. 2000; Hashibe M. et al. 2003; Mimori K. et al. 2004; Shimada T. et al. 2001). Andere Cytochrome wiederum lassen Aussagen zur Malignität eines Karzinomes zu. Die auszuwertenden Ergebnisse wurden durch die vorliegenden Referenzen insofern bestätigt, dass CYP1A1 in einer Tumor-Kokultur auch um einen hohen Faktor von 6,2 verstärkt exprimiert wurde. **CYP24** limitiert die biologische Aktivität des Vitamin-D-Signalsystems, ist so also auch an der Herstellung eines Calciumgleichgewichtes beteiligt, dabei stehen die Expressionen von CYP24 und dem Vitamin-D-Rezeptor (VDR) in einer inversen Relation, wobei eine Überexpression des CYP24 ein Hinweis für malignes Potential ist. (Mimori K. et al. 2004) CYP24 wurde in der Kokultur 3,8fach schwächer exprimiert als in der reinen Tumorkultur. Durch die inverse Relation zu Vitamin D sind in der Kokultur calciferole Wirkungen wie Wachstum und Differenzierung epidermaler Zellen, Differenzierung des hämatopoetischen Systems, Immunmodulation und Beeinflussung der Karzinogenese relevant.

PARG1

PTLP1 ist eine intrazelluläre Protein-Tyrosin Phosphatase mit fünf PDZ Domänen. Saras J. et al. beschreiben ein Molekül, das spezifisch mit den PDZ Domänen von PTLP1 interagiert. Dieses Molekül enthält eine GTPase aktivierende Protein Domäne, eine Cysteinreiche Zink- und Glycerolbindungsdomäne (und zudem wird eine sequenzhomologe Region zu dem Caenorhabdits Elegans ZK669.1a Genprodukt beschrieben). Die GAP Domäne wirkt in vitro auf Rho, Rac und Cdc42, wobei eine klare Präferenz für Rho besteht. Dementsprechend

wird dieses Molekül deskriptiv als „PTLP1-assoziiertes RhoGAP 1“, kurz: PARG1, bezeichnet. Rho wird durch GAPs inaktiviert, und die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung ist an der Rho Signalisierung beteiligt. Genau dabei fungiert ein PTLP1 und PARG1 Komplex als potenter negativer Regulator der Rho Signalisierung, zum einen durch Agieren an Rho selbst und zum anderen durch tyrosinabhängige Phosphorylierung verschiedener Komponenten des Rho-Signaltransduktionsweges (Saras J. et al. 1997). PARG1 und ZK669.1a (*Caenorhabditis elegans*) zeigen eine homologe Region (ZPH: ZK669.1a und PARG1 Homology Region). Genau diese Region vermittelt die Interaktionen mit Rap2. Rap2 ist der Ras Familie von kleinen GTP-bindenden Proteinen zuzuordnen, aber seine spezifische Signalwirkung ist unklar. PARG1 reagiert mit Rap2 GTP-abhängig, bei Ras oder Rap1 ist dies so nicht der Fall. Für Fibroblasten wird auch unter in vivo Verhältnissen ein PARG1 abhängige Induktion zytoskelettaler Veränderung beschrieben, die im Folgenden zu einer Rho Inaktivierung führen (Myaagmar B.E. et al. 2005). Rho reguliert das Aktinzytoskelett durch Kontrolle der Aktinpolymerisation und wirkt sich somit auf die Zellmorphologie und Zellmotilität aus (Takai Y. et al. 2001). Dieses in vivo Charakteristikum wird durch Rap2 supprimiert. Dementsprechend wird geschlossen, dass PARG1 ein spezifischer Effektor von Rap2 zur Regulierung von Rho ist (Myaagmar B.E. et al. 2005). PARG1 wurde kulturell 3,6fach höher exprimiert.

NFAM1 NFAT activation molecule 1

Das durch dieses Gen verschlüsselte Protein ist ein Typ I Membranrezeptor, der seinerseits Promotoren der Cytokine aktiviert, diesbezüglich wird ein Zusammenhang zu IL-13 und TNF-alpha Promotoren beschrieben. Das entsprechende Protein enthält ein Immunorezeptor-Tyrosin basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif) und ist an der Regulierung der Signalisierung und Entwicklung der B-Zellen beteiligt. Dieses Protein zeigt eine 270 Aminosäuren lange Sequenz und enthält ein N-terminales Signalpeptid, eine Immunoglobulin Domäne in der extrazellulären Domäne, gefolgt von einer transmembranen Domäne und einem ITAM innerhalb der cytoplasmatischen Domäne. NFAM1 wird als ITAM enthaltendes Protein beschrieben, welches die Calcineurin/NFAT-Signalsierung- und somit auch die folgenden Cytokinepromotoren aktiviert (Yang J. et al. 2003). Hinzufügend, soll eine Überexpression eine Aktivierung der entsprechenden Effektoren auch ohne die eigentliche Ligandenbindung oder Kreuzbindung ermöglichen. Die NFAM1 Kreuzbindung induziert die ITAM Phosphorylierung, die ZAP-70/Syk Rekrutierung, sowie die NFAT Aktivierung und die darausfolgende Cytokinproduktion (Ohtsuka M. et al. 2004). NFAM1 wird mit einem FC von 3,4 dargestellt. Hierbei handelt es sich um ein sehr interessantes Ergebnis da es so zu einer Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NFAT kommen kann. Tiefgreifende

Referenzen fehlen, und zudem ist eine Aktivierung von NFAT auch auf anderem Weg möglich.

DUSP10

Dualspezifische Protein Phosphatasen (DUSP) inaktivieren ihre Zielkinasen durch Phosphorylierung sowohl der Phosphoserin/Threonin- als auch der Phosphotyrosinanteile. Diese Phosphatasen wirken negativ regulierend auf verschiedene Mitglieder der MAPK Superfamilie (MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38), dementsprechend besteht eine Einflussnahme der DUSPs auf die zelluläre Proliferation und Differenzierung. Die verschiedenen Mitglieder der DUSP Familie zeigen innerhalb ihrer Eigenschaften deutliche Unterschiede, u.a. bezüglich ihrer Substratspezifität für verschiedene MAPKs, - der unterschiedlichen Gewebsverteilung und subzellulären Lokalisation sowie letztendlich auch durch die teilweise verschiedenartige Induzierbarkeit über extrazelluläre Stimuli. Das Genprodukt des DUSP10/MKP-5 Genes bindet und inaktiviert p38 sowie SAPK/JNK, jedoch nicht an MAPK/ERK. DUSP10 ist zytoplasmatisch- genauso wie nukleär lokalisiert und zeigt somit eine einzigartige subzelluläre Lokalisation innerhalb der dualspezifischen Phosphatasen. Dieses Gen wird in einer Vielfalt von Geweben und Organen exprimiert; die Expression kann dabei durch Stress-Stimuli gesteigert werden. Für das DUSP10 Gen werden drei Transkriptvarianten beschrieben aus denen zwei unterschiedliche Isoformen resultieren. Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinasen sind essentielle Regulatoren der Immunantwort, deren Aktivität durch Kinasen und Phosphatasen moduliert wird. Die MAP Kinase Phosphatase (MKP) 5 ist eine von verschiedenen dual-spezifischen Phosphatasen. Zhang Y. et al. untersuchten die native- und erworbene Immunantwort in MKP-5/DUSP10 defizienten Mäusen. Aus der MKP-5 Abwesenheit resultiert eine selektiv gesteigerte JNK („Jun NH2-terminal kinase“) Aktivität, zudem wurde in den entsprechenden Zellen die Produktion von proinflammatorischen Cytokinen während der nativen Immunantwort weit reichend gesteigert, ebenso wurde eine erhöhte T-Zellaktivierung im Vergleich zur Kontrollgruppe beschrieben (Zhang Y. et al. 2004). Für Prostata-Krebs (spez. 1E8 Zellen) zeigt der p38 Signalleitungsweg eine relevante Bedeutung für den invasiven Charakter, diesbezüglich ist noch einmal festzuhalten, dass MKP-5/DUSP10 entscheidend regulierend an der p38 Wirkung beteiligt ist (He H.Y. et al. 2003). Eine kokulturell um das 2,8fache gesteigerte Expression dieses Moleküles kann darauf hindeuten, dass sich das Ausmaß der Proliferation und Differenzierung einer Tumorzelle nach Gefäßanschluß ebenso wie die Immunantwort reduzieren.

PKP2

Dieses Gen verschlüsselt für ein Mitglied der Armadillo (arm-repeat) und Plakophilin Gen Familie. Plakophilin Proteine enthalten verschiedene Armadillo Wiederholungen, sind an den zellulären Desmosomen und Nuklei lokalisiert und sind letztendlich an der Bindung von Cadherinen an intermediäre Filamente des Cytoskeletons beteiligt. Dieses Genprodukt reguliert die Signalwirkung von beta-Catenin. Es werden zwei alternative Spleißvarianten mit zwei daraus folgenden Transkriptvarianten beschrieben. Nach Mertens et al. ist Plakophilin ein weit verbreitetes Protein mit doppelter Lokalisation. Einerseits scheint es als ein konstitutives karyoplasmatisches Protein zu sein und andererseits wird es als Bestandteil der desmosomalen Plaque, fast aller Desmosomen-verarbeitender Gewebe und Zelllinien, beschrieben. Ebenfalls nach Mertens et al. wird dargestellt, dass monoklonale Antikörper (mAbs: „monoclonal antibodies“) gegen PKP2 zur Identifizierung und Charakterisierung von Karzinomen (ausgehend von einfachen und komplexen Epithelien) dienen können (Mertens C. et al. 1999). Plakophiline (PKPs) sind Mitglieder in der Armadillo Multigenfamilie. Armadillo-zugehörige Proteine fungieren sowohl in der Zelladhäsion als auch in der Signaltransduktion und sind zudem entscheidend an der Tumorgenese beteiligt (Papagerakis S. et al. 2003). Plakophilin 2 kann mit verschiedenen desmosomalen Komponenten wie Semoplakin, Plakoglobin, Desmoglein 1 und 2, und Desmocollin 1a und 2a interagieren. Dabei ist die Kopfdomäne von Plakophilin 2 entscheidend für die meisten dieser Interaktionen und ist zudem ausreichend um Plakophilin 2 zu den Zellgrenzen zu leiten. Im Vergleich zu Plakophilin 1 ist Plakophilin 2 weniger effizient in der Lokalisierung am Nukleus und der Verstärkung von Desmoplakin an der Zellmembran in einem Übermaß. Plakophilin 2 ist durch seine Kopfdomäne in der Lage an Beta-Catenin zu binden, zudem bewirkt die Expression von Plakophilin 2 in SW480 Zellen eine positive Regulation der endogenen Beta-Catenin/T-Zellfaktor-Signalisierungs-Aktivität. Diese positive Regulation durch Plakophilin 2 wird begründet durch ektopische Expression von E-Cadherin, suggerierend, dass diese Proteine für den gleichen Pool des signalisierenden aktiven Beta-Catenin konkurrieren.. (Chen X. et al. 2002). PKP 2 wurde in der untersuchten Tumor-Endothelzellkultur 1,8fach verstärkt exprimiert. Kurzen et al. untersuchten unter dem Hintergrund, dass metastasierende Zellen ihre Adhäsivität durch Herabregulierung verschiedener desmosomaler Proteine verlieren, die aktinische Keratose, die „Bowens Erkrankung“ und das Plattenepithelkarzinom der Haut auf die Expression von desmosomalen Proteinen. Dabei wird unter anderem beschrieben, dass Plakophilin 2 in keiner der geprüften Proben exprimiert wurde und demzufolge auch keine Relevanz für den metastatischen Prozess habe (Kurzen et al. 2003). Auch Villaret DB. et al. untersuchten Expression von Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu normalem Gewebe. Auch hier zeigte sich u.a. eine relevante Expression von Plakophilin 1, jedoch nicht von Plakophilin 2 (Villaret D.B. et al. 2000). Papagerakis S et al. untersuchten ebenfalls

Plattenepithelkarzinome des Oropharynx, unter Betracht der Ausbildung von Fernmetastasen auf deren Immunoreaktivität von PKP1 bis PKP4. Dabei zeigten 85% der metastatischen Tumore eine hohe PKP2 Immunoreaktivität. Trotzdem weisen Papagerakis et al. auf die Notwendigkeit weiterer Untersuchung zur Bestimmung der wirklichen Funktion der PKPs als kausale Faktoren innerhalb der oralen Tumorigenese oder als phänotypisches Charakteristikum des entsprechenden Gewebes hin (Papagerakis S. et al. 2003).

DEFA3 (HNP-3)

Defensine sind eine Familie von mikrobiziden und cytotoxischen Peptiden, welche in der Wirtseigenen Abwehr involviert sind. Sie sind im Übermaß in den Granula der Neutrophilen vorhanden und liegen zudem in den mukosalen Oberflächen (z.B. des intestinalen- und des respiratorischen Traktes, des Harnapparates und der Vagina) vor. Die Mitglieder der Defensin Familie sind höchst ähnlich in ihrer Proteinsequenz und unterscheiden sich durch ein erhaltenes Cystein Motiv. Verschiedene alpha Defensine scheinen in einem Cluster auf Chromosom 8 versammelt zu sein. Defensin alpha 3 liegt in den mikrobiziden Granula der Neutrophilen vor und scheint an der Phagozyten vermittelten Abwehr beteiligt zu sein. Defensin alpha 3 und Defensin alpha 1 unterscheiden sich durch nur eine Aminosäure. Lundy FT. et al. beschreiben eine Überexpression von HNP1-3 für Plattenepithelkarzinome der Zunge im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe, schlussfolgernd wird in dem Kontext ihrer onkolytischen Aktivität impliziert, dass alpha Defensine an der wirtseigenen Abwehr gegen orale Plattenepithelkarzinome beteiligt sind (Lyndy F.T. et al. 2004). Ebenso steigern HNPs die endotheliale Apoptose, regulieren die endotheliale Adhäsion, Migration und Proliferation in vitro. Dementsprechend ist der Einfluss der HNPs auf die Neovaskularisierung klar erkennbar. Diesbezüglich wird auch eine Inhibierung der kapillären Tubenformation durch die HNPs (ausgenommen: HNP2) beschrieben. (Lyndy F.T. et al. 2004) In diese Zusammenhänge lässt sich die Expression von HNP3, welche kokulturell um den Faktor 1,7 gesteigert vorlag, gut eingliedern.

CCND2

Das durch dieses Gen verschlüsselte Protein ist der hoch erhaltenen Cysteinfamilie zuzuordnen, Mitglieder dieser Familie zeigen in einer deutlichen Periodizität eine Proteinabundanz innerhalb des Zellzyklus. Cycline wirken als Regulatoren der CDK Kinasen. Die unterschiedlichen Cycline bilden unterschiedliche Expressions- und Spaltungsmuster aus und tragen somit zur zeitlichen Koordination jedes mitotischen Ereignisses bei. CCND2 formt einen Komplex mit- und fungiert als regulatorische Untereinheit von CDK4 oder CDK6 (deren Funktion wird für den Übertritt vom G1- ins S-

Stadium benötigt). Ebenso interagiert CCND2 mit dem Tumorsuppressorprotein Rb und ist an dessen Phosphorylierung beteiligt. Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen („cyclin-dependent kinases“ – CDKs) sind zentrale Regulatoren des Zellzyklus. Deren abnormale Expression zieht möglicherweise einen Verlust der Zellzykluskontrolle nach sich und resultiert somit im autonomen Wachstum, einem entscheidenden Charakteristikum verschiedenster Neoplasien (Zhang S.Y. et al. 1997). Nach Zhang S.Y. et al. exprimierten aggressivere Tochterzelllinien einer Plattenepithelkarzinomzelllinie der Haut (Maus) im Vergleich zu deren elterlicher Zelllinie deutlich mehr Cyclin D2 und Cyclin D3. Anders als Cyclin D3 wurde Cyclin D2 jedoch in metastatischen Zelllinien im Vergleich zu Primärtumoren nicht erhöht exprimiert und ist demnach auch nicht mit einer erhöhten Aggressivität dieser Plattenepithelkarzinomzelllinie zu assoziieren (Zhang S.Y. et al. 1997). Abschließend fassen Zhang S.Y. et al. zusammen, dass die proliferative Dysfunktion verschiedenster Komponenten der Zellzyklusmaschinerie ein entscheidender Schritt der Karzinogenese ist und verweist letztendlich auf die molekulare Relevanz einer Überexpression von G1 Cyclinen und deren Cdk's als Schritt in eine weitere Tumorprogression (Zhang S.Y. et al. 1997). Jeon G.A. et al. fertigten ein Genexpressionsmuster von 25 Plattenepithelkarzinomzelllinien und einer humanen oralen Keratinozytenzelllinie an und untersuchten dieses auf Expressionsunterschiede die folglich als zur Zellproliferation assoziierte Gene betrachtet wurden. In diesem Zusammenhang wird auch CCND2, als Zellzyklusregulator, differentiell exprimiert (Jeon G.A. et al. 2004). Liu S.C. et al. untersuchten die Bedeutung der Cyclin D2 Expression in 10 humanen Plattenepithelkarzinomzelllinien bezüglich der Tumorprogression. Dabei fiel auf, dass solche Zelllinien, die eine hohe CCND2 Expression zeigen auch ein stärkeres invasives Potential unter in vivo Verhältnissen hatten (Liu S.C. et al. 2002). Die Datenanalyse ergab hier einen Expressionsunterschied zwischen Rein- und Mischkultur um den Faktor 1,6, was sich gut den obigen Schilderungen zuordnen lässt.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit verfolgt die Zielstellung die transkriptionelle Aktivität von Plattenepithelkarzinomzellen in Abhängigkeit der An- oder Abwesenheit von Endothelzellen mittels einer umfassenden Genexpressionsanalyse zu untersuchen. Der Genexpressionsvergleich zwischen Tumorreinkultur und Tumor-Endothelzellkokultur zeigte deutliche Expressionsunterschiede, so wurde der Einfluss des tumorumgebenden Gewebes im Verlauf der Arbeit immer deutlicher. Ebenso zeigt sich die Bedeutung von komplexen in vitro Kokulturen und deren umfassende Genexpressionsanalyse zur Simulation von in vivo Vorgängen.

Tumorreinkulturell wurden u.a. Interleukine- (IL1A, IL8), Chemokine (CXCL1, CCL20, CXCL3 und CX3CL1), die ‚Tumor Nekrosis Faktors‘ TNFAIP2, TNFRSF6 und TRAF4, und ebenso die angiogenen Faktoren ECGF und Angiogenin erhöht exprimiert. Gegensätzlich dazu zeigte die Tumor-Endothelzellkokultur eine erhöhten Expression von PLAUR, ESDN, GFI-1, ID-3, CCND2 und zudem wurde der MAP-Kinase-Stoffwechselweg an mindestens fünf seiner Einzelkomponenten positiv beeinflusst (CACNG6, DUSP10, RASGRP1, TNFRSF6, CXCL1). In der Tumorreinkultur ist es zu einer Expression von positiv angiogenproliferativen Faktoren gekommen. Die expressionellen Charakteristika der Tumorreinkultur zeigen einen sehr aktiven Tumorstoffwechsel, der auf angiogenetische Induktion, Zellproliferation, Wachstum und Apoptoseinhibition hinzielt. Kokulturell steht weniger die Expression von proangiogenetischen Faktoren im Vordergrund als die Expression von Faktoren der Invasion, Migration und Metastasierung. Der Tumorzelle genügt demnach die Simulation eines Gefäßplexus durch die endotheliale Anwesenheit innerhalb einer in-vitro Tumor-Endothelzellkokultur um von einem proangiogenen Expressionsschema hin zum invasiven und metastasierenden Expressionsmuster zu gelangen.

Sowohl der Einsatz moderner Methoden zur Genexpressionsanalyse als auch die in vitro Kokultur ermöglichte die Darstellung der interzellulären Einflussnahme. Im Anschluss an diese Untersuchung wäre es von großem Interesse das gleiche Verfahren an einer Endothel- vs. Tumor-Endothelzellkokultur durchzuführen um die endotheliale Reaktion auf die Anwesenheit der Tumorzelle untersuchen zu können. Der dann mögliche Einblick in den tumor-endothelialen Gesamtkontext bringt sicher eine Reihe überraschender Ergebnisse und Zusammenhänge hervor.

7 Literaturverzeichnis

1. Aarstad A.K., Aarstad H.J., Bru E., Olofsson J.: Dec Psychological coping style versus disease extent, tumour treatment and quality of life in successfully treated head and neck squamous cell carcinoma patients. *Clin Otolaryngol.* 30(6):530-8. (2005)
2. Aird W.C.: Endothelial cell dynamics and complexity theory. *Crit Care Med*; 30(5 Suppl):S180–S185 (2002)
3. Aird W.C.: Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med*; 31(4 Suppl): S221–S230 (2003)
4. Akiri G., Sabo E., Dafni H., Vadasz Z., Kartvelishvily Y.: Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. *Cancer Res.* ;63:1657–1666. (2003)
5. Al-Rawi M.A., Mansel R.E., Jiang W.G., Interleukin-7 (IL-7) and IL-7 receptor (IL-7R) signalling complex in human solid tumours. *Histol Histopathol.*;18(3):911-23. (2003)
6. Anayama T, Furihata M, Takeuchi T, Sonobe H, Sasaguri S, Matsumoto M, Ohtsuki Y. Insufficient effect of p27(KIP1) to inhibit cyclin D1 in human esophageal cancer in vitro. *Int J Oncol*; 18:151-5 (2001)
7. Augustin H. G.: Antiangiogenic tumour therapy: Will it work? *Trends Pharmacol. Sci.*, 19, 216—222 (1998)
8. Badet J., Soncin F., Guitton J.-D., Lamare O., Cartwright T. & Barritault D.: *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86, 8427-8431 (1989)
9. Bazan J.F., Bacon K.B., Hardiman G., Wang W., Soo K., Rossi D., Greaves D.R., Zlotnik A., Schall T.J.: A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 385:640-644 (1997)
10. Bafico A., Liu G., Yaniv A., Gazit A., Aaronson S.A.: Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* 3:683–686. (2003)
11. Baker H., Patel V., Molinolo A.A., Shillitoe E.J., Ensley J.F., Yoo G.H., Meneses-Garcia A., Myers J.N., El-Naggar A.K., Gutkind J.S., Hancock W.S.: Proteome-wide analysis of head and neck squamous cell carcinomas using laser-capture microdissection and tandem mass spectrometry. *Oral Oncol.*;41(2):183-99. (2005)
12. Baldwin A.L., Thurston G.: Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Crit Rev Biomed Eng* 29: 247-278. (2001)
13. Bancroft C.C., Chen Z., Dong G., Sunwoo J.B., Yeh N., Park C., Van Waes C.: Coexpression of proangiogenic factors IL-8 and VEGF by human head and neck

- squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF-kappaB signal pathways. *Clin Cancer Res*;7(2):435-42. (2001)
14. Bancroft C.C., Chen Z., Yeh J., Sunwoo J.B., Yeh N.T., Jackson S., Jackson C., Van Waes C.: Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, PI3K and MEK signal kinases on NF-kappaB and AP-1 activation and IL-8 and VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *Int J Cancer*. ;99(4):538-48. (2001)
 15. Barcelos L.S., Talvani A., Teixeira A.S., Cassali G.D., Andrade S.P., Teixeira M.M.: Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm Res*.;53(10):576-84. (2004)
 16. Baron M.H.: Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog-mediated signals. *Differentiation* ; 68: 175-185 (2001)
 17. Battegay E.J.: Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects, *J Mol Med* 73, pp. 333–346. (1995)
 18. Batzler W.U., Bertz J., Eisinger B., Hentschel S., Husmann G., Kieschke J., Lehnert M., Oberhausen R., Schmidtman I., Schneider D.: Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends 3. Auflage, Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbrücken, 16-9 (2002)
 19. Bayas A., Hummel V., Kallmann B.A., Karch C., Toyka K.V., Rieckmann P.: Human cerebral endothelial cells are a potential source for bioactive BDNF. *Cytokine*;19(2):55-8. Review. (2002)
 20. Beckers J., Herrmann F., Rieger S., Drobyshev A.L., Horsch M., Hrabe de Angelis M., Seliger B.: Identification and validation of novel ERBB2 (HER2, NEU) targets including genes involved in angiogenesis. *Int J Cancer*.;114(4):590-7. (2005)
 21. Belperio J.A., Keane M.P., Arenberg D.A., Addison C.L., Ehler J.E., Burdick M.D., Strieter R.M.: CXC chemokines in angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 68:1–8. (2000)
 22. Berta M., Brahimi-Horn C., Pouyssegur J.: Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor-1alpha (HIF-1alpha): a breath of fresh air in hypoxia research *J Soc Biol*.; 198(2):113-20 (2004)
 23. Berx G., Cleton-Jansen A.M., Nollet F., de Leeuw W.J., van de Vijver M., Cornelisse C., van Roy F. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J.*, 14, 6107–6115. (1995)
 24. Blot W.J., McLaughlin J.K., Winn D.M.: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer *Cancer Res*, 48: 3282-87, (1988)
 25. Bodmer, J. L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis J., Tschopp J. *Nat. Cell Biol.* 2, 241–243 (2000)
 26. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH.: A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res*.; 63(8):1727-30 (2003)
 27. Bradley J.R., Pober J.S.: Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene*;20(44):6482-91 (2001)

28. Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J.: The hypoxia-inducible factor and tumor progression along the angiogenic pathway. *Int Rev Cytol.*; 242:157-213. (2005)
29. Breyer, R.M. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 661–690 (2001)
30. Brignolo A., Garzino-Demo P., Poglio G., Gallesio C., Seminario M., Angelini G., Berrone S.: Sep-Oct Incidence of psychopathologic symptoms in patients treated for mouth cancer *Minerva Stomatol.* (9-10):299-307(2001)
31. Bouquot JE, Kurland LT, Weiland LH.: Carcinoma in situ of the upper aerodigestive tract. Incidence, time trends, and follow-up in Rochester, Minnesota, 1935-1984. *Cancer.*;61(8):1691-8. (1998)
32. Bowie E.J.W., Solberg L.A., Fass D.N.: Transplantation of normal bone marrow into a pig with severe von Willebrand's disease. *Journal of Clinical Investigation*; 78: 26±30 (1986)
33. Brachman D.G.: Molecular biology of head and neck cancer. *Semin Oncol.*; 21(3):320-9. (1994)
34. Bross I.D.J., Coombs J.: Early onset of oral cancer among women who drink and smoke *Oncology*, 33: 136-9 (1976)
35. Browman G.P., Wong G., Hodson I., Sathya J., Russell R., McAlpine L., Skingley P., Levine M.N.: Influence of cigarette smoking on the efficiency of radiation therapy in head and neck cancer *N Engl J Med*, 328: 159-63, (1993)
36. Buckley J.G., Feber T.:Surgical treatment of cervical node metastases from squamous carcinoma of the upper aerodigestive tract: evaluation of the evidence for modifications of neck dissection. *Head Neck.*; 23(10):907-15. (2001)
37. Budd R.C.: Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis *J Clin Invest.*; 109(4): 437-442 (2002)
38. Burgess W H, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem*;58:575–606. (1989)
39. Burgess D.L., Gefrides L.A., Foreman P.J., Noebels J.L.: A cluster of three novel Ca²⁺ channel gamma subunit genes on chromosome 19q13.4: evolution and expression profile of the gamma subunit gene family. *Genomics.*;71(3):339-50. (2001)
40. Butcher E:C.: Leukocyte-endothelial cell recognition – Three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* ;67: 1033–1036 (2001)
41. Campbell J.J., Hedrick J., Zlotnik A., Siani M.A., Thompson D.A., Butcher E.: *C. Science* 279, 381-384 (1998)
42. Cao X., E. W. Shores, L. J. Hu, M. R. Anver, B. L. Kelsall, S. M. Russell, J. Drago, M. Noguchi, A. Grinberg, E. T. Bloom: Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 2:223-238 (1995)
43. Carmeliet P., Jain R.K.: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.*; 407(6801):249-57. (2000)

-
44. Carmeliet P.: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*;6: 389–95 (2000)
 45. Carmeliet P.: Angiogenesis in health and disease, *Nat Med* 9, pp. 653–660.(2003)
 46. Carreira C.M., LaVallee T.M., Tarantini F., Jackson A., Lathrop J.T., Hampton B., Burgess W.H., Maciag, T. S100A13 is involved in the regulation of fibroblast growth factor-1 and p40 synoptagmin-1 release in vitro. *J. Biol. Chem.*, 273, 22224–22231 (1998)
 47. Casey J.R., Petranka J.G., Kottra J., Fleenor D.E., Rosse W.F.: The structure of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *Blood*.;84(4):1151-6. (1994)
 48. Chambers R.C., Leoni P., Kaminski N., Laurent G.J., Heller R.A.: Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor-beta1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. *Am J Pathol.*; 162(2):533-46. (2003)
 49. Charbonnier A.S., Kohrgruber N., Kriehuber E., Stingl G., Rot A., Maurer, D. J. *Exp. Med.* 190, 1755-1768 (1999)
 50. Chen X., Bonne S., Hatzfeld M., van Roy F., Green K.J.: Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling. *J Biol Chem.*22;277(12):10512-22. (2002)
 51. Cheng Y.: Role of prostacyclin in the cardiovascular responseto thromboxane A2. *Science.* 296:539–541. (2002)
 52. Choi K.: The hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11: 91-101 (2002)
 53. Chu T.Y., Shen C.Y., Lee H. S., Liu H. S.: Monoclonality and surface lesion-specific microsatellite alterations in premalignant and malignant neoplasia of uterine cervix: a local field effect of genomic instability and clonal evolution. *Genes Chromosomes Cancer*, 24: 127-134 (1999)
 54. Claypool S.M., Dickinson B.L., Wagner J.S., Johansen F.E., Venu N., Borawski J.A., Lencer W.I., Blumberg R.S.: Bidirectional transepithelial IgG transport by a strongly polarized basolateral membrane Fcgamma-receptor. *Mol Biol Cell.*;15(4):1746-59 (2004)
 55. Cohen G.B., R.T. Gandhi, D.M. Davis, O.Mandelboim, B.K. Chen, J.L. Strominger, D.Baltimore.: The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* 10:661. (1999)
 56. Conejo-Garcia J.R., Benencia F., Courreges M.C., Kang E., Mohamed-Hadley A., Buckanovich R.J., Holtz D.O., Jenkins A., Na H., Zhang L., Wagner D.S., Katsaros D., Carroll R., Coukos G.: Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nat Med.*;10(9):950-8. (2004)

-
57. Cook D.N., Prosser D.M., Forster R., Zhang J., Kuklin N.A., Abbondanzo S.J., Niu X.D., Chen S.C., Manfra D.J., Wiekowski M.T., Sullivan L.M., Smith S.R., Greenberg H.B., Narula S.K., Lipp M., Lira, S.A. *Immunity* 12, 495-503 (2002)
 58. Cucina A.: Shear stress induces transforming growth factorbeta 1 release by arterial endothelial cells. *Surgery*. 123:212–217. (1998)
 59. David F.N., Johnson N.L.: The effect of non-normality on the power function of the F-test in the analysis of variance. *Biometrika*. (1-2):43-57 (1951)
 60. Day G.L., Blot W.J., Shore R.E., McLaughlin J.K., Austin D.F., Greenberg R.S., Liff J.M., Preston-Martin S., Sarkar S., Schoenberg J.B. et al.: Second cancers following oral and pharyngeal cancers: role of tobacco and alcohol *J Natl Cancer Inst*, 86: 131-7, (1994)
 61. de Graaf J.C., Banga J.D., Moncada S., Palmer R.M., de Groot P.G., Sixma J.J.: Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 85: 2284-2290. (1992)
 62. Dejana E., Corada M., Lampugnani M.G.: Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 9: 910-918. (1995)
 63. Dickson C., Spencer-Dene B., Dillon C., Fantl V.: Tyrosine kinase signalling in breast cancer: Fibroblast growth factors and their receptors. *Breast Cancer Res.*; 2(3): 191-196. (2000)
 64. Ding Z., Gillespie L.L., Paterno G.D.: Human MI-ER1 alpha and beta function as transcriptional repressors by recruitment of histone deacetylase 1 to their conserved ELM2 domain. *Mol Cell Biol.*;23(1):250-8. (2003)
 65. DiSanto J.P., W. Muller, D. Guy-Grand, A. Fischer, K. Rajewsky: Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:377-381 (1995)
 66. DiVietro J.A., Smith M.J., Smith B.R., Petruzzelli L., Larson R.S., Lawrence M.B.: Immobilized IL-8 triggers progressive activation of neutrophils rolling in vitro on P-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*;167: 4017–4025 (2001)
 67. Doan L.L., Kitay M.K., Yu Q., Singer A., Herblot S., Hoang T., Bear S.E., Morse H.C.: Growth factor independence-1B expression leads to defects in T cell activation, IL-7 receptor alpha expression, and T cell lineage commitment. *J Immunol.*;170(5):2356-66. (2003)
 68. Doan L.L., Porter S.D., Duan Z., Flubacher M.M., Montoya D., Tschlis P.N., Horwitz M., Gilks C.B., Grimes H.L.: Targeted transcriptional repression of Gfi1 by GFI1 and GFI1B in lymphoid cells. *Nucleic Acids Res.*;32(8):2508-19. Print 2004. PMID: 15131254 (2004)
 69. Dobbs S.P., Brown L.J., Ireland D., Abrams K.R., Murray J.C., Gatter K., Harris A., Steward W.P., O'Byrne K.J.: Platelet-derived endothelial cell growth factor expression and angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the cervix. *Ann Diagn Pathol.*;4(5):286-92. (2000)

-
70. Donovan M.J., Lin M.I., Wiegand P., Ringstedt T., Kraemer R., Hahn R., Wang S., Ibanez C.F., Rafii S., Hempstead B.L. Brain-derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development*, 127, 4531–4540. (2000)
 71. Duan Z., Horwitz M.: Targets of the transcriptional repressor oncoprotein Gfi-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ; 100(10): 5932-5937. (2003)
 72. Dus D., Krawczyński A., Zalecki P., Paprocka M., Wiedlocha A., Goupille C., Kieda C.: IL-7 receptor is present on human microvascular endothelial cells. *Immunol Lett.*;86(2):163-8. (2003)
 73. Emeis J.J.: The control of tPA and PAI-1 release from the vessel wall. *Vascular Medicine Review*; 6:153±166. (1995)
 74. Emeis J.J.: van den Eijnden-Schrauwen Y, van den Hoogen CM et al. An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator. *Journal of Cell Biology*; 139: 245±256. (1997)
 75. Esparza E.M., Arch R.H.: TRAF4 functions as an intermediate of GITR-induced NF-kappaB activation. *Cell Mol Life Sci.*;61(24):3087-92. (2004)
 76. Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol*;237: 1–30 (1999)
 77. Ferrara N.: VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*;2: 795–803. (2002)
 78. Fillies T., Werkmeister R., van Diest P.J., Brandt B., Joos U., Buerger H.: HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer.*; 5:84 (2005)
 79. Fleckenstein D.S., Dirks W.G., Drexler H.G., Quentmeier H.: Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 4 is a new binding partner for the p70S6 serine/threonine kinase. *Leuk Res.*; 27(8):687-94. (2003)
 80. Folkman J., D'Amore P. A.: Blood Vessel Formation: What Is Its Molecular Basis? *Cell*, 87, 1153—1155 (1996)
 81. Forsti A., Louhelainen J., Soderberg M., Wijkstrom H., Hemminki K.: Loss of heterozygosity in tumour-adjacent normal tissue of breast and bladder cancer. *Eur. J. Cancer*, 37: 1372-1380 (2001)
 82. Franklin W.A., Gazdar A.F., Haney J., Wistuba I.I., La Rosa F.G., Kennedy T., Ritchey D.M., Miller Y.E.: Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis. *J. Clin. Invest.*, 100: 2133-2137 (1997)
 83. Friesel R.E. and Maciag T.: Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB J.*, 9, 919–925. (1995)
 84. Fuchs T., Allgayer H.: Transcriptional regulation of the urokinase receptor (u-PAR)-- a central molecule of invasion and metastasis. *Biol Chem.*;384(5):755-61. (2003)
 85. Fujisawa H., Nakayama K., Nomura T., Kawachi Y., Otsuka F.: Interleukin-1 and lipopolysaccharide enhance intercellular adhesion molecule-1 expression in cell lines of human squamous cell carcinoma. *J Dermatol Sci.*;14(2):109-14. (1997)

86. Fujisawa N., Hayashi S., Kurdowska A., Carr F.K., Miller E.J.: Inhibition of GROalpha-induced human endothelial cell proliferation by the alpha-chemokine inhibitor antileukinate. *Cytokine.*;11(3):231-8. (1999)
87. Fulda S., Wick, M. Weller, K. M. Debatin.: Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat. Med.* 8:808. (2002)
88. Gardiner C. M.: Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 polymorphism. *J. Immunol.* 166, 2992–3001 (2001).
89. Gellert G.C., Goldfarb R.H., Kitson R.P.: Physical association of uPAR with the alphaV integrin on the surface of human NK cells. *Biochem Biophys Res Commun.*; 315(4):1025-32. (2004)
90. Gerber H.P., Malik A.K., Solar G.P.: VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*; 417:954–8. (2002)
91. Gillitzer R., Goebeler M.: Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.*; 69(4):513-21. (2001)
92. Gomez-Lozano N., Estefania E., Williams F., Halfpenny I., Middleton D., Solis R., Vilches C.: The silent KIR3DP1 gene (CD158c) is transcribed and might encode a secreted receptor in a minority of humans, in whom the KIR3DP1, KIR2DL4 and KIR3DL1/KIR3DS1 genes are duplicated. *Eur J Immunol.*;35(1):16-24. (2005)
93. Gonzalez-Sancho J.M., Aguilera O., Garcia J.M., Pendas-Franco N., Pena C., Cal S., Garcia de Herreros A., Bonilla F., Munoz A.: The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene.*; 24(6):1098-103. (2005)
94. Goodwin W.J. Jr., Byers P.M.: Nutritional management of the head and neck cancer patient *Med Clin North Am*, 77: 597-610, (1993)
95. Gourin C.G., McAfee W.J., Neyman K.M., Howington J.W., Podolsky R.H., Terris D.J.: Effect of comorbidity on quality of life and treatment selection in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope.* 115(8):1371-5. (2005)
96. Graham, S., Dayal, H., Rohrer, T., Swanson, M., Sultz, H., Shedd, D., Fischman, S.: Dentition, diet, tobacco and alcohol in the epidemiology of oral cancer *J Natl Cancer Inst*, 59: 1611-8 (1977)
97. Gumperz J. E., Litwin V., Phillips J. H., Lanier L. L. & Parham P.: The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J. Exp. Med.*181, 1133–1144 (1995).
98. Gumperz J.E., N.M. Valiante, P. Parham, L.L. Lanier, D. Tyan. Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. *J. Exp. Med.* 183:1817 (1996)

-
99. Hadari Y.R., Kouhara H., Lax I., Schlessinger J.: Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol Cell Biol*; 18:3966–3973 (1998)
100. Han W., Ding P., Xu M., Wang L., Rui M., Shi S., Liu Y., Zheng Y., Chen Y., Yang T., Ma D.: Identification of eight genes encoding chemokine-like factor superfamily members 1-8 (CKLFSF1-8) by in silico cloning and experimental validation. *Genomics*.; 81(6):609-17. (2003)
101. Han X.M., Zhou H.H.: Expression of Cytochrome P450 Enzymes in Human Nasopharyngeal Carcinoma and Non-cancerous Nasopharynx Tissue] *Ai Zheng*.;23(6):672-7. Chinese. PMID: 15191668 (2004)
102. Han X.M., Zhou H.H.: Polymorphism of CYP450 and cancer susceptibility. *Acta Pharmacol Sin*.;21(8):673-9. (2000)
103. Hanahan D., Folkman J.: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*; 86: 353-364. (1996)
104. Harper N., Hughes M.A., Farrow S.N., Cohen G.M., MacFarlane M.: Protein kinase C modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by targeting the apical events of death receptor signaling. *J Biol Chem*.;278(45):44338-47.(2003)
105. Harper N., Farrow S.N., Kaptein A., Cohen G.M., MacFarlane M.: *J. Biol. Chem.* 276, 34743–34752 (2001)
106. Harris A. L.: Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth *Nat. Rev. Cancer*, 2, 38—47 (2002)
107. Hart K.C., Robertson S.C., Kanemitsu M.Y., Meyer A.N., Tynan J.A., Donoghue D.J.: Transformation and Stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3, and FGFR4. *Oncogene*.; 19(29):3309-20. (2000)
108. Hashibe M., P. Brennan, R.C. Strange, R. Bhisey, I. Cascorbi, P. Lazarus, M. B.O. Ophuis, S. Benhamou, W.D. Foulkes, T. Kato, C. Coutelle, M. Romkes, L. Gaspari, E. Taioli, P. Boffetta: Meta- and Pooled Analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 Genotypes and Risk of Head and Neck Cancer *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*; 12(12): 1509 - 1517. (2003)
109. He H.Y., Fang W.G., Zheng J., You J.F., Heng W.J., Li Y.: Mechanism of the mitogen-activated protein kinase phosphatase-5 regulating the growth and invasion of a human prostate cancer cell line
110. Heyninck K., Denecker G., De Valck D., Fiers W., Beyaert R.: Inhibition of tumor necrosis factor-induced necrotic cell death by the zinc finger protein A20. *Anticancer Res.*; 19(4B):2863-8 (1999)
111. Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA.: PDGF, TGF- β , and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol.*;141:805– 814. (1998)

- 112.**Hirschi KK, Rohovsky SA, Beck LH, Smith SR, D'Amore PA.: Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ Res.*;84:298 –305 (1999)
- 113.**Hogben C.A.: A practical and simple equivalent for student's T TEST of statistical significance. *J Lab Clin Med* 1964 Nov ;64:815-9 (1964)
- 114.**Homey B., A. Müller, A. Zlotnik: Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat. Rev. Immunol.* 2:175–184. (2002)
- 115.**Homey B., Dieu-Nosjean M.C., Wiesenborn A., Massacrier C., Pin J.J., Oldham E., Catron D., Buchanan M.E., Müller A., deWaal M.R., Deng G., Orozco R., Ruzicka T., Lehmann P., Lebecque S., Caux C., Zlotnik A. *J. Immunol.* 164, 6621-6632 (2002)
- 116.**Hooley R., Levine H., Flores T.C. et al.: Predicting postoperative head and neck complications using nutritional assessment *Arch Otolaryngol*, 109: 83-8, (1983)
- 117.**Hoover D.M., Boulegue C., Yang D., Oppenheim J.J., Tucker K., Lu W., Lubkowski J.: The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins.*J Biol Chem.*; 277(40):37647-54. (2002)
- 118.**Houck K.A.: The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.* 5, 1806–1814 (1991)
- 119.**Howell G.M., Grandis J.R.: Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 27(8):710-7 (2005)
- 120.**Huang D.T., Johnson C.R., Schmidt-Ullrich R., Grimes M.: Post-operative radiotherapy in head and neck carcinoma with extra capsular lymph node extension and/or positive resection margins: a comparative study *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 23: 737-42, (1992)
- 121.**Huang Z., Bao S.D.: Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol.*; 10(4):463-70. (2004)
- 122.**Husain Z., C.A. Alper, E.J. Yunis, D.P. Dubey: Complex expression of natural killer receptor genes in single natural killer cells. *Immunology* 106:373. (2002)
- 123.**Hwang R., Varner J.: The role of integrins in tumor angiogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am.*; 18(5):991-1006, (2004)
- 124.**Ichikawa K., W. Liu, L. Zhao, Z. Wang, D. Liu, T. Ohtsuka, H. Zhang, J.D. Mountz, W.J. Koopman, R.P. Kimberly, T. Zhou: Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat. Med.* 7:954. (2001)
- 125.**Ignar D.M., Andrews J.L., Witherspoon S.M., Leray J.D., Clay W.C., Kilpatrick K., Onori J., Kost T., Emerson D.L.: Inhibition of establishment of primary and micrometastatic tumors by a urokinase plasminogen activator receptor antagonist. *Clin Exp Metastasis.*; 16(1):9-20. (1998)
- 126.**Ikawa S., Uematsu F., Watanabe K., Kimpara T., Osada M., Hossain A., Sagami I., Kikuchi H., Watanabe M.: Assessment of cancer susceptibility in humans by use of

- genetic polymorphisms in carcinogen metabolism. *Pharmacogenetics*; 5 Spec No:S154-60. (1995)
- 127.** Imaizumi T., Yoshida H., Satoh K.: Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb.*; 11(1):15-21. (2004)
- 128.** Imamura, T.: Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science*, 249, 1567–1570. (1990)
- 129.** Imamura T., Oka S., Tanahashi T., Okita Y.: Cell cycle-dependent nuclear localization of exogenously added fibroblast growth factor-1 in BALB/c 3T3 and human vascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.*, 215, 363–372 (1994)
- 130.** Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y. et al.: Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes & Dev.* 12: 149-162 (1998)
- 131.** Janatpour M.J., S. Hudak, M. Sathe, J.D. Sedgwick, and L.M. McEvoy.: Tumor necrosis factor–dependent segmental control of MIG expression by high endothelial venules in inflamed lymph nodes regulates monocyte recruitment. *J. Exp. Med.* 194:1375–1384. (2001)
- 132.** Jeon G.A., Lee J.S., Patel V., Gutkind J.S., Thorgeirsson S.S., Kim E.C., Chu I.S., Amornphimoltham P., Park M.H.: Global gene expression profiles of human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Int J Cancer.*; 112(2):249-58. (2004)
- 133.** Jiang Q., Li W.Q., Hofmeister R.R., Young H.A., Hodge D.R., Keller J.R., Khaled A.R., Durum S.K.: Distinct regions of the interleukin-7 receptor regulate different Bcl2 family members. *Mol Cell Biol.*; 24(14):6501-13. (2004)
- 134.** Jih D.M., Lyle S., Elenitsas R., Elder D.E., Cotsarelis G.: Cytokeratin 15 expression in trichoepitheliomas and a subset of basal cell carcinomas suggests they originate from hair follicle stem cells. *J Cutan Pathol.*; 26(3):113-8. (1999)
- 135.** Jogi A., Persson P., Grynfeld A., Pahlman S., Axelson H.: Modulation of basic helix-loop-helix transcription complex formation by Id proteins during neuronal differentiation. *J Biol Chem.*; 277(11):9118-26. (2002)
- 136.** Johnson D., Williams L.: Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res*; 60:1–41. (1993)
- 137.** Jothy S., Slesak B., Harlozinska A., Lapinska J., Adamiak J., Rabczynski J.: Field effect of human colon carcinoma on normal mucosa: relevance of carcinoembryonic antigen expression. *Tumour Biol.*, 17: 58-64 (1996)
- 138.** Kawada K., Sonoshita M., Sakashita H., Takabayashi A., Yamaoka Y., Manabe T., Inaba K., Minato N., Oshima M., Taketo M.M.: Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. *Cancer Res.*; 64(11):4010-7. (2004)
- 139.** Kawano Y., Kypta R.: Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.*; 116(Pt 13):2627-34. (2003)
- 140.** Kazanjian A., Wallis D., Au N., Nigam R., Venken K.J., Cagle P.T., Dickey B.F., Bellen H.J., Gilks C.B., Grimes H.L.: Growth factor independence-1 is expressed in

- primary human neuroendocrine lung carcinomas and mediates the differentiation of murine pulmonary neuroendocrine cells. *Cancer Res.*; 64(19):6874-82. (2004)
- 141.** Keys H.M., McCasland J. Techniques and results of a comprehensive dental care program in head and neck cancer patients *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1: 859-65, (1976)
- 142.** Khaled A.R., Kim, R. Hofmeister, K. Muegge, S. K. Durum: Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14476-14481. (1999)
- 143.** Kim K., A.R. Khaled, D. Reynolds, H.A. Young, C.K. Lee, S.K. Durum: Characterization of an interleukin-7-dependent thymic cell line derived from a p53-/- mouse. *J. Immunol. Methods* 274:177-184. (2003)
- 144.** Kim T.H., Zhao Y., Barber M.J., Kuharsky D.K., Yin X.M.: Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J Biol Chem.*; 275:39474-39481. (2000)
- 145.** Kischkel F.C., Lawrence D.A., Chuntharapai A., Schow P., Kim K.J., Ashkenazi A.: *Immunity* 12, 611-620 (2000)
- 146.** Klingenberg O., Więdołcha A., Citores L., Olsnes S.: Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activity for translocation of exogenous aFGF to the cytosol and nucleus. *J. Biol. Chem.* 275, 11972-11980. (2000)
- 147.** Klint P., Claesson-Welsh L.: Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Frontiers Biosci*; 4:165-177. (1999)
- 148.** Klint P., Kanda S., Claesson-Welsh L.: Shc and a novel 89-kDa component couple to the Grb2-Sos complex in fibroblast growth factor-2-stimulated cells. *J Biol Chem*; 270:23337-23344 (1995)
- 149.** Kobuke K., Furukawa Y., Sugai M., Tanigaki K., Ohashi N., Matsumori A., Sasayama S., Honjo T., Tashiro K.: ESDN, a novel neuropilin-like membrane protein cloned from vascular cells with the longest secretory signal sequence among eukaryotes, is up-regulated after vascular injury. *J Biol Chem.*; 276(36):34105-14. (2001)
- 150.** Kofler S, Nickel T, Weis M.: Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Sci (Lond).*;108(3):205-13. (2005)
- 151.** Kohonen-Corish MR, Wang Y, Doe WF. A highly polymorphic CA/GT repeat in intron 3 of the human urokinase receptor gene (PLAUR). *Hum Genet.*; 97(1):124-5. (1996)
- 152.** Kohmura, N.: Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron* 20: 1137-1151. (1998)
- 153.** Koshikawa K., Osada H., Kozaki K., Konishi H., Masuda A., Tatematsu Y., Mitsudomi T., Nakao A., Takahashi T.: Significant up-regulation of a novel gene, CLCP1, in a highly metastatic lung cancer subline as well as in lung cancers in vivo. *Oncogene.*; 21(18):2822-8. (2002)

-
- 154.**Kothapalli D.: Prostacyclin receptor activation inhibits proliferation of aortic smooth muscle cells by regulating cAMP response element-binding protein- and pocket protein-dependent cyclin a gene expression. *Mol. Pharmacol.* 64:249–258. (2003)
- 155.**Kouhara H., Hadari Y.R., Spivak-Kroizman T., Schilling J., Bar-Sagi D., Lax I., Schlessinger J.: A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell*; 89:693–702 (1997)
- 156.**Krajewska M., Krajewski S., Zapata J.M., Van Arsdale T., Gascoyne R.D., Berern K., McFadden D., Shabaik A., Hugh J., Reynolds A., Clevenger C.V., Reed J.C.: *Am. J. Pathol.* 152, 1549-1561 (1998)
- 157.**Krammer P.H.: CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol*; 71:163–210 (1999)
- 158.**Krikos A., Laherty C.D., Dixit V.M.: Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements.*J Biol Chem.*; 267(25):17971-6 (1992)
- 159.**Kugler M.C., Wei Y., Chapman H.A.: Urokinase receptor and integrin interactions. *Curr Pharm Des.*; 9(19):1565-74. (2003)
- 160.**Kunz M., Ibrahim SM.: Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Mol Cancer.*;2(1):23 (2003)
- 161.**Kurzen H., Munzing I., Hartschuh W.: Expression of desmosomal proteins in squamous cell carcinomas of the skin.*J Cutan Pathol.*; 30(10):621-30. (2003)
- 162.**La Vecchia C., Travani A., Franceschi S., Levi F., Corrao G., Negri E.: Epidemiology and Prevention of oral cancer *Oral Oncol*, 33: 302-12, 1997
- 163.**Langlands K., Down G.A., Kealey T.: Id proteins are dynamically expressed in normal epidermis and dysregulated in squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, 60: 5929-5933 (2000)
- 164.**Lanier L.L., Corliss B.C., Wu J., Leong C., Phillips J.H.: Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature*; 391: 703–745 (1998)
- 165.**Lasagni L., Francalanci M., Annunziato F., Lazzeri E., Giannini S., Cosmi L., Sagrinati C., Mazzinghi B., Orlando C., Maggi E., Marra F., Romagnani S., Serio M., Romagnani P.: An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4.*J Exp Med.*; 197(11):1537-49. (2003)
- 166.**Lasorella A., Uo T., Iavarone A.: Id proteins at the cross-road of development and cancer.*Oncogene.*; 20(58):8326-33. (2001)
- 167.**Laughner E., Taghavi P., Chiles K., Mahon P.C., Semenza G.L.: HER2 Signaling Increases the Rate of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Synthesis: Novel Mechanism for HIF-1-Mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression.*Mol Cell Biol.*; 21(12): 3995-4004. (2001)

- 168.**Lazzeri E., Romagnani P.: CXCR3-binding chemokines: novel multifunctional therapeutic targets. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.*; 5(1):109-18. (2005)
- 169.**Lehrbach D.M., Nita M.E., Ceconello I.: Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. *Arq Gastroenterol.*;40(4):256-61(2004)
- 170.**Leonidas D.D., Shapiro R., Allen S.C., Subbarao G.V., Veluraja K., Acharya K.R.: Refined crystal structures of native human angiogenin and two active site variants: implications for the unique functional properties of an enzyme involved in neovascularisation during tumour growth. *J Mol Biol.*; 285(3):1209-33. (1999)
- 171.**Leonidas D.D., Shapiro R., Subbarao G.V., Russo A., Acharya K.R.: Crystallographic studies on the role of the C-terminal segment of human angiogenin in defining enzymatic potency.*Biochemistry.*; 41(8):2552-62. (2002)
- 172.**Leung S.K., Ohh M.: Playing Tag with HIF: The VHL Story.*J Biomed Biotechnol.*; 2(3): 131-135.(2002)
- 173.**Ley K.: Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol Rev.* 186:8-18 (2002)
- 174.**Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J.: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*; 94:491–501 (1998)
- 175.**Li H., Gerald W.L., Benezra R.: Utilization of bone marrow-derived endothelial cell precursors in spontaneous prostate tumors varies with tumor grade.*Cancer Res.*; 64(17):6137-43. (2004)
- 176.**Li J.H., Kirkiles-Smith N.C., McNiff J.M., Pober J.S.: TRAIL induces apoptosis and inflammatory gene expression in human endothelial cells.*J Immunol.*; 171(3):1526-33. (2003)
- 177.**Li Z., Shimada Y., Uchida S., Maeda M., Kawabe A., Mori A., Itami A., Kano M., Watanabe G., Imamura M.: TGF- α as well as VEGF, PD-ECGF and bFGF contribute to angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma.*Int J Oncol.*; 17(3):453-60. (2000)
- 178.**Lin C.Q., Singh J., Murata K., Itahana Y., Parrinello S., Liang S.H., Gillet C.E., Campisi J., Desprez P.Y.: A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 60: 1332-1340 (2000)
- 179.**Litwin V., J. Gumperz, P. Parham, J.H. Phillips, L.L. Lanier.: NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J. Exp. Med.* 180:537. (1994)
- 180.**Liu S., Cowell J.K.: Cloning and characterization of the TATA-less promoter from the human GF11 proto-oncogene.*Ann Hum Genet.*; 64(Pt 1):83-6. (2000)
- 181.**Liu S.C., Bassi D.E., Zhang S.Y., Holoran D., Conti C.J., Klein-Szanto A.J.: Overexpression of cyclin D2 is associated with increased in vivo invasiveness of human squamous carcinoma cells. *Mol Carcinog.*; 34(3):131-9. (2002)

-
- 182.**Lo Muzio L.: A possible role for the WNT-1 pathway in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.*;12(2):152-65. (2001)
- 183.**Lockhart D.J., Dong H., Byrne M.C., Follettie M.T., Gallo M.V., Chee M.S., Mittmann M., Wang C., Kobayashi M., Horton H., Brown E.L.: Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays *Nat Biotechnol*, 14: 1675-80, (1996)
- 184.**Long E.O., Barber D.F., Burshtyn D.N.: Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). *Immunol Rev*; 181: 223–33. (2001)
- 185.**Lopez-Botet M., M. Llano, M. Ortega: Human cytomegalovirus and natural killer-mediated surveillance of HLA class I expression: a paradigm of host-pathogen adaptation. *Immunol. Rev.* 181:193. (2001)
- 186.**Loukinova E., Chen Z., Van Waes C., Dong G.: Expression of proangiogenic chemokine Gro 1 in low and high metastatic variants of Pam murine squamous cell carcinoma is differentially regulated by IL-1alpha, EGF and TGF-beta1 through NF-kappaB dependent and independent mechanisms. *Int J Cancer.*; 94(5):637-44. (2001)
- 187.**Lundy F.T., Orr D.F., Gallagher J.R., Maxwell P., Shaw C., Napier S.S., Gerald Cowan C., Lamey P.J., Marley J.J.: Identification and overexpression of human neutrophil alpha-defensins (human neutrophil peptides 1, 2 and 3) in squamous cell carcinomas of the human tongue. *Oral Oncol.*; 40(2):139-44. (2004)
- 188.**Maki K., S. Sunaga, Y. Komagata, Y. Kodaira, A. Mabuchi, H. Karasuyama, K. Yokomuro, J. I. Miyazaki, K. Ikuta. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7172-7177 (1996)
- 189.**Małeck J., Wesche J., Skjerpen C.S., Wiedłocha A., Olsnes S.: Translocation of FGF-1 and FGF-2 across Vesicular Membranes Occurs during G1-Phase by a Common Mechanism. *Mol Biol Cell.*; 15(2): 801-814 (2004)
- 190.**Malecki J., Więdołcha A., Wesche J., Olsnes S.: Vesicle transmembrane potential is required for translocation to the cytosol of externally added FGF-1. *EMBO J.* 21, 4480-4490. (2002)
- 191.**Mandelboim O., H.T. Reyburn, M. Vales-Gomez, L. Pazmany, M. Colonna, G. Borsellino, J. L. Strominger: Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J. Exp. Med.* 184:913.
- 192.**Mao J., J. Wang, B. Liu, W. Pan, G. H. Farr, C. Flynn, H. Yuan, S. Takada, D. Kimelman, L. Li, and D. Wu.: Low-density lipoprotein receptor-related protein binds to axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell* 7:801–809. (2001)
- 193.**Mao B., W. Wu, D. Hoppe, P. Stanne, A. Glinka, and C. Niehrs: LDLreceptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411:321–325 (2001)

- 194.** Marcial, V.A., Gelber, R., Kramer, S., Snow, J.B., Davis, L.W., Vallecillo, L.A.: Does pre-operative irradiation decrease the rate of surgical complications in carcinoma of the head and neck? *Cancer*, 49: 1297-301, (1982)
- 195.** Martinez I.: Factors associated with cancer of the esophagus, mouth and pharynx *J Natl Cancer Inst*, 42: 1069-94, (1969)
- 196.** Mason I.J.: The ins and outs of fibroblast growth factors. *Cell*, 78, 547-552 (1994)
- 197.** Masson R., Régnier C.H., Chenard M.-P., Wendling C., Mattei M.-G., Tomasetto C., Rio M.-C.: *Mech. Dev.* 71, 187-191 (1998)
- 198.** Matsuo S.E., Ebina K.N., Kulcsar M.A., Friguglietti C.U., Kimura E.T.: Activin betaB expression in rat experimental goiter and human thyroid tumors. *Thyroid*; 13(3):239-47. (2003)
- 199.** McGall G.H., Christians F.C.: high-density oligonucleotide probe arrays Affymetric Inc., *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*; 77:21-42, (2002)
- 200.** McKeehan W.L., Wang F., Kan M.: The heparan-sulfate fibroblast growth-factor family: diversity of structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*; 59:135-176 (1998)
- 201.** Mertens C., Kuhn C., Moll R., Schwetlick I., Franke W.W.: Desmosomal plakophilin 2 as a differentiation marker in normal and malignant tissues. *Differentiation*; 64(5):277-90. (1999)
- 202.** Michiels C.: Endothelial cell functions *J Cell Physiol.* 196(3):430-43. (2003)
- 203.** Miller A.B.: The epidemiology of oral cancer *J Can Dent Assoc*, 40: 211-217 (1974)
- 204.** Mimori K., Tanaka Y., Yoshinaga K., Masuda T., Yamashita K., Okamoto M., Inoue H., Mori M.: Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer. *Ann Oncol*; 15(2):236-41. (2004)
- 205.** Moretta A., C. Bottino, D. Pende, G. Tripodi, G. Tambussi, O. Viale, A. Orengo, M. Barbaresi, A. Merli, E. Ciccone: Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J. Exp. Med.* 172:1589. (1990)
- 206.** Morifuji M., Taniguchi S., Sakai H., Nakabeppu Y., Ohishi M.: Differential expression of cytokeratin after orthotopic implantation of newly established human tongue cancer cell lines of defined metastatic ability. *Am J Pathol*; 156(4):1317-26. (2000)
- 207.** Moroy T.: The zinc finger transcription factor Growth factor independence 1 (Gfi1). *Int J Biochem Cell Biol*; 37(3):541-6. (2005)
- 208.** Morrish, R.B. Jr., Chan, E., Silverman, S. Jr., Meyer, J., Fu, K.K., Greenspan, D.: Osteonecrosis in patients irradiated for head and neck carcinoma *Cancer*, 47: 1980-3, (1981)
- 209.** Munoz-Chapuli R., Quesada A.R., Angel Medina M.: Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci*; 61(17):2224-43. Review. (2004)

- 210.** Murakami M., M. Narazaki, M. Hibi, H. Yawata, K. Yasukawa, M. Hamaguchi, T. Taga, T. Kishimoto: Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:11349-11353 (1991)
- 211.** Murata Y., Hamada S., Morishita H., Mutoh T., Yagi T.: Interaction with protocadherin-gamma regulates the cell surface expression of protocadherin-alpha. *J Biol Chem.*; 279(47):49508-16. (2004)
- 212.** Myagmar B.E., Umikawa M., Asato T., Taira K., Oshiro M., Hino A., Takei K., Uezato H., Kariya K.: PARG1, a protein-tyrosine phosphatase-associated RhoGAP, as a putative Rap2 effector. *Biochem Biophys Res Commun.*; 329(3):1046-52. (2005)
- 213.** Myers R.L., Payson R.A., Chotani M.A., Deaven L.L., Chiu, I.-M.: *Oncogene*, 8, 341-349 (1993)
- 214.** Nagata S., Golstein P.: The Fas death factor. *Science*; 267:1449–1456 (1995)
- 215.** Narumiya S.: Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79, 1193–1226 (1999)
- 216.** Narumiya S. and FitzGerald G.A.: Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J. Clin. Invest.* 108, 25–30 (2001)
- 217.** Naumov G.N., MacDonald I.C., Chambers A.F., Groom A.C.: Solitary cancer cells as a possible source of tumour dormancy? *Semin Cancer Biol.*; 11(4):271-6. (2001)
- 218.** Neville B.W., Day T.A.: Oral cancer and precancerous lesions *CA Cancer J Clin*, 52: 195-215 (2002)
- 219.** Nishihira J., Ishibashi T., Fukushima T., Sun B., Sato Y.: Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*; 995:171–182. (2003)
- 220.** Nollet F., Kools P., van Roy F.: Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* 299: 551–572, (2000)
- 221.** Norton J.D.: Id helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J. Cell Sci.*, 113: 3897-3905 (2000)
- 222.** Nosaka T., J.M. van Deursen, R.A. Tripp, W.E. Thierfelder, B.A. Witthuhn, A.P. McMickle, P.C. Doherty, G.C. Grosveld, J.N. Ihle.: Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science* 270:800-802 (1995)
- 223.** Nozaki S., Endo Y., Kawashiri S., Nakagawa K., Yamamoto E., Yonemura Y., Sasaki T.: Immunohistochemical localization of a urokinase-type plasminogen activator system in squamous cell carcinoma of the oral cavity: association with mode of invasion and lymph node metastasis. *Oral Oncol.*;34(1):58-62. (1998)
- 224.** Ober R.J., Martinez C., Lai X., Zhou J., Ward E.S.: Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: an analysis at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 101(30):11076-81. (2004)

225. Ober R.J., Martinez C., Vaccaro C., Zhou J., Ward E.S.: Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J Immunol.*; 172(4):2021-9. (2004)
226. Ohtsuka M., Arase H., Takeuchi A., Yamasaki S., Shiina R., Suenaga T., Sakurai D., Yokosuka T., Arase N., Iwashima M., Kitamura T., Moriya H., Saito T.: NFAM1, an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing molecule that regulates B cell development and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 101(21): 8126-8131 (2004)
227. Okuda T., Shurtleff S.A., Valentine M.B., Raimondi S.C., Head D.R., Behm F., Curcio-Brint A.M., Liu Q., Pui C.-H., Sherr C.J., Beach D., Look A.T., Downing J.R.: Frequent deletion of p16(INK4a)/MTS1 and p15(INK4b)/MTS2 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*;85:2321-30 (1995)
228. Olson K.A., Fett J.W., French T.C., Key M.E., Vallee B.L.: Angiogenin antagonists prevent tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 92(2):442-6. (1995)
229. Ornitz D.M., Xu J.S., Colvin J.S.: Receptor specificity of the fibroblast growth-factor family. *J Biol Chem.*; 271:15292–15297. (1996)
230. Orr-Urtreger A., Bedford M., Burakova T.: Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth-factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol.*; 158:475–486. (1993)
231. Otani Y., Kuwahara D., Tsutsumi K.: Resistance to Fas-mediated apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells, *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho.*; 103(10):1169-76. Japanese. (2000)
232. Owen J.D., Strieter R., Burdick M., Haghnegahdar H., Nanney L., Shattuck-Brandt R., Richmond A.: Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins. *Int J Cancer.*; 73(1):94-103. (1997)
233. Oyama T., Kanai Y., Ochiai A., Akimoto S., Oda T., Yanagihara K., Nagafuchi A., Tsukita S., Shibamoto S., Ito F.: A truncated β -catenin disrupts the interaction between E-cadherin and β -catenin: a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines. *Cancer Res.*; 54:6282-7 (1994)
234. Papagerakis S., Shabana A.H., Depondt J., Gehanno P., Forest N.: Immunohistochemical localization of plakophilins (PKP1, PKP2, PKP3, and p0071) in primary oropharyngeal tumors: correlation with clinical parameters. *Hum Pathol.*; 34(6):565-72. (2003)
235. Park S.Y., K. Saijo, T. Takahashi, M. Osawa, H. Arase, N. Hirayama, K. Miyake, H. Nakauchi, T. Shirasawa, T. Saito: Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* 3:771-782 (1995)
236. Partanen J., Armstrong E., Makela T.P.: A novel endothelial-cell surface-receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth-factor homology domains. *Mol Cell Biol.*; 12:1698–1707 (1992)

-
237. Patapoutian A., Reichardt L.F.: Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.*; 11(3):272-80. (2001)
238. Payson R.A., Canatan H., Chotani M.A., Wang W.-P., Harris S.E., Myers R.L., Chiu I.-M. *Nucleic Acids Res.*, 21, 489-495 (1993)
239. Penna G., S. Sozzani, L. Adorini: Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 167:1862–1866. (2001)
240. Pennisi E.: How a growth control path takes a wrong turn to cancer. *Science*;281:1438-41 (1998)
241. Perl A.K., Wilgenbus P., Dahl U., Semb H., Christofori G.: A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, 392, 190–193 (1998)
242. Perrimon N., M. Bernfield: Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* 404:725–728. (2000)
243. Person R.E., Li F.Q., Duan Z., Benson K.F., Wechsler J., Papadaki H.A., Eliopoulos G., Kaufman C., Bertolone S.J., Nakamoto B., Papayannopoulou T., Grimes H.L., Horwitz M.: Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet.*; 34(3):308-12. (2003)
244. Peschon J.J., B.C. Gliniak, P.J. Morrissey, E. Maraskovsky: Lymphoid development and function in IL-7R-deficient mice, p. 37-52. In S. K. Durum and K. Muegge (ed.), *Cytokine knockouts*. Humana Press Inc., Totowa, N.J. (1998)
245. Peschon J.J., P.J. Morrissey, K.H. Grabstein, F.J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B.C. Gliniak, L. S. Park, S. F. Ziegler, D. E. Williams, C. B. Ware: Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180:1955-1960 (1994)
246. Peters K., Ornitz D., Werner S., Williams L.: Unique expression pattern of the fgf receptor-3 gene during mouse organogenesis. *Dev Biol*; 155:423–430. (1993)
247. Peters K., Werner S., Chen G., Williams L.: Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development*; 114:233–243. (1992)
248. Pfreundner L, Pahnke J, Wameling S.: Analysis of cervical lymph node metastasis of oropharyngeal carcinoma in relation to extent of the primary tumor *Laryngorhinootologie.*;75(4):223-30. (1996)
249. Pierce K.L. and Regan J.W.: Prostanoid receptor heterogeneity through alternative mRNA splicing. *Life Sci.* 62, 1479–1483 (1998)
250. Pinson K.I., J. Brennan, S. Monkley, B.J. Avery, W.C. Skarnes: An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407:535–538. (2000)
251. Plonnikov A., Schlessinger J., Hubbard S., Mohammadi M.: Structural basis of fgf receptor dimerization and activation. *Cell*; 98:641–650 (1999)
252. Polyak K., Lee M.-H., Erdjument-Bromage H., Koff A., Roberts J.M., Tempst P., Massague J.: Cloning of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*; 78:59-66 (1994)

-
253. Praetor A., Hunziker W.: beta(2)-Microglobulin is important for cell surface expression and pH-dependent IgG binding of human FcRn. *J Cell Sci.*;115(Pt 11):2389-97. (2002)
254. Prevo L. J., Sanchez C. A., Galipeau P. C., Reid B. J.: p53-mutant clones and field effects in Barrett's esophagus. *Cancer Res.*, 59: 4784-4787 (1999)
255. Quon H., Liu F.F., Cummings B.J.: Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.*; 23(2):147-59. (2001)
256. Rajagopalan L., Rajarathnam K.: Ligand selectivity and affinity of chemokine receptor CXCR1. Role of N-terminal domain. *J Biol Chem.*; 279(29):30000-8. (2004)
257. Regezi, J.A., Courtney, R.M., Kerr, D.A.: Dental management of patients radiated for oral cancer *Cancer*, 38: 994-1000, (1976)
258. Regnier C.H., Tomasetto C., Moog-Lutz C., Chenard M.P., Wendling C., Basset P., Rio M.C.: Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J. Biol. Chem.* 270, 25715– 25721 (1995)
259. Reuning U., Sperl S., Kopitz C., Kessler H., Kruger A., Schmitt M., Magdolen V.: Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): development of antagonists of uPA/uPAR interaction and their effects in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des.*; 9(19):1529-43. (2003)
260. Riedl K., Krysan K., Pold M., Dalwadi H., Heuze-Vourc'h N., Dohadwala M., Liu M., Cui X., Figlin R., Mao J.T., Strieter R., Sharma S., Dubinett S.M.: Multifaceted roles of cyclooxygenase-2 in lung cancer. *Drug Resist Updat.*;7(3):169-84. (2004)
261. Romagnani P., F. Annunziato, L. Lasagni, E. Lazzeri, C. Beltrame, M. Francalanci, M. Uguccioni, G. Galli, L. Cosmi, L. Maurenzig: Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J. Clin. Invest.* 107:53–63. (2001)
262. Rosenkilde M.M., Schwartz T.W.: The chemokine system - a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS.*; 112(7-8):481-95. (2004)
263. Rosenthal A.N., Ryan A., Hopster D., Jacobs I. J.: Molecular evidence of a common clonal origin and subsequent divergent clonal evolution in vulval intraepithelial neoplasia, vulval squamous cell carcinoma and lymph node metastases. *Int. J. Cancer*, 99: 549-554 (2002)
264. Rui Mei, Earl Hubbell, Stefan bekiranov, Mike Mittmann, Fred C. Christians, Mei-Mei Shen, Gang Lu, Joy Fang, Wei-Min Liu, Tom Ryder, Paul Kaplan, David Kulp, Teresa A.: Probe selection for high-density oligonucleotid arrays Webster, Affymetric Inc., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 100(20):11237-42 (2003)
265. Ruth J.H., Volin M.V., Haines G.K., Woodruff D.C., Katschke K.J., Jr, Woods J.M., Park C.C., Morel J.C.M., Koch A.E.: Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 44:1568-1581 (2001)
266. Sakurai D., Tsuchiya N., Yamaguchi A., Okaji Y., Tsuno N.H., Kobata T., Takahashi K., Tokunaga K.: Crucial role of inhibitor of DNA binding/differentiation in

- the vascular endothelial growth factor-induced activation and angiogenic processes of human endothelial cells. *J Immunol.* (2004)
267. Salcedo R., J.H. Resau, D. Halverson, E.A. Hudson, M. Dambach, D. Powell, K. Wasserman, J.J. Oppenheim: Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* 14:2055–2064. (2000)
268. Sander G.R., Powell B.C.: Structure and expression of the ovine Hoxc-13 gene. *Gene.*; 327(1):107-16. PMID: 14960366 (2004)
269. Sano K.: Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J.* 12: 2249–2256. (1995)
270. Santos-Garcia A., Abad-Hernandez M.M., Fonseca-Sanchez E., Cruz-Hernandez J.J., Bullon-Sopelana A.: Proteic expression of p53 and cellular proliferation in oral leukoplakias. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*;10(1):5-8; 1-5. (2005)
271. Saras J., Franzen P., Aspenstrom P., Hellman U., Gonez L.J., Heldin C.H.: A novel GTPase-activating protein for Rho interacts with a PDZ domain of the protein-tyrosine phosphatase PTPL1. *J Biol Chem.*; 272(39):24333-8. (1997)
272. Sarma V., Wolf F.W., Marks R.M., Shows T.B., Dixit V.M.: Cloning of a novel tumor necrosis factor-alpha-inducible primary response gene that is differentially expressed in development and capillary tube-like formation in vitro. *J Immunol.*; 148(10):3302-12 (1992)
273. Sax J.K., El-Deiry W.S.: Identification and characterization of the cytoplasmic protein TRAF4 as a p53-regulated proapoptotic gene. *J Biol Chem.*; 278(38):36435-44. (2003)
274. Schall T.: Fractalkine—a strange attractor in the chemokine landscape. *Immunol Today*, 18:147 (1997)
275. Schneider V.A., M. Mercola: Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* 15:304–315. (2001)
276. Schena R., Davis R.W.: In: Schena M (ed) *Microarray Biochip technology*. Bio Techniques Books, Natick, MA, p1 (2000)
277. Schnittler H.J.: Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol* 93: 30-39. (1998)
278. Sciubba J.J.: Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol.*; 2(4):239-51. (2001)
279. Semenov M.V., K. Tamai, B.K. Brott, M. Kuhl, S. Sokol, X. He. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol.* 11:951–961. (2001)
280. Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M.: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*;219:983–5. (1983)
281. Shan L., Qiao X., Crona J.H., Behan J., Wang S., Laz T., Bayne M., Gustafson E.L., Monsma F.J. Jr, Hedrick J.A.: Identification of a novel neuromedin U receptor subtype expressed in the central nervous system. *J Biol Chem.*; 275(50):39482-6. (2000)

-
282. Shapiro L., Colman D.R.: The diversity of cadherins and implications for a synaptic adhesive code in the CNS. *Neuron* 23: 427-430, (1999)
283. Sheen-Chen S.M., Eng H.L., Chen W.J., Chou F.F., Chen H.S.: Serum level of angiogenin in breast cancer. *Anticancer Res.*; 20(6C):4769-71. PMID: 11205216 (2000)
284. Shilling, H.G.: Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J. Immunol.* 168, 2307–2315 (2002).
285. Shilling H.G., N. Young, L. A. Guethlein, N. W. Cheng, C. M. Gardiner, D. Tyan, P. Parham: Genetic control of human NK cell repertoire. *J. Immunol.* 169:239. (2002)
286. Shimada T., Y. Oda, E.M. J. Gillam, F.P. Guengerich, K. Inoue: Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Other Procarcinogens by Cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 Allelic Variants and Other Human Cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009 Drug Metab. Dispos.; 29(9): 1176 - 1182. (2001)
287. Shinohara M., Hiraki A., Ikebe T., Nakamura S., Kurahara S., Shirasuna K., Garrod D.R.: Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour. *J Pathol.* (1998)
288. Shintani S., Ishikawa T., Nonaka T., Li C., Nakashiro K., Wong D.T., Hamakawa H.: Growth-regulated oncogene-1 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human oral cancer. *Oncology.*; 66(4):316-22. (2004)
289. Shou J., Ali-Osman F., Multani A.S., Pathak S., Fedi P., Srivenugopal K.S.: Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene* 21,878 -889. (2002)
290. Sidenius N., Blasi F.: The urokinase plasminogen activator system in cancer: Recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev*; 22:205–222 (2003)
291. Simon R., Eltze E., Schafer K. L., Burger H., Semjonow A., Hertle L., Dockhorn-Dworniczak B., Terpe H. J., Bocker W.: Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. *Cancer Res.*, 61: 355-332, (2001)
292. Skjerve Skjerpen C., Nilsen T., Wesche J., Olsnes S.: Binding of FGF-1 variants to protein kinase CK2 correlates with mitogenicity. *EMBO J.*; 21(15): 4058-4069. (2002)
293. Slaughter D.P., Southwick H.W., Smejkal W.: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.*; 6(5):963-8 (1953)
294. Song H.Y., Rothe M., Goeddel D.V.: The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 93(13):6721-5 (1996)

-
295. Sottile J.: Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta.*; 1654(1):13-22. (2004)
296. Sperry R.W.: Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 50: 703-710, 1963. (1963)
297. Sprick M.R., Weigand M.A., Rieser E., Rauch C.T., Juo P., Blenis J., Krammer P.H., Walczak H. *Immunity* 12, 599–609 (2000)
298. Springer T.A.: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* ;76: 301–314 (1994)
299. Sriuranpong V., Park J.I., Amornphimoltham P., Patel V., Nelkin B.D., Gutkind J.S.: Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res.*; 63(11):2948-56. (2003)
300. Stark K., McMahon J., McMahon A.: FGFR-4, a new member of the fibroblast growth factor receptor family, expressed in the definitive endoderm and skeletal muscle lineages of the mouse. *Development*; 113:641–651 (1991)
301. Stern R. S., Bolshakov S., Nataraj A. J., Ananthaswamy H. N.: p53 mutation in nonmelanoma skin cancers occurring in psoralen ultraviolet a-treated patients: evidence for heterogeneity and field cancerization. *J. Investig. Dermatol.*, 119: 522-526 (2002)
302. Stevens T., Rosenberg R., Aird W.: NHLBI workshop report: Endothelial cell phenotypes in heart, lung, and blood diseases. *Am J Physiol Cell Physiol*; 281:C1422–C1433 (2001)
303. Stewart C.A., Van Bergen J., Trowsdale J.: Different and divergent regulation of the KIR2DL4 and KIR3DL1 promoters. *J Immunol.*; 170(12):6073-81. (2003)
304. Streit S., Bange J., Fichtner A., Ihrler S., Issing W., Ullrich A.: Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.*; 111(2):213-7. (2004)
305. Strieter R.M., J.A. Belperio, M.P. Keane: CXC chemokines in angiogenesis related to pulmonary fibrosis. *Chest.* 122:298S–301S (2002)
306. Stupack D.G., Cheresh D.A.: Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol.*; 64:207-38. (2004)
307. Sumpio B.E., Riley J.T., Dardik A.: Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(12):1508-12 (2002)
308. Sundberg C., Kowanetz M., Brown L. F., Detmar M., Dvorak H. F.: Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab. Invest.*, 82, 387-401 (2002)
309. Suter C.M., Hogg P.J., Price J.T., Chong B.H., Ward R.L.: Identification and characterisation of a platelet GPIb/V/IX-like complex on human breast cancers: implications for the metastatic process. *Jpn J Cancer Res.*; 92(10):1082-92. (2001)

-
310. Suzuki S.T.: Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily. *J. Cell Sci.* 109:2609–2611. (1996)
311. Szebenyi G., and Fallon J.F.: Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int. Rev. Cytol.*, 185, 45–106 (1999)
312. Tabor M. P., Brakenhoff R. H., Ruijter-Schippers H. J., van der Wal J. E., Snow G. B., Leemans C. R., Braakhuis B. J. M.: Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am. J. Pathol.*, 161: 1051-1060, (2002)
313. Takahashi T., Habuchi T., Kakehi Y., Mitsumori K., Akao T., Terachi T., Yoshida O. Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. *Cancer Res.*, 58: 5835-5841 (1998)
314. Tamagnone L., Artigiani S., Chen H., He Z., Ming G.I., Song H., Chedotal A., Winberg M.L., Goodman C.S., Poo M., Tessier-Lavigne M., Comoglio P.M.: Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell.*; 99(1):71-80. (2001)
315. Tamai K., M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J. P. Saint-Jeannet, X. He: LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407:530–535.(2000)
316. Tang D.G., Conti C.J.: Endothelial cell development, vasculogenesis, angiogenesis, and tumor neovascularization: an update. *Semin Thromb Hemost.* 30(1):109-17 (2004)
317. Tarantini F., LaVallee T., Jackson A., Gamble S., Carreira C.M., Garfinkel S., Burgess W.H., Maciag T.: The extravesicular domain of synoptagmin-1 is released with the latent fibroblast growth factor-1 homodimer in response to heat shock. *J. Biol. Chem.*, 273, 22209–22216 (1998)
318. Thomas C., Schmitz-Moormann P., Gebert G.: Tumoren In: Thomas C. (Hrsg.): *Allgemeine Pathologie* Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1. Auflage: 164-166, 202 (1995)
319. Tischer E.: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* 266, 11947–11954 (1991)
320. Todaka T., Yokoyama C., Yanamoto H., Hashimoto N., Nagata I., Tsukahara T., Hara S., Hatae T., Morishita R., Aoki M., Ogihara T., Kaneda Y., Tanabe T.: Gene transfer of human prostacyclin synthase prevents neointimal formation after carotid balloon injury in rats. *Stroke* 30, 419–426 (1999)
321. Topper J.N., Cai J., Falb D., Gimbrone M.A., Jr.: Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:10417–10422. (1996)
322. Tupchong L., Scott C., Blitzer P., Marcial V., Lowry L., Jacobs J., Stetz J., Davis L., Snow J., Chandler R., Kramer S., Pajak T.: Randomized study of pre-operative

- versus post-operative radiation therapy in advanced head and neck carcinoma: long term follow up of RTOG study 73-03 *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 20: 21-8, (1991)
323. Uhrberg M.: Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. This paper describes the discovery of the variation and diversity in gene content of human KIR haplotypes and the existence of the group A and group B KIR haplotypes. *Immunity* 7, 753–763. (1997)
324. Vaidya M.M., Borges A.M., Pradhan S.A., Bhisey A.N.: Cytokeratin expression in squamous cell carcinomas of the tongue and alveolar mucosa. *Eur J Cancer B Oral Oncol.*; 32B(5):333-6. (1996)
325. Valiante N.M., M. Uhrberg, H.G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, K.L. Arnett, A. D'Andrea, J.H. Phillips, L.L. Lanier, P. Parham: Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 7:739 (1997)
326. Venkitaraman A.R., R.J. Cowling: Interleukin 7 receptor functions by recruiting the tyrosine kinase p59fyn through a segment of its cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:12083-12087 (1992)
327. Verheul H.M., Voest E.E., Schlingemann R.O.: Endothelial cell development, vasculogenesis, angiogenesis, and tumor neovascularization: an update. *Semin Thromb Hemost.* 30(1):109-17. (2004)
328. Villaret D.B., Wang T., Dillon D., Xu J., Sivam D., Cheever M.A., Reed S.G.: Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope.*; 110(3 Pt 1):374-81 (2001)
329. Viinikka L.: Acetylsalicylic acid and the balance between prostacyclin and thromboxane A2. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 201:103-8. (1990)
330. Vikram B., Strong E.W., Shah J.P., Spiro R.: Failure at the primary site following multi-modality treatment in advanced head and neck cancer *Head Neck Surg*, 6: 720-3, (1984)
331. von Bülow C., Hayen W., Hartmann A., Mueller-Klieser W., Allolio B., Nehls V.: Endothelial capillaries chemotactically attract tumour cells. *J Pathol.*; 193(3):367-76. (2001)
332. von-Freeden-Jeffry U., P. Vieira, L.A. Lucian, T. McNeil, S.E. Burdach, R. Murray: Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* 181:1519-1526 (1995)
333. Wan A.M., Ennis P., Parham P. & Holmes N.: The primary structure of HLA-A32 suggests a region involved in formation of the Bw4/Bw6 epitopes. *J. Immunol.* 137, 3671–3674 (---)
334. Wang W.-P., Quick D., Balcerzak S.P., Needleman S.W., Chiu, I.-M. *Oncogene*, 6,1521-1529 (1991)

-
335. Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L.: Hypoxia-inducible factor-1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA.* ;92:5510–5514 (1995)
336. Wang J., Shou J., Chen X.: Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene.*;19(14):1843-8. (2000)
337. Wang Y.: The role and regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression in cancer invasion and metastasis. *Med Res Rev.*; 21(2):146-70. Rev. (2001)
338. Wehrli M., S.T. Dougan, K. Caldwell, L. O'Keefe, S. Schwartz, D. Vaizel-Ohayon, E. Schejter, A. Tomlinson, S. DiNardo: arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 407:527–530. (2000)
339. Weibel E.R., Palade G.F.: New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J Cell Biol* 23: 101–112 (1964)
340. Weinberg, M.A., Estefan, D.J.: Assessing oral malignancies *Am Fam Physician*, 65: 1379-84 (2002)
341. Welles E.G.: Antithrombotic and fibrinolytic factors. A review. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 26(5):1111-27 (1996)
342. Wertz I.E., O'Rourke K.M., Zhou H., Eby M., Aravind L., Seshagiri S., Wu P., Wiesmann C., Baker R., Boone D.L., Ma A., Koonin E.V., Dixit V.M.: De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature.*; 430(7000):694-9. (2004)
343. Weston G.C., Haviv I., Rogers P.A.: Microarray analysis of VEGF-responsive genes in myometrial endothelial cells. *Mol Hum Reprod.*; 8(9):855-63. (2002)
344. Wiedtke A., Falnes P.O., Madhus I.H., Sandvig K., Olsnes S. Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell*, 76, 1039–1051 (1994)
345. Wiedtke A., Falnes P.O., Rapak A., Klingenberg O., Munoz R., Olsnes S.: Translocation of cytosol of exogenous, CAAX-tagged acidic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.*, 270, 30680–30685. (1995)
346. Wiedtke A., Falnes P.O., Rapak A., Munoz R., Klingenberg O., Olsnes S. Stimulation of proliferation of a human osteosarcoma cell line by exogenous acidic fibroblast growth factor requires both activation of receptor tyrosine kinase and growth factor internalization. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 270–280 (1996)
347. Wilson J.W., Deed R.W., Inoue T., Balzi M., Becciolini A., Faraoni P., Potten C.S., Norton J.D.: Expression of Id helix-loop-helix proteins in colorectal adenocarcinoma correlates with p53 expression and mitotic index. *Cancer Res.*; 61(24):8803-10. (2001)
348. Winter C.C., E.O. Long: A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J. Immunol.* 158:4026. (1997)

349. Wittekind C., Meyer H.J., Bootz F.: UICC (International Union against cancer), TNM Klassifikation maligner Tumoren. 6. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio: Springer (2002)
350. Wolf J.S., Chen Z., Dong G., Sunwoo J.B., Bancroft C.C., Capo D.E., Yeh N.T., Mukaida N., Van Waes C.: IL (interleukin)-1 α promotes nuclear factor- κ B and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.*; 7(6):1812-20. (2001)
351. Wolverton T., Lalande M.: Identification and characterization of three members of a novel subclass of protocadherins. *Genomics.*; 76(1-3):66-72. (2001)
352. Woods K.V., Adler-Storthz K., Clayman G.L., Francis G.M., Grimm E.A.: Interleukin-1 regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma in vitro: possible influence of p53 but not human papillomavirus E6/E7. *Cancer Res.*; 58(14):3142-9. (1998)
353. Wu Q., Maniatis T.: Large exons encoding multiple ectodomains are a characteristic feature of protocadherin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 97(7): 3124-3129. (2000)
354. Wuyts A., Govaerts C., Struyf S., Lenaerts J.P., Put W., Conings R., Proost P., Van Damme J.: Isolation of the CXC chemokines ENA-78, GRO α and GRO γ from tumor cells and leukocytes reveals NH₂-terminal heterogeneity. Functional comparison of different natural isoforms. *Eur J Biochem.*; 260(2):421-9. (1999)
355. Wynder, E.L., Stellmann, S.D.: Comparative epidemiology of tobacco-related cancers *Cancer Res*, 37: 4608-22 (1977)
356. Xu H., Lee K.W., Goldfarb M.: Novel recognition motif on fibroblast growth factor receptor mediates direct association and activation of SNT adapter proteins. *J Biol Chem*; 273:17987–17990 (1998)
357. Yancopoulos G.D.: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation *Nature* 2000 Sep 14;407(6801):242-8
358. Yang J., Hu G., Wang S.W., Li Y., Martin R., Li K., Yao Z.: Calcineurin/nuclear factors of activated T cells (NFAT)-activating and immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-containing protein (CNAIP), a novel ITAM-containing protein that activates the calcineurin/NFAT-signaling pathway. *J Biol Chem.*; 278(19):16797-801. (2003)
359. Yao L., Itoh S., Furuta I.: Thymidine phosphorylase expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*; 38(6):584-90. (2002)
360. Yu W., Kim J., Ossowski L.: Reduction in surface urokinase receptor forces malignant cells into a protracted state of dormancy. *J Cell Biol.*; 137(3):767-77 (1997)
361. Zebedee Z., Hara E.: Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene.*; 20(58):8317-25. (2001)

- 362.** Zelefsky M.J., Harrison L.B., Fass D.E., Armstrong J., Spiro R.H., Shah J.P., Strong E.W.: Post-operative radiotherapy of oral cavity cancers: impact of anatomic subsite on treatment outcome *Head Neck*, 12: 470-5, (1990)
- 363.** Zhan X., Hu X., Friesel R., Maciag T.: Long term growth factor exposure and differential tyrosine phosphorylation are required for DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, 268, 9611–9620 (1993)
- 364.** Zhang S.Y., Liu S.C., Goodrow T., Morris R., Klein-Szanto A.J.: Increased expression of G1 cyclins and cyclin-dependent kinases during tumor progression of chemically induced mouse skin neoplasms. *Mol Carcinog.*; 18(3):142-52. (1997)
- 365.** Zhang Y., Blattman J.N., Kennedy N.J., Duong J., Nguyen T., Wang Y., Davis R.J., Greenberg P.D., Flavell R.A., Dong C.: Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5. *Nature.*; 430(7001):793-7. (2004)
- 366.** Zhou J., Mateos F., Ober R.J., Sally Ward E.: Conferring the binding properties of the mouse MHC class I-related receptor, FcRn, onto the human ortholog by sequential rounds of site-directed mutagenesis. *J Mol Biol.*; 345(5):1071-81. (2004)
- 367.** Zhu J., Guo L., Min B., Watson C.J., Hu-Li J., Young H.A., Tschlis P.N. & Paul W.E. *Immunity* 16, 733–744. (2002)
- 368.** Zijlstra M., Bix M., Simister N.E., Loring J.M., Raulet D.H., Jaenisch R.: Beta2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* 344,742 -746 (1990)
- 369.** Zöller J.E.: Zur malignen Transformation des Epithels der Mundschleimhaut unter Chemotherapie und Chemoprävention. Untersuchungen zur multizentrischen Karzinogenese. 1. Auflage, Quintessenz Verlag, Berlin (1995)

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Thomas Krause
Geburtsdatum	22.10.1980
Geburtsort	Mühlhausen / Thüringen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1987 – 1991	Grundschule Wutha-Farnroda / Eisenach
1991 – 1996	Albert Schweitzer Gymnasium Ruhla / Thüringen
1996 – 1999	Gymnasium Ernestinum Gotha / Thüringen
08/1999	Abitur

Studium

04/2000 – 07/2005	Studium der Zahnmedizin an der Westfälischen Wilhelms Universität Münster
09/2001	naturwissenschaftliche Vorprüfung (Note: 3)
03/2003	zahnärztliche Vorprüfung (Note: 1)
seit 04/2002	Doktorarbeit in der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Uniklinikums der Westfälischen Wilhelms Universität Münster Thema: Genexpressionsanalyse der kokulturellen Verhältnisse zwischen Tumor- und Endothelzellen voraussichtlicher Abschluss: 08/2006
06/2005 - 12/2005	Staatsexamen der Zahnmedizin (Note:1)

8.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich vier Personen, die alle auf unterschiedliche Weise am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren, herzlich danken.

Als erstes geht dieser Dank an Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Johannes Kleinheinz, nicht nur für die Gelegenheit dieses Thema bearbeiten zu dürfen sondern auch für sein Vertrauen und seine Unterstützung in den letzten Jahren.

Ebenso möchte ich Dr. med. Dr. med. dent. Thomas Fillies für seine kritischen Anregungen, die zahlreichen Diskussionen und vor allem aber seiner freundschaftliche Hilfsbereitschaft danken.

Besonderer Dank für ihre freundliche und engagierte Kooperation bei der Durchführung dieser Studie richtet sich zudem an Dr.rer.nat. Nicola Tidow und Dr. med. Dirk Kemming.