

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-KIEFER-GESICHTSCHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. DR. MED. DENT. TORSTEN E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**CHARAKTERISIERUNG DER GENREGULATION DES PUTATIVEN TUMORSUPPRESSORS HECA
BEIM ORALEN PLATTENEPITHELKARZINOM**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ulrich Watzinger

2013

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-KIEFER-GESICHTSCHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. DR. MED. DENT. TORSTEN E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**CHARAKTERISIERUNG DER GENREGULATION DES PUTATIVEN TUMORSUPPRESSORS HECA
BEIM ORALEN PLATTENEPITHELKARZINOM**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ulrich Watzinger

2013

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gottfried Schmalz
Tag der mündlichen Prüfung:	17. Juli 2013

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 ECKDATEN DER KOPF-/HALSTUMOREN	3
1.1.1 EPIDEMIOLOGIE	3
1.1.2 RISIKOFAKTOREN	4
1.1.3 KLINISCHES ERSCHEINUNGSBILD	4
1.1.4 MOLEKULARE PATHOGENESE	5
1.2 DER KANONISCHE WNT/β-CATENIN SIGNALWEG	7
1.2.1 MOLEKULARE GRUNDLAGEN	7
1.2.1.1 Allgemeines	7
1.2.1.2 Rezeptoren, Agonisten und Antagonisten des Wnt/β-Catenin Signalwegs	7
1.2.1.3 Grundmodell der Signaltransduktion	9
1.2.1.4 Regulatorische Funktionen des TCF/LEF-Komplexes	10
1.2.2 DYSREGULATION DES KANONISCHEN WNT-SIGNALWEGS BEIM OSCC	13
1.3 DAS HECA-TUMORSUPPRESSORPROTEIN	14
1.3.1 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN	14
1.3.2 FUNKTIONELLER KONTEXT HECA'S AUF MOLEKULARER EBENE	15
1.3.2.1 Downstream-Regulation	15
1.3.2.2 Upstream-Regulation	17
2. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	19
3. MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 ZELLKULTUR	20
3.1.1 VERWENDETE ZELLINIEN	20
3.1.2 PCI 13-KULTUR	20
3.1.3 HOK-KULTUR	22
3.2 QUALITATIVER FAKTORENNACHWEIS MITTELS RT-PCR	23
3.2.1 PRINZIP	23
3.2.2 RNA ISOLATION	23
3.2.3 cDNA-SYNTHESE	24
3.2.4 PCR	25
3.2.5 ANALYSE MITTELS GELELEKTROPHORESE	27
3.3 GENEXPRESSIONSANALYSE AUF TRANSLATIONSEBENE	28
3.3.1 PRINZIP	28

3.3.2	HERSTELLUNG VON PROTEINLYSATEN	29
3.3.3	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	30
3.3.4	IMMUNOBLOT	31
3.3.4.1	Gelherstellung	32
3.3.4.2	SDS-PAGE und Blotting	33
3.3.4.3	Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper	33
3.3.5	DENSITOMETRISCHE AUSWERTUNG	35
3.4	CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION	36
3.4.1	PRINZIP	36
3.4.2	HERSTELLUNG DER IMMUNPRÄZIPITIERTEN CHROMATINPROBEN	37
3.4.2.1	DNA-Protein Quervernetzung und Chromatin Nucleaseverdau	37
3.4.2.2	Analyse des Chromatinverdaus und der Konzentration	39
3.4.2.3	Immunpräzipitation	39
3.4.2.4	Waschen des immunpräzipitierten Chromatins	40
3.4.2.5	Eluierung des Chromatins aus den Immunkomplexen	42
3.4.2.6	DNA-Aufreinigung	42
3.4.3	ANALYSE MITTELS QUANTITATIVER REAL-TIME-PCR (RT-QPCR)	43
3.4.3.1	Prinzip	43
3.4.3.2	RT-qPCR mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden	44
3.4.3.3	RT-qPCR mit Sybr Green I	46
3.4.3.4	Auswertung mittels relativer Quantifizierung	48
4.	ERGEBNISSE	49
4.1	GENEXPRESSIONSNACHWEIS AUF TRANSSKRIPTIONSEBENE	49
4.1.1	ERGEBNISSE DER PCI 13-ZELLINIE	49
4.1.2	ERGEBNISSE DER HOK-ZELLINIE	50
4.2	IMMUNOBLOT-ANALYSE	51
4.2.1	ERGEBNISSE DER PCI 13 ZELLINIE	51
4.2.2	ERGEBNISSE DER HOK-ZELLINIE	53
4.2.3	ZUSAMMENFASSENDE VERGLEICH ZWISCHEN PCI 13 UND HOK	55
4.3	UNTERSUCHUNG DER FAKTORBINDUNG IN DER HECA-PROMOTORREGION	56
4.3.1	ERGEBNISSE MIT UNBEHANDELTEN PCI 13-ZELLEN	56
4.3.1.1	RT-qPCR mit UPL-Sonden	56
4.3.1.2	RT-qPCR mit Sybr Green	58
4.3.2	ERGEBNISSE NACH INKUBATION MIT DEM WNT-AGONISTEN BIO	59
4.3.3	ERGEBNISSE NACH INKUBATION MIT DEM WNT-ANTAGONISTEN FH535	60

4.3.4	ERGEBNISSE MIT HOK-ZELLEN	61
5.	DISKUSSION	62
5.1	DISKUSSION DER METHODEN	62
5.1.1	RT-PCR	62
5.1.2	IMMUNO-BLOT	63
5.1.3	CHIP-ASSAY	64
5.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	67
5.2.1	REGULATION DER HECA-EXPRESSION DURCH DEN KANONISCHEN WNT-SIGNALWEG	67
5.2.2	REGULATION DER HECA-EXPRESSION DURCH SLUG	72
5.2.3	KLINISCHE RELEVANZ	75
6.	ZUSAMMENFASSUNG	77
7.	LITERATURVERZEICHNIS	78
8.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	86
8.1	ABBILDUNGEN	86
8.2	TABELLEN	86
8.3	DIAGRAMME	87
9.	ANHANG	88
9.1	LABORGERÄTE	88
9.2	VERBRAUCHSMATERIAL	89
9.3	CHEMIKALIEN UND ENZYME	90
9.4	PRIMERBINDUNGSSTELLEN	92
9.5	LEBENS LAUF	93
9.6	DANKSAGUNG	94

1. Einleitung

Mit steigender Tendenz erkranken weltweit jedes Jahr mehr als eine halbe Million Menschen an einem Karzinom im Kopf und Halsbereich (engl. *head and neck squamous cell carcinoma* = HNSCC) (Overgaard, et al., 2010). Die Mehrheit der HNSCCs sind Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, des Pharynx und des Larynx (Hunter, et al., 2005). Trotz der Einführung neuer multimodaler Therapieansätze, ist die Mortalitätsrate nahezu unverändert hoch und die Patienten leiden nach wie vor an den Langzeitfolgen der Therapie (Haddad & Shin, 2008). Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, die Pathogenese der HNSCC auf molekularer Ebene weiter aufzuklären, um auf Basis des tieferen Verständnisses für das fehlgeleitete Zellwachstum sowohl die diagnostischen, als auch die therapeutischen Möglichkeiten weiter zu verbessern.

Dowejko et al. (2009) identifizierten vor diesem Hintergrund das humane Homolog des, aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bekannten, Proteins *headcase* (=HECA) als neuen putativen Tumorsuppressor im Kontext von oralen Plattenepithelkarzinomen (engl. *oral squamous cell carcinoma* = OSCC). Trotz zunehmender Erforschung der antikanzerogenen Eigenschaften HECAs, ist bislang wenig über die molekularen Mechanismen bekannt über die, die Genexpression dieses Proteins gesteuert wird.

Aktuelle Studien lassen diesbezüglich auf der einen Seite eine Verbindung zwischen HECA und dem kanonischen Wnt-Signalweg vermuten. Dieser Regulationspfad spielt nachweislich eine zentrale Rolle während der Embryogenese und bei der regenerativen Erneuerung bestehender Gewebe (Clevers, 2006). Zugleich ist seine konstitutive Aktivierung Kennzeichen vieler Tumorarten, u.a. auch der HNSCC (Molinolo, et al., 2009). Die transkriptionelle Regulation von Wnt-Zielgenen wird hierbei durch Bildung eines Proteinkomplexes aus β -Catenin und TCF/LEF (engl. *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) vermittelt, welcher an spezifischen DNA-Sequenzen innerhalb der jeweiligen Promotorregion der Zielgene bindet (Logan & Nusse, 2004). Neue Daten zeigen in diesem Zusammenhang, dass die Gensequenz HECAs ebenfalls mehrere dieser spezifischen DNA-Sequenzen beinhaltet und insofern als Wnt-Zielgen infrage kommt (Tang, et al., 2008)

Auf der anderen Seite ist aus Drosophilastudien bekannt, dass die Expression von *headcase* durch den Transkriptionsfaktor *escargot* reguliert wird (Steneberg, et al., 1998). Dessen humanes Homolog SLUG ist ein kritischer Faktor bei der epithelial-mesenchymalen Transition und steuert über die Bindung an sogenannte E-box Motive in den jeweiligen Promotorregionen die Expression seiner Zielgene (Casas, et al., 2011; Turner, et al., 2006).

Die Promotorregion HECAs enthält wiederholt diese Sequenzen, so dass vor dem Hintergrund der Drosophilastudien beim Menschen ein analoger Regulationsmechanismus der Genexpression HECAs denkbar ist (Dowejko, et al., 2009).

An diesen Punkten anknüpfend wurde im Rahmen dieser Dissertation anhand einer vergleichenden Studie zwischen OSCC-Zellen und gesunden humanen oralen Keratinozyten (HOK) der Frage nachgegangen, ob die Genexpression HECAs beim Menschen durch den kanonischen Wnt-Signalweg einerseits und den Transskriptionsfaktor SLUG andererseits reguliert wird.

1.1 Eckdaten der Kopf-/Halstumoren

1.1.1 Epidemiologie

Statistisch betrachtet sind HNSCC weltweit die sechsthäufigste Krebserkrankung. Konkret bedeutet dies, dass in etwa 6% aller Neuerkrankungen auf den Kopf und Halsbereich entfallen, wobei am häufigsten der Oropharynx, die Mundhöhle, der Hypopharynx oder der Larynx betroffen sind. In Zahlen ausgedrückt erkrankten demnach pro Jahr ca. 650.000 Menschen und ca. 350.000 sterben an den Folgen (Parkin, et al., 2005). Auf Grundlage der aktuellsten Daten des Robert Koch-Instituts erkrankten im Jahr 2006 in Deutschland 10.860 Personen, 4.734 Menschen starben. Für das Jahr 2010 werden rund 11.400 Neuerkrankungsfälle prognostiziert. Im Hinblick auf die Geschlechterverteilung sind Männer knapp dreimal häufiger betroffen als Frauen. Während bei Männern HNSCC mit einem Gesamtanteil von 3,5% die siebthäufigste Krebsform darstellen, stehen sie bei Frauen mit 1,5% an sechszehnter Stelle. Im Mittel erkrankten Männer mit 60 Jahren, Frauen mit 64 Jahren. In Abhängigkeit der Lokalisation des Tumors liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Männern zwischen 36% und 45%, bei Frauen zwischen 50% und 63% (Robert Koch-Institut, 2010). Betrachtet man die Entwicklung der letzten 30 Jahre (vgl. Abb. 1), so zeigt sich, dass die Neuerkrankungsrate insbesondere der Männer zwar rückläufig ist, das Sterberisiko sich aber kaum geändert hat.

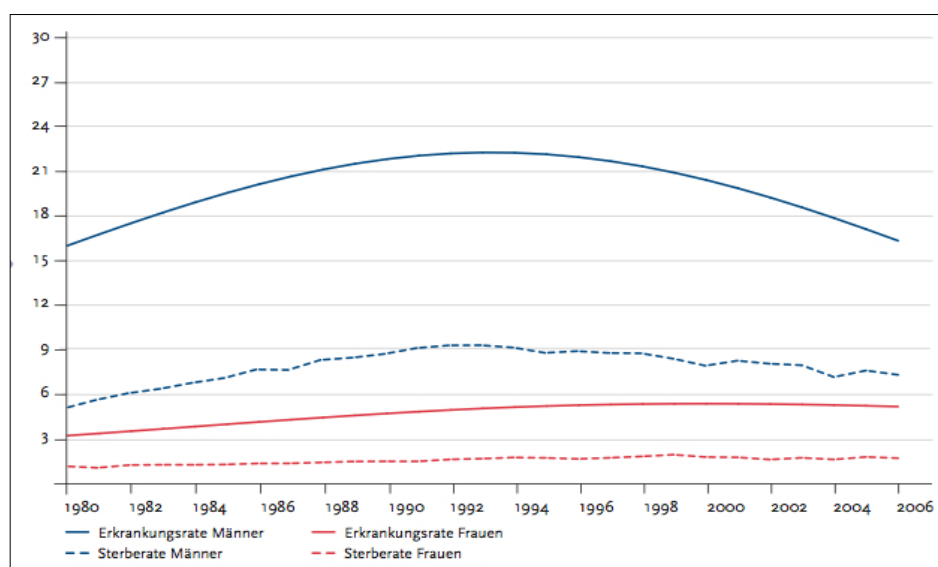


Abb. 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten in Deutschland 1980 – 2006, ICD-10 C00–14 Fälle pro 100.000 (Europastandard) (RKI 2010)

1.1.2 Risikofaktoren

Eine langjährige Raucheranamnese und Alkoholabusus gelten allgemein als Hauptursache für das Auftreten maligner Tumore im oberen Aerodigestivtrakt. Etwa 75% aller HNSCC sind assoziiert mit einer der beiden Noxen. In Kombination multipliziert sich ihr kanzerogener Effekt (Blot, et al., 1988). Daneben gilt das Betelnuss-Kauen als weiterer Risikofaktor, besonders verbreitet in Indien und Südostasien, da sich bei langjährigem Genuss häufig orale submuköse Fibrosen ausbilden können, die allgemein als präkanzeröse Läsionen angesehen werden (Warnakulasuriya, 2002).

Neuere Forschungen konnten zeigen, dass etwa 25% der HNSCC auch Genomanteile des humanen Papilloma Virus (HPV) enthalten (Andrews, Seaman, & Webster-Cyriaque, 2009), welches für seine Beteiligung an der Entstehung von Cervixkarzinomen bekannt ist. Davon sind insbesondere jüngere Patienten mit häufig wechselnden Sexualpartnern und einer Vorliebe für bestimmte sexuelle Praktiken betroffen (Gillespie, et al., 2009). Aufgrund ihrer höheren Strahlen- und Chemosensibilität haben HPV induzierte HNSCC allerdings eine bessere Prognose als Tumore anderer Genese (Licitra, et al., 2006).

Neben diesen Hauptfaktoren und Hinweisen auf eine mögliche erbliche Komponente (Suarez, et al., 2006) erhöhen zudem einige seltene Krankheitsbilder das Risiko an einem HNSCC zu erkranken. Hierzu zählen unter anderem die sideropenische Dysphagie (Plummer-Vinson-Syndrom), der orale Lichen planus, die orale submuköse Fibrose, Syphilis im Tertiärstadium, diskoider Lupus erythematoses, Xeroderma pigmentosum und die Epidermolysis bullosa dystrophica (Reichart, 2003).

1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild

Aufgrund seiner Häufigkeit und dem Entnahmegebiet der in dieser Studie verwendeten Zelllinie, beschränken sich die folgenden Ausführungen auf die Darstellung der klinischen Merkmale des oralen Plattenepithelkarzinoms.

Infolge der meist jahrzehntelangen Schädigung der gesamten Mundschleimhaut durch Alkohol- und Nikotinabusus treten OSCC in der gesamten Mundhöhle auf. Zusätzlich lässt sich oft eine sogenannte Feldkanzerisierung feststellen, d.h. die multifokale, syn- und metachrone Kanzerogenese in tumornahen Epithelabschnitten (Schmezer & Plass, 2008).

Einem Großteil der OSCC gehen präkanzeröse Läsionen voraus. Als solche gelten vor allen Dingen die klinisch häufiger beobachtbaren Leukoplakien, insbesondere die Sonderform der

proliferativ verrukösen Leukoplakie (PVL), deren Entartungsrisiko derzeit in der Literatur mit 4,4-17% beziffert wird, sowie die Gruppe der Erythroplakien, wobei diese meist das Stadium der schweren Dysplasie sogar schon überschritten und sich zu einem invasivem Tumor weiterentwickelt haben (Beck-Mannagetta & Hutarew, 2009).

Statistisch gesehen sind am häufigsten der anteriore und seitliche Mundboden, die Retro-molarregion im Unterkiefer, der Gaumenbogen sowie der seitliche Zungenrand betroffen. Im Anfangsstadium zeigt sich klinisch häufig eine nicht schmerzhaft Veränderung der Schleimhaut. Entsprechend der weiteren Entwicklung werden nach dem Wachstumstyp exophytische und endophytische Formen unterschieden. Während exophytische Typen das Schleimhautniveau überragen und klinisch eine buckelig erodierte, leicht blutende, teilweise mit Fibrinbelag überschichtete Oberflächen zeigen, wachsen endophytische Typen in die Tiefe des Gewebes und äußern sich klinisch meist als Ulkus mit aufgeworfenem Randwall. Hinsichtlich der Malignität bestehen keine Unterschiede zwischen beiden Formen. Sowohl der endophytische als auch der exophytische Typus wachsen lokal infiltrierend und destruierend. Allgemein metastasieren OSCC zumeist in die lokoregionären Lymphknoten, selten kommt es bei fortgeschrittenen Stadien ebenso zur Fernmetastasierung in Lunge, Leber und Knochenmark (Schwenzer & Ehrenfeld, 2002).

Von der histologischen Seite betrachtet entwickeln sich OSCC aus der teilungsfähigen Basalzellschicht heraus, wobei sukzessive gesundes Epithel durch Tumorgewebe ersetzt wird. Entsprechend der pathohistologischen Morphologie, werden in der Folge verruköse, spindelzellige, adenosquamöse, basaloide und adenoide Formen unterschieden. Differentialdiagnostisch davon abzugrenzen sind hauptsächlich von den kleinen Speicheldrüsen in der Mundschleimhaut ausgehende Tumore, insbesondere das adenoid-zystische und mukoepidermoide Karzinom (Böcker, et al., 2008).

1.1.4 Molekulare Pathogenese

OSCC entwickeln sich auf genetischer und epigenetischer Ebene durch die Akkumulation von Defekten progressiv über mehrere Stufen (Hanahan & Weinberg, 2000). Hierzu scheint die absolute Anzahl von Genommutationen entscheidender für die Tumorprogression zu sein, als die chronologische Abfolge einzelner Veränderungen (Califano, et al., 1996). Davon betroffen sind Onkogene oder Tumorsuppressorgene, die infolge des Verlust der Heterozygotie (engl. *loss of heterozygosity* = LOH) bestimmter Chromosomen, Mutationen, Deletio-

nen oder epigenetischen Modifikationen wie beispielsweise Methylierung überexprimiert bzw. inaktiviert werden (Perez-Sayans, et al., 2009; Argiris, et al., 2008). Die Abbildung 2 gibt einen detaillierten Überblick.

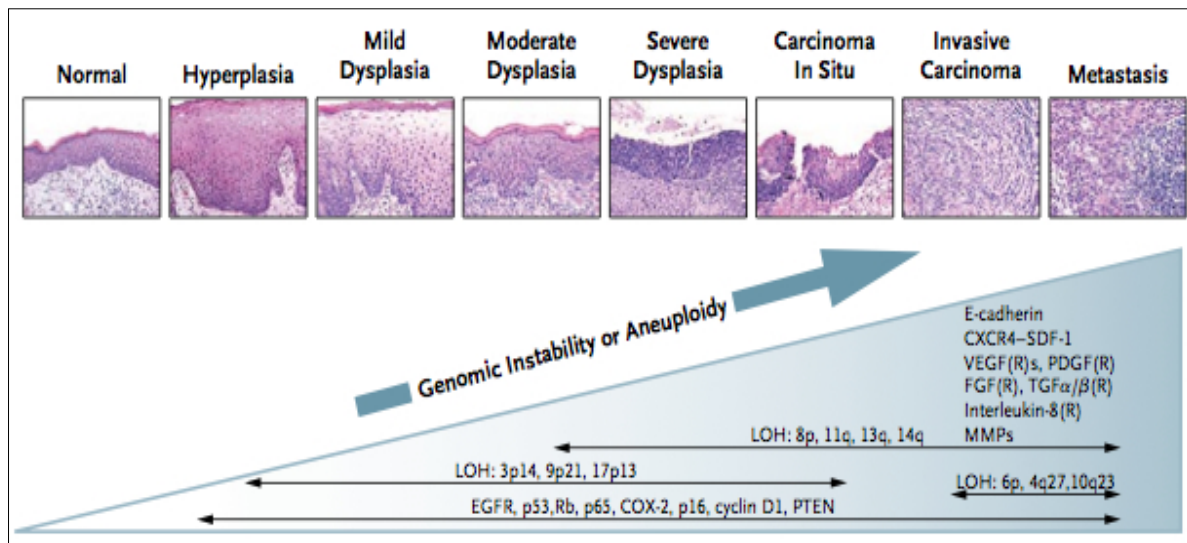


Abb. 2: Modell der genomischen Instabilität und Progression bei OSCC

OSCC entwickeln sich in einem mehrstufigen Prozess ausgehend vom gesunden Epithel bis hin zu einem invasiven Karzinom mit Metastasen. In allen Progressionsstufen können zahlreiche genomische Veränderungen mit jeweils unterschiedlichen statistischen Häufigkeiten nachgewiesen werden. Häufig beobachtete LOH in diesem Kontext finden sich auf den Chromosomen 3p14, 9p21, 17p13, 8p, 11q, 13q, 14q, 6p, 4q27 und 10q23. Auf der anderen Seite werden zahlreiche Onkogene überexprimiert bzw. heraufreguliert. Dazu zählen die epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (engl. *epidermal growth factor receptor* = *EGFR*) inklusive seiner nachgelagerten Signaltransduktionsmechanismen, das Cyclin D1, und die Cyclooxygenase 2 (COX-2). Ebenso zahlreich finden sich inaktivierte bzw. herunterregulierte Tumorsuppressorgene wie p53, p14/16, p65, das Retinoblastomgen (Rb) und das phosphatase and tensin homolog (PTEN). Im weiteren Verlauf sind die Gene für E-cadherin, chemokin receptor-stromal-cell-derived factor (CXCR4-SDF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor-α und -β (TGF-α und TGF-β), Interleukin-8 (IL-8) inklusive seiner Rezeptoren, und Matrixmetalloproteinasen (MMP's) an der lokalen Gewebeinfiltration bzw. der Metastasierung der Tumore beteiligt (Haddad & Shin, 2008).

1.2 Der kanonische Wnt/ β -Catenin Signalweg

1.2.1 Molekulare Grundlagen

1.2.1.1 Allgemeines

Die Wnt-Proteine zählen zu einer, im Tierreich hoch konservierten, Gruppe von Signalmolekülen, die während der Embryogenese die Interaktion der Zellen untereinander steuern und in zahlreichen adulten Geweben an Selbsterneuerungsprozessen beteiligt sind (Clevers, 2006). Sie erhielten ihren Namen als Rijsewijk et al. (1987) die Homologie zwischen dem *Wingless* (Wg) Gen der *Drosophila* Fliege und dem *Int-1* Protoonkogen der Maus bewiesen und damit die Grundlagen zur Erforschung eines ganzen Signalnetzwerks schufen. Das menschliche Genom codiert für etwa 20 Varianten dieser Mediatoren (Logan & Nusse, 2004). Nach heutigem Wissenstand aktiviert deren Bindung an Wnt-Rezeptoren auf der Zelloberfläche entweder den kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweg, den nicht kanonischen PCP (= *planar cell polarity*) Signalweg oder die Wnt/ Ca^{2+} Kaskade, wobei der erstgenannte der am besten untersucht ist und genauso in dieser Arbeit im Fokus steht (Seifert & Mlodzik, 2007; Katoh, 2005; Kohn & Moon, 2005).

1.2.1.2 Rezeptoren, Agonisten und Antagonisten des Wnt/ β -Catenin Signalwegs

Die Signaltransduktionsreaktion des kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalwegs beim Menschen wird initiiert, wenn Wnt-Liganden sowohl an *Frizzled* (Fz) binden, einem Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen und einem cysteinreichen N-Terminus auf der extrazellulären Seite, als auch an die *Low Density Lipoprotein Receptor-related Proteine 5/6* (LRP), zwei Mitglieder der *Low Density Lipoprotein* (LDL)-Rezeptor Familie, und zusammen mit diesen einen trimeren Komplex bildet (Bhanot, et al., 1996; Pinson, et al., 2000; Tamai, et al., 2000). In Ergänzung dazu können Wnt-Proteine gleichfalls an Rezeptoren der *Receptor like tyrosine kinase* (RYK)-Familie binden, deren Rolle im Rahmen des kanonischen Signalwegs bislang allerdings unklar ist (Lu, et al., 2004). Umgekehrt fungieren in diesem Zusammenhang nicht nur Wnt-Faktoren als Liganden von Fz und LRP 5/6, sondern es existieren vielmehr weitere Aktivatoren und Inhibitoren. Zu diesen zusätzlichen Wnt-Agonisten zählt beim Menschen zum einen *Norrin*. Dieses Cystein-Knoten Protein bindet mit hoher Affinität an Fz 4 und aktiviert den kanonischen Signalweg in Abhängigkeit von LRP 5/6 (Xu, et al., 2004). Zum anderen wurde in Zellkulturversuchen gezeigt, dass ebenso das *R-Spondin 1* (Rspo), ein Protein mit einer Thrombospondin Bindungsdomäne, mit LRP 6 und Fz 8 interagiert und auf diesem Weg

Wnt-Reportergene aktiviert (Nam, et al., 2006; Wei, et al., 2007). Auf Seiten der Wnt-Antagonisten inhibiert zum einen das Protein *Dickkopf* (Dkk) die Signaltransduktion, indem es direkt an LRP 5/6 bindet und dadurch den Aktivierungskomplex aus LRP und Fz zerstört (Ellwanger, et al., 2008; Semenov, Zhang, & He, 2008; Wang, et al., 2008). In Ergänzung dazu fungieren die Faktoren *WISE* und *SOST* ebenfalls am LRP-Rezeptor als Wnt-Inhibitoren (Itasaki, et al., 2003; Li, et al., 2005; Semenov, Tamai, & He, 2005). Zu einer weiteren Kategorie von Wnt-Antagonisten zählen das *soluble Frizzled-related Protein* (sFRP) und der *Wnt-Inhibitor-Faktor* (WIF). Während sFRP zur Bindedomäne der Fz-Rezeptoren analoge Motive enthält, ähnelt WIF strukturell den Rezeptoren der RYK-Familie. Beide Faktoren sind auf diesem Weg in der Lage, freie Wnt-Liganden zu binden und dementsprechend die Signalweiterleitung im weiteren Verlauf der kanonischen Transduktionskaskade zu unterbinden (Logan & Nusse, 2004; Hoang, et al., 1996; Hsieh, et al., 1999). Abb. 3 zeigt eine Zusammenfassung.

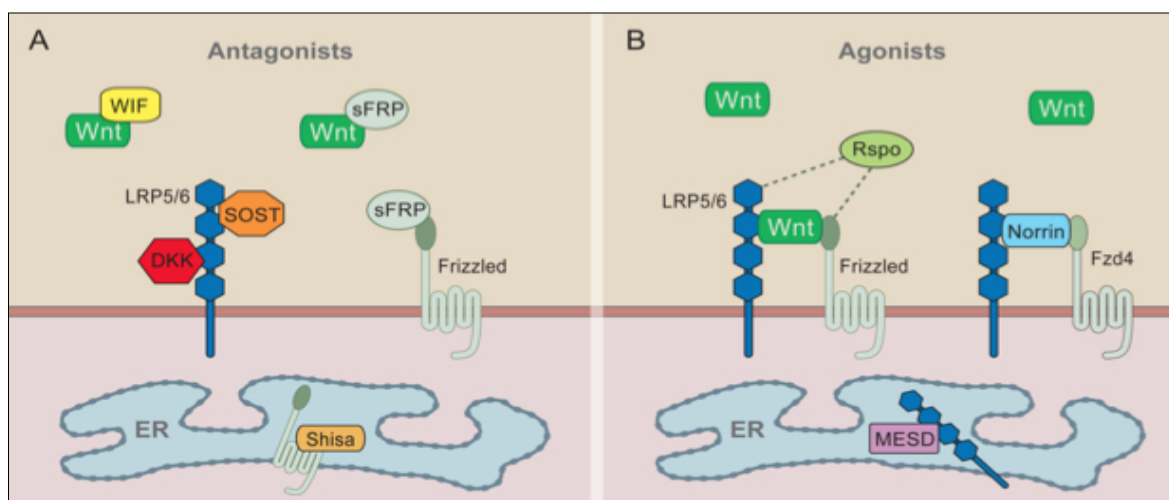


Abb. 3: Übersicht über Wnt-Agonisten und-Antagonisten

In Abbildung (A) sind schematisch die Ansatzpunkte der Wnt-Antagonisten im Rahmen der Signaltransduktionskaskade dargestellt. Die beiden Faktoren WIF und sFRP unterbinden die Signalweiterleitung indem Sie die Wnt-Liganden binden. Die Proteine DKK und SOST sowie WISE (nicht dargestellt) blockieren dagegen den LRP5/6 Rezeptor. Demgegenüber wird in Abbildung (B) die Funktionsweise der Wnt-Agonisten wiedergegeben. Es wird deutlich, dass neben den Wnt-Proteinen auch die Faktoren Rspo und Norrin mittels Bindung an den LRP5/6 - bzw. den Fz - Rezeptor die Signaltransduktion auslösen können (MacDonald, Tamai, & He, 2009).

1.2.1.3 Grundmodell der Signaltransduktion

Das zentrale Element des kanonischen Wnt-Signalweges ist das Protein β -Catenin. Dessen Stabilität wird durch einen zytoplasmatischen Zerstörungskomplex, bestehend aus den Tumorsuppressorproteinen *Axin* und *Adenomatous-polyposis-coli* (APC) sowie den beiden Kinasegruppen *Casein-Kinase* (CK) 1 α , δ , ϵ und *Glykogensynthase-Kinase* (GSK) 3 α , β , kontrolliert (Cadigan & Peifer, 2009; Price, 2006). *Axin* dient hierbei als Grundgerüst des Komplexes und interagiert mit allen anderen Bestandteilen inklusive β -Catenin (Clevers, 2006). Die Rolle des APC ist komplex und noch nicht völlig verstanden. Einige Daten weisen darauf hin, dass dieser Bestandteil den Transport von β -Catenin zur *E3-Ubiquitin-Ligase* (vgl. unten) unterstützt (Su, et al., 2008). Die beiden Kinasen CK 1 und GSK 3 phosphorylieren sequenziell das N-terminale Ende von β -Catenin, wenn der Wnt-Rezeptorkomplex inaktiv ist. In der Folge wird Phospho- β -Catenin zuerst vom *β -Transducin repeat containing protein* (β -TrCP), einer Untereinheit der *E3-Ubiquitin-Ligase*, erkannt bzw. ubiquitinyliert und anschließend im Proteasom der Zelle abgebaut (He, et al., 2004; Aberle, et al., 1997). Dieser kontinuierliche Abbau verhindert, dass β -Catenin den Nucleus der Zelle erreicht und die Expression der Wnt-Zielgene anstößt (MacDonald, Tamai, & He, 2009).

Umgekehrt führt die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges zur Inhibierung der intrinsischen Kinsaseaktivität des Zerstörungskomplexes und damit zur Stabilisierung von β -Catenin in der Zelle. Der konkrete Mechanismus an diesem Punkt ist noch nicht abschließend geklärt (Klaus & Birchmeier, 2008; Kimelman & Xu, 2006). Es gilt als gesichert, dass die Ausbildung des Wnt-Fz-LRP 5/6 Komplexes zur Rekrutierung des Gerüstproteins *Dishevelled* (Dvl) auf Seiten des Fz-Rezeptors führt und diese Verbindung wiederum notwendige Voraussetzung für die Phosphorylierung des LRP 5/6-Rezeptors auf der zellulären Seite ist (Zeng, et al., 2008; Bilic, et al., 2007; Wallingford & Habas, 2005). In Abhängigkeit von dieser Aktivierung rekrutiert der LRP5/6-Rezeptor einen Axin-GSK 3 Komplex aus dem β -Catenin-Zerstörungskomplex und inaktiviert diesen damit (Zeng, et al., 2005; Tamai, et al., 2004). In der Folge akkumuliert unphosphoryliertes β -Catenin in der Zelle und wandert in deren Nucleus. Dort aktiviert es schließlich über die Bindung an den TCF/LEF-Komplex die Expression der Wnt-Zielgene (Behrens, et al., 1996; Molenaar, et al., 1996; van de Wetering, et al., 1997). Abb. 4 veranschaulicht an dieser Stelle die Zusammenhänge.

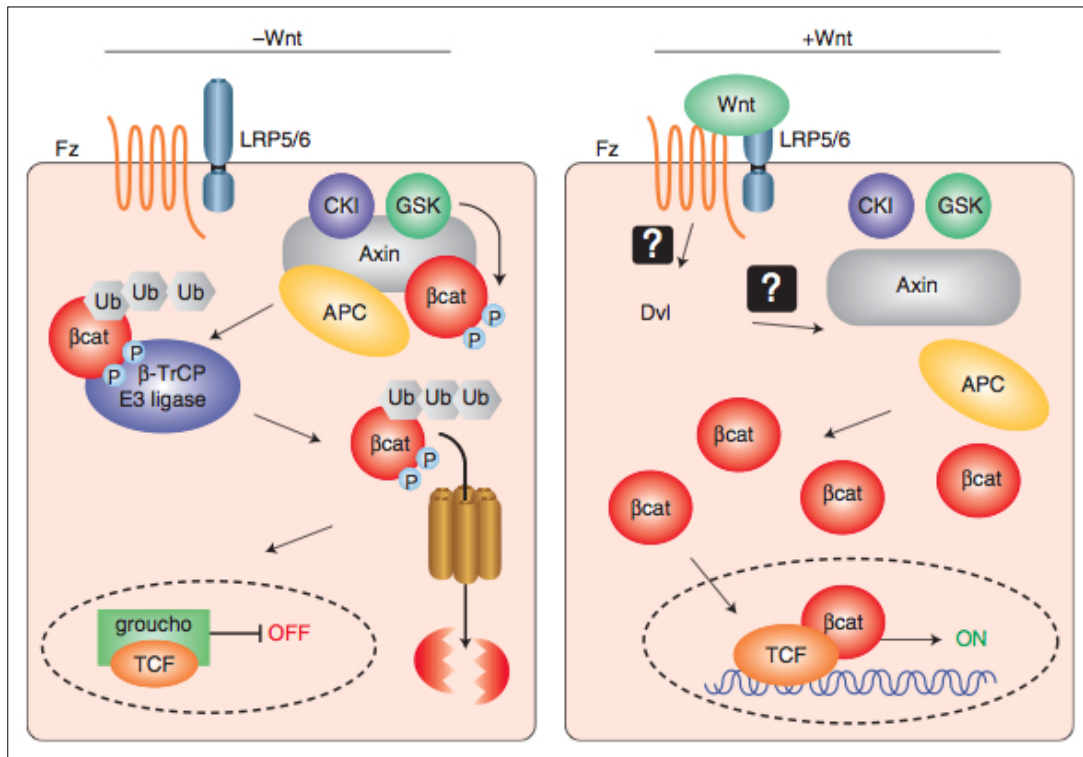


Abb. 4: Vereinfachter Überblick über den kanonischen Wnt-Signalweg

In der linken Bildhälfte (-Wnt) ist der „off“-Status des Wnt-Signalwegs dargestellt. Unter Abwesenheit eines Wnt-Signals phosphoryliert der, aus CKI, GSK, Axin und APC, zusammengesetzte β-Catenin-Zerstörungskomplex kontinuierlich ungebundene β-Catenin-Moleküle in der Zelle. Als Konsequenz daraus wird das so markierte β-Catenin von der β-TrCP E3-Ligase ubiquitinyliert und anschließend im Proteasom der Zelle abgebaut. Dadurch steht es für eine weitere Signalweiterleitung im Nucleus der Zelle nicht mehr zur Verfügung.

Umgekehrt zeigt die rechte Bildhälfte (+Wnt) den „on“-Status des Wnt-Signalwegs. Die Bindung eines Wnt-Liganden an den Fz-LRP5/6-Rezeptorkomplex löst zunächst die Rekrutierung des Faktors Dvl aus. Über einen bislang noch nicht verstandenen Mechanismus führt dies in der Folge zur Herauslösung der Proteine Axin und GSK aus dem β-Catenin-Zerstörungskomplex und damit zu dessen Inaktivierung. Als Konsequenz daraus unterbleibt der kontinuierliche Abbau des β-Catenins, so dass es in den Nucleus der Zelle wandern und dort mittels Bindung an den TCF/LEF-Komplex die Expression der Wnt-Zielgene anstoßen kann (Cadigan & Peifer, 2009).

1.2.1.4 Regulatorische Funktionen des TCF/LEF-Komplexes

Säugetiere inklusive des Menschen besitzen die vier unterschiedlichen TCF-Gene TCF 1, LEF 1, TCF3 und TCF4 (Clevers, 2006). Durch alternatives Spleißen bzw. mittels alternativer Transkription über einen anderen Promoter entstehen zahlreiche Varianten der einzelnen TCFs. Zusätzlich werden diese Isoformen bei ihrer Synthese häufig mittels Phosphorylierung, Acetylierung, Sumoylierung und Ubiquitinylierung/Degradation posttranslational modifiziert (Hoppler & Kavanagh, 2007; Arce, Yokoyama, & Waterman, 2006). Hinzu kommt ein weiterer beachtenswerter Aspekt hinsichtlich der DNA-Bindeeigenschaften der TCFs. Während die

meisten Isoformen mittels ihrer HMG (= high mobility group) Domäne direkt an eine bestimmte, als Wnt-responsive element (WER) definierte, DNA-Sequenz binden, existieren außerdem einige TCF 1 und TCF 4 Varianten, die eine zusätzliche DNA-Bindedomäne, genannt C-Clamp, besitzen, die diese Faktoren in die Lage versetzt, zusätzliche Sets an Zielgenen zu kontrollieren (Atcha, et al., 2007).

In der Summe resultiert daraus ein breites Spektrum regulatorischer Eigenschaften der TCFs sowohl im Zusammenwirken mit β -Catenin, als auch unabhängig vom Wnt-Signal (Hoverter & Waterman, 2008).

Im Grundmodell des kanonischen Signalwegs unterdrücken TCFs bei inaktivem Wnt-Signal zusammen mit dem Repressorprotein *Groucho* (= TLE1 beim Menschen) und weiteren Faktoren die Gentranskription (Cavallo, et al., 1998; Roose, et al., 1998; Willert & Jones, 2006). Im aktiven Modus hingegen verdrängt β -Catenin diese reprimierenden Faktoren aus ihrer Bindung mit den TCFs und veranlasst mittels Rekrutierung von transkriptionellen Coaktivatoren wie der *Histon-Acetylase CBP* (= CREB-binding protein) oder *Brg-1* (= brahma-related gene 1) die Expression der Wnt-Zielgene (Daniels & Weis, 2005; Staedeli, Hoffmans, & Basler, 2006).

Abweichend von diesem Grundmodell zeigen neue Studien, dass bei aktivem Wnt-Signal die Genexpression nicht nur aktiviert, sondern auch unterdrückt werden kann (Hoverter & Waterman, 2008). Zum einen konnte in diesem Zusammenhang nachgewiesen werden, dass TCF/ β -Catenin-Komplexe im Sinne einer kompetitiven Repression andere DNA-bindende Transkriptionsaktivatoren inhibieren oder aus ihrer Bindung zur DNA verdrängen können (Kahler & Westendorf, 2003; Piepenburg, Vorbrüggen, & Jäckle, 2000). Ein anderer Mechanismus ist die direkte Unterdrückung der Genexpression über die β -Catenin induzierte Rekrutierung von transskriptionellen Corepressoren wie dem Protein *Brinker* (Brk) oder Histon-Deacetylasen anstelle von aktivierenden Faktoren. Die Regulation in dieser Beziehung, wann β -Catenin welchen Typ von Cofaktor rekrutiert, ist bislang allerdings nicht geklärt (Jamora, et al., 2003; Olson, et al., 2006; Theisen, et al., 2007). Eine dritte Möglichkeit entdeckten Blauwkamp et al. (2008) im Verlauf einer Studie an *Drosophila*-Zellen. Demnach können TCFs in Abhängigkeit von β -Catenin die Expression von Wnt-Zielgenen ebenso direkt über die Bindung an ein alternatives WRE inhibieren. Umgekehrt sind desweiteren Fälle dokumentiert, in denen die TCFs unabhängig vom Wnt-Signal die Expression bestimmter Gene aktivieren wie beispielsweise für die TCR (= T-cell-receptor) α -Kette (Giese, Cox & Grosschedl, 1992; Carlsson, Waterman & Jones, 1993).

In gleichem Maße besitzen auch die einzelnen TCFs selbst unterschiedliche regulatorische Eigenschaften, wobei eine eindeutige Funktionszuordnung nicht gegeben ist. Vielmehr scheinen die einzelnen Faktoren sich auf Grund großer struktureller Ähnlichkeiten untereinander bzw. innerhalb ihrer Isoformen, abhängig vom zellulären Kontext, teilweise in ihrer Funktion bis hin zur Redundanz zu überschneiden (MacDonald, Tamai & He, 2009). Dennoch lassen sich aus den aktuellen Studien gewisse Tendenzen ableiten. So sind für TCF1 und TCF4 jeweils sowohl aktivierende als auch reprimierende Funktionen dokumentiert. LEF1 scheint hingegen überwiegend als Aktivator zu fungieren, während TCF3 hauptsächlich inhibitorische Funktionen innehat und nur ausnahmsweise als Aktivator fungiert (Hoppler & Kavanagh, 2007; Arce, Yokoyama & Waterman, 2006; Weise, et al., 2010). Abb. 5 fasst die wichtigsten Gesichtspunkte zusammen.

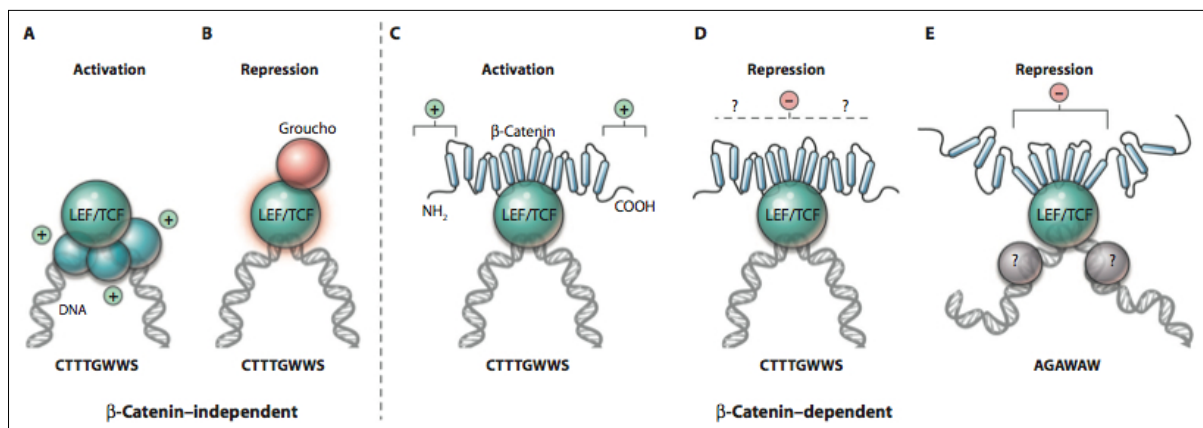


Abb. 5: Mechanismen der Genregulation durch TCF/LEF-Komplexe

(A) TCFs binden mit ihrer HMG-Domäne an die Sequenz CTGGWWS (= Wnt-responsive element), wobei „W“ entweder für T oder A steht. Die Faktoren beeinflussen dadurch die Interaktionen von Proteinen, die angrenzend an das WRE an die DNA gebunden sind und induzieren auf diesem Weg eine Biegung im Doppelstrang. Über diesen als DNA-Bending bezeichneten Mechanismus sind die TCFs in der Lage, die Genexpression unabhängig vom Wnt/β-Catenin Signalweg zu regulieren, d.h. im vorliegenden Beispiel zu aktivieren. (B) TCFs unterdrücken zusammen mit Corepressoren wie Groucho (TLE beim Menschen) bei inaktivem Wnt-Signal die Genexpression. (C) Bei aktivem Wnt-Signal verdrängt β-Catenin die Repressoren und rekrutiert am N- und C-Terminus jeweils Coaktivatoren, um die Genexpression zu starten. (D) TCFs können gleichermaßen bei aktivem Wnt-Signal die Expression einiger Gene unterdrücken. Ein denkbarer Mechanismus ist diesbezüglich die Rekrutierung von transkriptionellen Corepressoren. (E) TCFs unterdrücken die Genexpression bei Drosophila-Zellen auch durch Bindung an die alternative DNA-Sequenz AGAWAW. Die dazu vermutlich benötigten Cofaktoren sind unbekannt (Hoverter & Waterman, 2008).

1.2.2 Dysregulation des kanonischen Wnt-Signalwegs beim OSCC

Die konstitutive Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs ist bei vielen Tumorarten des Menschen ein häufig beobachtetes Ereignis (Reya & Clevers, 2005; Polakis, 2000). In diversen Studien konnte nachgewiesen werden, dass dies auch bei OSCC bzw. schon bei seinen Vorläuferläsionen der Fall ist (Liu & Millar, 2010).

So zeigten beispielsweise Ishida et al. (2007), dass bei oralen Leukoplakien, im Vergleich zu unverändertem oralen Plattenepithel, unphosphoryliertes β -Catenin in verstärktem Maße in den Nuclei der Zellen akkumuliert und zusätzlich der signalauslösende Ligand Wnt-3 konstitutiv exprimiert wird. Daneben wurde Belege dafür gefunden, dass in gleicher Weise bei OSCC selber sowohl Expression als auch zytoplasmatische und nukleäre Akkumulation von β -Catenin erhöht sind (Ueda, et al., 2006; Mahomed, Altini & Meer, 2007; Iwai, et al., 2005). Funktionsverändernde Mutationen des Signalmoleküls wurden hingegen bislang nicht entdeckt (Odajima, et al., 2005; Lo Muzio, et al., 2005). Im Zuge von massenspektroskopischen Untersuchungen an mikrodisszierten OSCC-Zellen wurden ebenso erhöhte Raten von Wnt-14, einem weiteren Mitglied aus der Familie der Wnt-Liganden, festgestellt (Baker, et al., 2005). Daneben wiesen Leethanakul et al. (2000) anhand einer Gen-Reihenanalyse nach, dass die Wnt-Rezeptoren Fz und der Coaktivator Dsh in OSCC überexprimiert werden. Bei weiteren Erhebungen zeigte sich ferner, dass das Tumorsuppressorprotein APC, das für die Integrität und Funktion des β -Catenin-Zerstörungskomplexes notwendig ist (vgl. oben), in 25-39% der OSCC-Fälle infolge von LOH oder epigenetischer Modifikation nur reduziert exprimiert wird und deswegen in seiner Funktion kompromittiert ist (Worsham, et al., 2006; Chang, et al., 2000). Aus den selben Gründen ist auf der anderen Seite gleichfalls die Expression natürlicher Wnt-Antagonisten häufig reduziert (Liu & Millar, 2010). Einige Studien in dieser Hinsicht demonstrierten, dass bei etwa 30-40 % der Tabak, Alkohol oder HPV-assoziierten OSCC-Fälle Hypermethylierungen im Bereich der Promotorsequenzen für SFRP-Gene auftreten (Sogabe, et al., 2008; Marsit, et al., 2006). Ferner wiesen Pannone et al. (2010) derartige Hypermethylierungen ebenso in den Promotorregionen für die beiden Inhibitoren WIF-1 und DKK-3 nach.

In der Summe führen diese Mechanismen zur konstitutiven Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs und damit zur permanenten Überaktivität des β -Catenins. Die daraus resultierende Rolle bei der Etablierung von OSCC ist noch nicht abschließend geklärt. Einiges deutet jedoch daraufhin, dass die Dysregulation dieser Signalkaskade Anteil hat an der Progression der Tumorentwicklung (Molinolo, et al., 2009).

1.3 Das HECA-Tumorsuppressorprotein

1.3.1 Allgemeine Grundlagen

HECA ist das menschliche Homolog des *headcase*-Gens (= *hdc*) des Modellorganismus *Drosophila melanogaster*. Weaver und White (1995) entdeckten dieses Gen mittels eines sogenannten Enhancer trap screens in *Drosophila* auf der Suche nach neuen Zielgenen homeotischer Faktoren des Bithorax-Komplexes. Seinen Namen erhielt es auf Grund der Tatsache, dass Deletionsmutationen in seiner codierenden DNA-Sequenz vor allem die Entwicklung des Fliegenkopfes beeinträchtigen, beispielsweise in Form des kompletten Verlustes der Kopfkapsel oder der Duplikation der Kopfkutikula (Dowejko, 2004).

HECA ist im Tierreich hoch konserviert und zählt zu einer neuen Klasse von Proteinen, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (KOG3816, COG-Database: Clusters of orthologous groups for eukaryotic complete genomes) (Tatusov, Koonin & Lipman, 1997). Die zugehörige Gensequenz liegt beim Menschen auf dem Chromosom 6q23-24. Diese Lokalisation ist insofern von Interesse, als dass speziell in dieser Region bei vielen Tumorarten, inklusive des OSCC, nachweislich gehäuft LOH-Mutationen krebsrelevanter Gene auftreten (Ross, et al., 2007; Smith, et al., 2006; Wong, et al., 2006). In normalen Geweben wird HECA ubiquitär auf basalem Niveau exprimiert, mit den höchsten Expressionsraten in Prostata, Milz und peripheren Blutleukozyten (Chien, et al., 2006). In Malignomen hingegen zeigten Untersuchungen variable Mengen an HECA-Transkripten. Während in Zelllinien des Pankreas- und Nierenkarzinoms die Syntheserate generell herabgesetzt zu sein scheint, zeigten dahingehende Analysen an Zellen des Kolorektalkarzinoms eine Korrelation zwischen dem HECA-Expressionsniveau und der Tumorprogression. HECA könnte deshalb als aussagekräftiger Tumormarker zur Früherkennung des Kolorektalkarzinoms dienen (Chien, et al., 2006; Makino, et al., 2001). Darüber hinaus demonstrierten Dowejko et al. (2009), dass HECA bei OSCC die Zellteilung signifikant verlangsamt. In Verbindung mit dem Wissen um seinen Genlocus als Region häufiger Genommutationen wird daher eine potentiell tumorsuppressive Wirkung des Proteins vermutet (Dowejko, et al., 2009; Makino, et al., 2001).

Die tiefergehende HECA-Regulation und seine Funktionsweise auf molekularer Ebene sind hingegen bislang größtenteils unbekannt. Da HECA und das *Drosophila headcase* sich zu 42% in ihrer Aminosäuresequenz gleichen bzw. sich zu 59% strukturell ähnlich sind, liefern insbesondere Erkenntnisse aus der Fliegenforschung wegweisende Anhaltspunkte für weitergehende Analysen beim Menschen, zumal *Drosophila* als allgemein anerkanntes Modell in der

Tumorforschung gilt (Brumby & Richardson, 2005; Potter, Turenchalk & Xu, 2000; Dowejko, et al., 2009).

1.3.2 Funktioneller Kontext HECAs auf molekularer Ebene

1.3.2.1 *Downstream-Regulation*

Von *headcase* ist aus der Literatur bekannt, dass es bei *Drosophila* zum einen den Wiedereintritt imaginaler Zellen in den Mitosezyklus während der adulten Morphogenese steuert (Weaver & White, 1995) und zudem mit dem Zellzyklusregulator Cyklin K und Bub-like-1, einem an der Ausbildung der Zellspindel beteiligten Faktor, interagiert (Stanyon, et al., 2004; Giot, et al., 2003). Aus diesen Beobachtungen lässt sich insgesamt ableiten, dass das Protein selbst an der Zellzykluskontrolle bei der Fliege beteiligt zu sein scheint (Dowejko, et al., 2009). Mukherji et al. (2006) fanden in diesem Zusammenhang erste bestätigende Hinweise, dass HECA auch beim Menschen dahingehenden Einfluss nimmt. Nach einer RNAi (=interference)-vermittelten Herunterregulierung von HECA in einer Zelllinie des Osteosarkoms beobachteten sie daraus resultierende zytokinetische Defekte in G2/M Zellen mit überproportional vergrößerten Zellkernen und sahen HECA aus diesem Grund im Kontext Krebs-assoziierten, den Zellzyklus regulierender, Gene. Dowejko et al. (2012) bestätigten diese Annahme, indem sie einerseits in HECA-überexprimierenden OSCC-Zellen die Akkumulation des Proteins während G2/M-Phase feststellten und andererseits anhand von vergleichenden Proteinbindungsstudien die direkte Interaktion HECAs mit den Zellzyklusregulatoren CDK 2 und 9 (= cyclin dependent kinase) sowie Cyklin A und Cyklin K in humanen oralen Keratinozyten (HOK) und OSCC nachwiesen. Zu diesem Mediatoren ist aus der Literatur bekannt, dass CDK 2/Cyklin A-Komplexe die Progression des Zellzyklus bewirken (Lindqvist, Rodriguez-Bravo & Medema, 2009). Vor dem Hintergrund seiner antiproliferativen Wirkung schreiben Dowejko et al. (2012) HECA deshalb einen inhibitorischen Effekt auf diesen Komplex zu. Im Gegensatz dazu sind CDK 9/Cyklin K-Komplexe von zentraler Bedeutung für den RSR (= replication stress response)-Signalweg (Yu, et al., 2010). Dieser Mechanismus fungiert als Barriere gegenüber genomischer Instabilität und Tumorgenese und verhindert im Falle einer deregulierten DNA-Replikation oder DNA-Schädigung das Fortschreiten des Zellzyklus (Bartkova, et al., 2005; Koepp, 2010). Im Bezug darauf beobachteten Dowejko et al. (2012), dass die Interaktion zwischen HECA und CDK 9 im Laufe der OSCC-Progression abnimmt und formulierten infolgedessen unter Berücksichtigung, dass Cyclin K in HNSCC er-

wiesenermaßen nur reduziert exprimiert wird (Patel, et al., 2008), eine Modellvorstellung, in der HECA als Teil des RSR-Signalweges fungiert und zusammen mit dem CDK 9/Cyklin K-Komplex die genomische Integrität während der DNA-Replikation sicherstellt (Dowejko, et al., 2012). Daneben ist aus der Literatur bekannt, dass CDK 9 und Cyklin K direkte transkriptionelle Ziele des p53-Tumorsuppressorproteins sind (Claudio, et al., 2006; Mori, et al., 2002) und darum eine dahingehende Verbindung auch für HECA vermutet wird (Dowejko, et al., 2012).

Die vorliegenden Erkenntnisse aus der Drosophila-Forschung liefern noch einen weiteren Anhaltspunkt im Hinblick auf die tumorsuppressiven Eigenschaften HECAs. So demonstrierten Bach et al., dass *headcase* bei der Fliege ein spezifischer Suppressor des Signalmoleküls *stat92E* innerhalb des JAK/STAT (= Janus-kinase signal transducers and activators of transcription)-Signalweges ist (Bach, et al., 2003). Dieser Signaltransduktionsmechanismus ist unter anderem beteiligt an der Regulation der Zellentwicklung, Proliferation und Gewebemhomöostase und steht in Verbindung zu den EGFR. In diesem Zusammenhang ist aus der Literatur einerseits bekannt, dass Fehlfunktionen des Signalmoleküls *stat5A*, das menschlichen Homolog von *stat92E*, mit zahlreichen Krankheitsbildern assoziiert sind und maßgeblich zur Progression maligner Tumore beitragen können (Arbouzova & Zeidler, 2006). Andererseits ist die konstitutive Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs ebenfalls ein häufig beobachtetes Ereignis bei zahlreichen Karzinomen, inklusive der OSCC (Constantinescu, Girardot, & Pecquet, 2008; Grandis, et al., 2000). Auf Grund seiner inhibitorischen Wirkung auf diesen Signalweg bei Drosophila vermuten Dowejko et al. (2009), dass HECA den JAK/STAT-Signalweg gleichfalls beim Menschen negativ reguliert und die Überaktivität veränderter *Stat*-Proteine bis zu einem gewissen Grad zu kompensieren vermag. Im Hinblick auf die Entwicklung von OSCC vertreten sie deswegen die These, dass die konstitutive Aktivierung der wachstumsfördernden JAK/STAT-Signalkaskade möglicherweise ebenso eine Folge der mutationsbedingt herabgesetzten HECA-Expression und des daraus resultierenden Kontrollverlustes sein könnte.

Die Analysen von Alper et al. (2008) förderten noch einen weiteren beachtenswerten Aspekt zu Tage. Nach einer RNAi-vermittelten Herunterregulierung HECAs beobachteten sie bei Mäusen eine herabgesetzte Expression des proinflammatorischen Zytokins Interleukin (Il) -6. Botenstoffe vom Il-6-Typ sind, neben ihrer Funktion als Entzündungsmediatoren, nachweislich an der Regulierung komplexer zellulärer Mechanismen wie beispielsweise der Aktivierung der Gentranskription, der Proliferation oder der Differenzierung beteiligt (Heinrich, et

al., 2003). Untersuchungen zu dieser Thematik konnten belegen, dass IL-6 gemeinsam mit anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und Tumor-Nekrose-Faktor (=TNF)- α mit- hin auch die Promotion und Progression von Malignomen fördern kann (Karin & Greten, 2005). Vor dem Hintergrund der Beobachtung von Alper et al. (2008) vermuten Dowejko et al. (2009) daher, dass HECA als putativer Tumorsuppressor gleichfalls eine Rolle bei der Regulation der IL-6-vermittelten Tumorzellproliferation spielt.

1.3.2.2 Upstream-Regulation

Aus Drosophila-Studien ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor *escargot* (*esg*) die *headcase*-Synthese positiv reguliert (Steneberg, et al., 1998). Dessen humanes Homolog SLUG (Synonym = SNAIL2) spielt eine zentrale Rolle bei der epithelial-mesenchymalen Transition, d.h. bei der phänotypischen Umwandlung von Epithel- in Mesenchymzellen im Verlauf der Embryogenese und Karzinogenese. Durch diesen Übergang erlangen die Zellen ihre Migrationsfähigkeit zurück, d.h. die Möglichkeit die Basalmembran zu passieren und in das Gewebe einzudringen. Diese Eigenschaft ist zugleich ein zentrales Charakteristikum invasiver Malignome (Gavert & Ben-Ze'ev, 2008). Vor diesem Hintergrund weisen einige Daten daraufhin, dass SLUG beim Menschen analog zu Drosophilas *escargot* fungiert und insofern auch HECA reguliert (Dowejko, et al., 2009). Erste Belege für diese Beziehung liefern die Analysen von Turner et al. (2006), die zeigen, dass SLUG, ebenso wie HECA, in basalen Keratinozyten menschlicher Epithelien exprimiert wird und sich infolge seiner Aktivierung die Zellproliferation signifikant verlangsamt. Ergänzend dazu demonstrierten Maeyama et al. (2008) an renalen Epithelzellen des Hundes, dass die Überexpression von SLUG zu einer Mitosearretierung in der G2/M-Phase führt, was sich im Hinblick auf HECA gleichermaßen mit den Untersuchungsergebnissen von Dowejko et al. (2009) bei OSCC deckt. Darüber hinaus enthält die codierende Sequenz des HECA-Gens zahlreiche (>30) sogenannte E-box Motive (CANNTG), an denen SLUG bewiesenermaßen an die DNA bindet und seine Funktion ausübt (Turner, et al. 2006, Dowejko, et al., 2009). Als letzter Aspekt ist zudem erwähnenswert, dass sowohl HECA als auch SLUG, unabhängig voneinander im Erkrankungskontext des CRC als regulatorische Faktoren bzw. potentielle prognostische Parameter erkannt wurden (Chien, et al., 2006; Shioiri, et al., 2006).

Des Weiteren legen aktuelle Publikationen nahe, dass eine Verbindung HECAs zum Wnt-Signalweg existiert. So identifizierten DasGupta et al. (2005) bei Drosophila mittels einer

genomweiten, RNAi-vermittelten, Suche nach neuen Regulatoren des kanonischen Wnt-Signalwegs, das *headcase*-Protein als potentiellen negativen Regulator, insbesondere bei Zellen epithelialen Ursprungs. Daneben fanden Tang et al. (2008) Hinweise, dass beim Menschen das HECA-Gen selbst vom Wnt-Signalweg reguliert wird. Einerseits belegten sie, dass die Gensequenz HECAs mehrere TCF-bindende Enhancer-Elemente beinhaltet und daher als Wnt-Zielgen infrage kommt. Andererseits stellten sie überraschenderweise fest, dass die HECA-Expression nach einer RNAi-vermittelten Herunterregulierung von Tcf712 (=Synonym zu TCF4) in CRC-Zellen anstieg. Sie vermuteten aus diesem Grund, dass HECA Teil eines von TCF 4 kontrollierten, zellulären Programms sein könnte, dass das CRC-Wachstum reguliert.

2. Zielstellung der Arbeit

Ausgehend von den Hinweisen in der Literatur, dass die Genexpression des putativen Tumorsuppressors HECA einerseits durch den kanonischen Wnt-Signalweg und andererseits durch den Transkriptionsfaktor SLUG reguliert werden könnte (vgl. 1.3.2.2), bestand das Ziel dieser Arbeit darin im Sinne einer Pilotstudie diese Regulationswege zu überprüfen, um dadurch die Voraussetzungen für weitergehende Analysen zum funktionellen Kontext HECAs zu schaffen.

Die Untersuchung erfolgte in drei Stufen, wobei alle Daten jeweils als Vergleich zwischen der OSCC-Zelllinie PCI 13 und der gesunden Kontrollzelllinie HOK erhoben wurden. Die ersten beiden Abschnitte sind in diesem Zusammenhang als Vorversuche zur eigentlichen Hauptversuchsreihe im dritten Abschnitt zu sehen und werden in dieser Arbeit dargestellt da deren Ergebnisse nach Meinung des Autors einen sinnvollen Beitrag zur Gesamtinterpretation der Untersuchungsergebnisse liefern.

In der ersten Stufe wurde zunächst anhand von konventionellen PCR-Analysen der Fragen nachgegangen inwieweit die intrazellulären Elemente des Wnt-Signalwegs auf der einen Seite bzw. der Transkriptionsfaktor SLUG auf der anderen Seite in beiden Zelllinien auf Transkriptionsebene exprimiert werden. Darauf aufbauend wurde im zweiten Abschnitt exemplarisch eine Immunoblot-Analyse durchgeführt, mit dem Ziel die Daten der Genexpression sowohl auf mRNA-Ebene auch auf Translationsebene zu verifizieren. Abschließend sollte im dritten Teil die physische Bindung der Wnt-Faktoren TCF3 und TCF4 sowie von SLUG in der Promotorregion des HECA-Gens mittels Chromatin-Immunpräzipitation und anschließender quantitativer Real-Time-PCR nachgewiesen werden.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Verwendete Zelllinien

Die Untersuchungen wurden an der humanen OSCC Zelllinie PCI 13 und an humanen oralen Keratinozyten (HOK) als Kontrollzelllinie durchgeführt.

Die Zelllinie PCI 13 wurde von Prof. T. L. Whiteside (University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) zur Verfügung gestellt. Sie entstammen einem Primärtumor der TNM Klassifikation T4N1M0 im retromolaren Dreieck und wurden wie von Heo et al. (1989) beschrieben hergestellt.

Die Primärzelllinie HOK wurde von ScienCell (Carlsbad, CA, USA) bezogen. Gemäß Hersteller wurden die Zellen aus humaner oraler Mukosa gewonnen und in der weiteren Kultivierung anhand von Cytokeratinmarkern charakterisiert.

Sämtliche Arbeiten an der Zellkultur wurden unter der Sterilbank (Hera Safe, Heraeus, Hanau, D) durchgeführt.

3.1.2 PCI 13-Kultur

Die Zelllinie wurde von der Forschergruppe in flüssigem Stickstoff bei ca. -196° C tiefgefroren gelagert. Zur erstmaligen Kultur wurden die Zellen in einem 37° C Wasserbad aufgetaut und anschließend in einer 75 cm² Zellkulturflasche (Corning Flask, Corning Inc., Corning, NY, USA) ausgesät.

Als Kulturmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Pan Biotech, Aidenbach, D) mit 1,0 g/l Glucose, L-Glutamine, Na-Pyruvat, 3,7 g/l NaHCO₃ und ohne Phenolrot.

Zu je 500ml des Mediums wurde vor der Verwendung jeweils 50ml fetales Kälberserum (FKS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin, D) und 5ml Penicillin/Streptomycin Lösung (Promocell, Heidelberg, D) zugesetzt.

Die Zellen wurden im Brutschrank (Hera Cell, Heraeus, Hanau, D) bei 37° C unter 5,0 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Medienwechsel.

Ab einer Konfluenzrate von 80% wurden die Zellen zur weiteren Kultivierung gemäß folgendem Protokoll gesplittet:

1. Absaugen des Kulturmediums
2. Zweimaliges Waschen mit Dulbecco's 1x PBS (PAA Laboratories, Pasching, AUT)
3. Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA Lösung (Biochrom, Berlin, D) und für ca. 5 min Inkubation im Brutschrank bis zur vollständigen Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche
4. Abstoppen der Reaktion mit 10 ml Kulturmedium und Überführung in ein 15 ml Falcon Röhrchen (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA)
5. 5 min Zentrifugation bei 1200 U/min (Rotina 35 R, Hettich, Tuttlingen, D)
6. Absaugen des Überstandes
7. Resuspendierung in 10 ml Kulturmedium
8. Weiterkultivierung in einer neuen Zellkulturflasche in variablem Mischungsverhältnis

Um weitergehende Erkenntnisse zur Regulation von HECA zu gewinnen, wurden pro Versuchsansatz jeweils sechs Zellkulturflaschen bei 80%-iger Konfluenzrate (entspricht ca. 6×10^7 Zellen) mit Modulatoren des Wnt-Signalwegs behandelt.

Zur Inhibierung des Signalwegs erfolgte eine 24 stündige Inkubation mit jeweils 20 μM FH535 (N-(2-Methyl-4-nitro)-2,4-dichlorosulfonamid) (Merck, Darmstadt, D). Die Substanz blockiert den β -Catenin/Tcf Komplex im Nucleus der Zelle und sorgt auf diesem Weg für eine verminderte Expression der Wnt-Zielgene (Handeli & Simon, 2008).

Um umgekehrt die Signaltransduktion zu verstärken, erfolgte bei einer weiteren Kulturreihe eine 24-stündige Inkubation mit jeweils 4 μM BIO ((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxim) (Sigma-Aldrich, München, D). BIO inhibiert das Enzym GSK 3 α/β und inaktiviert damit ein zentrales Element des β -Catenin Zerstörungskomplexes. In der Folge steht in der Zelle mehr β -Catenin zur Weiterleitung genexpressionsfördernder Signale zur Verfügung (Polychronopoulos, et al., 2004).

3.1.3 HOK-Kultur

Die Zellen wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll behandelt. Auftauen, Aussaat, Inkubation und Medienwechsel erfolgten analog zur PCI 13 Zelllinie.

Als Kulturmedium diente Oral Keratinocyte Medium (OKM). Zu je 500 ml Medium wurde vor der Verwendung jeweils 5 ml Oral Keratinocyte Growth Supplement und 5 ml Penicillin/Streptomycin Solution zugesetzt. Alle Bestandteile wurden von ScienCell (Carlsbad, CA, USA) bezogen.

Das Splitting Procedere erfolgte in weiten Teilen analog zur PCI 13 Zelllinie. Zum Abtrypsinieren der Zellen war 1 ml Trypsin/EDTA Lösung und eine Inkubationszeit von ca. 2 min ausreichend. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 5 ml TNS Lösung (ScienCell, Carlsbad, CA, USA). Um den Zellen eine ausreichende Adhärenz am Boden der Zellkulturflaschen zu ermöglichen, wurden diese im Vorfeld gemäß folgendem Protokoll mit Poly-L-Lysin beschichtet:

1. Je Kulturflasche Zugabe von 10 ml sterilem Wasser und 150 µl Poly-L-Lysin (1 mg/ml)
2. 2 Std. Inkubation bei 37° C
3. 2x Waschen mit sterilem Wasser

3.2 Qualitativer Faktorennachweis mittels RT-PCR

3.2.1 Prinzip

Binnen dieser Studie wurde die Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR) genutzt, um die Expression der signalweiterleitenden Wnt-Faktoren sowie SLUG auf Transkriptionsebene qualitativ in beiden Zelllinien nachzuweisen. Der methodische Ansatz beinhaltet dabei zunächst die Isolation der RNA-Moleküle aus den Zellen. Da RNA nicht direkt als Reaktionsvorlage in einer PCR verwendet werden kann, werden die Sequenzen im nächsten Schritt mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben. Daran anschließend erfolgt schließlich die Analyse dieser DNA anhand einer konventionellen PCR mit spezifischen Primern.

3.2.2 RNA Isolation

Alle RNA Isolationen wurden mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, D), dem unten beschriebenen Protokoll des Herstellers folgend, durchgeführt. Für jedes Experiment wurden hierzu je Zelllinie etwa 6×10^6 Zellen verwendet, entsprechend einer Zellkulturflasche bei 80%-iger Konfluenz. Alle nicht näher benannten Reagenzien und Enzyme waren Bestandteil des Kits.

Protokoll:

1. Ansatz der benötigten Menge Lysispuffer: pro 1 ml Lysispuffer Zusatz von je 10 µl β -Mercaptoethanol (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
2. Einmaliges Waschen mit Dulbecco's 1x PBS und Zugabe von 600 µl Lysispuffer je Zellkulturflasche.
3. Zugabe von 600 µl 70 % Ethanol zu dem Lysat und anschließendes kurzes Vortexen
4. Transfer von 600 µl jedes Lysats in eine RNA-Aufreinigungssäule
5. 30 sec Zentrifugation mit 10.000 rpm bei Raumtemperatur, um die RNA an die Filtermembran zu binden. Verwerfen des Unterstandes.
6. Transfer der verbliebenen 600 µl und Wiederholung von Punkt 5.
7. DNA-Verdau in den Aufreinigungssäulen mit dem RNaseFree DNase Set (Qiagen, Hilden, D):

- a. Zugabe von 350 µl RW1 Waschpuffer und 30 sec Zentrifugation mit 8000 rpm bei Raumtemperatur. Verwerfen des Unterstandes.
 - b. Ansatz des DNase Inkubationsmix je Probe (80 µl): 10 µl DNase-Stocklösung + 70 µl RDD-Puffer. Mischen durch vorsichtige Invertierung des Reaktionsgefäßes.
 - c. Zugabe des DNase Inkubationsmix direkt auf die Filtermembran der Aufreinigungssäulen und anschließende 15 min Inkubation bei Raumtemperatur.
 - d. Wiederholung von Punkt a.
8. Zugabe von 500 µl Waschpuffer RPE auf die Aufreinigungssäule und anschließende 30 sec Zentrifugation mit 10.000 rpm bei Raumtemperatur. Verwerfen des Unterstandes.
 9. Zugabe von 500 µl Waschpuffer RPE auf die Aufreinigungssäule und anschließende 2 min Zentrifugation mit 13.000 rpm bei Raumtemperatur. Anschließender Transfer des Filterröhrchens in ein neues Reaktionsgefäß. Verwerfen des Sammelröhrchens.
 10. Eluierung der RNA aus der Filtermembran mit 50 µl RNase- freiem Wasser für 1 min mit 10.000 rpm bei Raumtemperatur. Wiederholung dieses Elutionsschritts mit dem Eluat.
 11. Lagerung der gewonnenen RNA bei -20°C .

3.2.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthesen wurden mit Hilfe des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, D) , dem Protokoll des Herstellers folgend, durchgeführt. Alle nicht näher benannten Reagenzien und Enzyme waren Bestandteil des Kits.

Zur Normierung der RNA-Menge auf 1 µg pro cDNA-Syntheseansatz wurde im Vorfeld die RNA-Konzentration der Proben mittels Spektralphotometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Als Messreferenz diente an diesem Punkt das zur Eluierung benutzte RNase freie Wasser. Die praktische Durchführung gliederte sich in zwei Abschnitte. Im ersten Schritt wurde zunächst für jede Probe der in Tabelle 1 aufgelistete Template Primer-Mastermix erstellt. Die Volumina an RNA bzw. Wasser wurden diesbezüglich den photometrischen Messwerten entsprechend angepasst. Um eventuell vorhandene RNA-Sekundärstrukturen aufzulösen, wurden im Anschluss die Ansätze 10 min bei 65°C im PCR-Gerät (Peltier Thermal Cycler PTC-200, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) denaturiert und danach wieder auf Eis gekühlt.

Tabelle 1: Template-Primer Mastermix (13 µl)

Menge	Reagenz
1 µl	Oligo dT primer
2 µl	Random hex primer
Variabel (1 µg)	RNA
Variabel	Wasser (PCR Grade)

Im zweiten Schritt wurde der in Tabelle 2 gezeigte Reverse-Transkriptase Reaktionsansatz für jede Probe hergestellt und zu den einzelnen Template-Primer Mastermixen zugegeben.

Tabelle 2: Reverse-Transkriptase Reaktionsansatz (7 µl)

Menge	Reagenz
4 µl	5x Reverse Transkriptase Reaktionspuffer
0,5 µl	Protector RNase Inhibitor
0,5 µl	Reverse Transkriptase
2 µl	10 mM dNTP Mix

Nachfolgend wurde die Umschreibung im PCR-Gerät nach dem in Tabelle 3 dargestellten Protokoll durchgeführt und die gewonnene cDNA hinterher bei -20° C gelagert.

Tabelle 3: RT-PCR Programm

Programmschritt	Temperatur	Dauer
1. Umschreibung	1. Stufe 25° C	10 min
	2. Stufe 55° C	30 min
2. Inaktivierung	85° C	5 min

3.2.4 PCR

Zur praktischen Durchführung der konventionellen PCR Versuche wurden zunächst Mastermixe für die jeweiligen Ansätze mit den in Tabelle 4 genannten Bestandteilen erstellt. Die hierbei in Anwendung gebrachten spezifischen Primerpaare wurden von Eurofins MWG Synthesis (Ebersberg, D) bezogen und sind in Tabelle 5 aufgelistet. Nach Transfer der Ansätze in separate Reaktionsgefäße und anschließender 30 sec Zentrifugation bei 2.000 rpm wurden die Versuche mittels oben genanntem PCR -Gerät nach dem in Tabelle 6 dargestellten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 4: PCR-Reaktionsansatz

Menge	Reagenz
36,5 µl	Wasser (PCR Grade)
10 µl	Go Taq Reaktionspuffer (Promega, Madison, WI, USA)
1 µl	100 mM dNTP Mix (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK)
0,5 µl	Primer forward
0,5 µl	Primer reverse
0,5 µl	Go Taq Polymerase (Promega, Madison, WI, USA)
1 µl	cDNA

Tabelle 5: Verwendete Primer der PCR-Versuche

Primer	Basensequenz
TCF 3 for	5'-CGGGTCTTCCATCCTCGGT-3'
TCF 3 rev	5'-TCTGCCACTGAGAAGGGGG-3'
TCF 4 for	5'-AAAAATGGACCAACTTCTTTGGC-3'
TCF 4 rev	5'-GGAATTGACAAAAGGTGGAGAGA-3'
SLUG for	5'-ATATTCGGACCCACACATTACCT-3'
SLUG rev	5'-GCAAATGCTCTGTTGCAGTGA-3'
β-Catenin for	5'-TACCTCCCAAGTCCTGTATGAG-3'
β-Catenin rev	5'-TGAGCAGCATCAAAGTGTGTAG-3'

Tabelle 6: PCR-Programm

Programmschritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	98° C	3 min
2. Denaturierung	95° C	30 sec
3. Primer-Annealing	61° C	1 min
4. Elongation	72° C	1 min
5. Zyklenzahl	30x Go to Schritt2	
6. Finale Elongation	72° C	5 min
7. Standby	4° C	forever

3.2.5 Analyse mittels Gelelektrophorese

Zur Analyse der Proben wurden jeweils 15 µl der PCR-Produkte zunächst zusammen mit 10 µl eines 100 bp Referenzmarkers (Quick-Load 100 bp DNA Ladder, New England Biolabs, Frankfurt a.M., D) auf ein 1% Agarose-Gel (SeaKem LE Agarose, Biozym Scientific, Oldendorf, D) aufgetragen und anschließend in der Elektrophoresekammer (Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad, München, D) bei 100 V für 35 min aufgetrennt. Als Pufferlösung zur Gelherstellung bzw. als Fließmedium diente dabei 1x TAE Puffer (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, D). Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurden dem Gel zusätzlich 7 µl des nukleinsäure-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) (Sigma-Aldrich Chemie, München, D) zugegeben. Nach der Auftrennung erfolgte die Dokumentation und Auswertung mit dem Intas UV-Geldokumentationssystem (Intas, Göttingen, D).

3.3 Genexpressionsanalyse auf Translationsebene

3.3.1 Prinzip

Im Zuge dieser Arbeit wurde eine Kombination aus diskontinuierlicher SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) und anschließend Immunoblot (sog. „Westernblot“) genutzt, um die Genexpression der vom Wnt-Signalweg aktivierten Transskriptionsfaktoren auf Proteinebene zu untersuchen.

Die SDS-PAGE wird in Anwendung gebracht, um Moleküle anhand ihrer Masse voneinander zu trennen. Diesbezüglich stellt das Gel eine quervernetzte Polymermatrix dar, dessen Dichte über die Konzentration der zugesetzten Acrylamidmonomere an die Größe der zu untersuchenden Proteine angepasst werden kann. Um bei der Proteinauftrennung definierte Banden zu erhalten, wird ein diskontinuierlich strukturiertes Gel eingesetzt, d.h. es ist in ein Sammelgel und ein Trenngel aufgeteilt. Die beiden Gelanteile unterscheiden sich strukturell im Vernetzungsgrad und im pH-Wert. Zur Auftrennung wird an das Gel eine elektrische Spannung angelegt und die Proteine durchwandern in der Folge im elektrischen Feld die Matrix in Richtung der Anode. Die Proben durchlaufen währenddessen zunächst das Sammelgel, in welchem sie am Übergang in das Trenngel auf eine Front fokussiert werden. Im weiteren Verlauf werden dann die einzelnen Proteinfractionen ihrer Größe nach aufgetrennt. Um dies zu ermöglichen, müssen die Proteine im Vorfeld mittels des Detergens SDS negativ geladen und denaturiert werden. Die Menge an gebundenem SDS ist in dieser Beziehung proportional zur Proteingröße. Dementsprechend weisen alle Proteine das gleiche Ladung-zu-Masse Verhältnis auf und werden somit ladungsunabhängig nur nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Identifizierung der Proteine wird separat ein Molekulargewichtsmarker mit auf das Gel aufgetragen.

Nach der Auftrennung werden die Proteine vom Gel auf eine extrem hydrophobe Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert („geblottet“). Zur Vorbereitung auf den Proteintransfer wird die Membran im ersten Schritt zunächst mit Methanol hydrophilisiert. Anschließend wird für den Blot ein elektrisches Feld senkrecht zum „Gel-Membran-Sandwich“ angelegt. In der Folge wandern die Proteine in Richtung Anode aus dem Gel auf die Membran und binden an diese über hydrophobe Wechselwirkungen. Das Trennmuster der Proteinfractionen bleibt dabei nach dem Transfer erhalten, wobei die Übertragungsrate durch An-

färben aller membrangebundenen Proteine anhand unspezifischer Farbstoffe wie beispielsweise Coomassie geprüft werden kann.

Für den spezifischen Nachweis eines bestimmten Proteins werden entsprechende poly- oder monoklonale Antikörper verwendet. Die Membran wird dazu zunächst zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindestellen mit einer Lösung aus Milchpulver oder Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin* = BSA) inkubiert. Anschließend wird die Membran mit dem für das Zielprotein spezifischen Primärantikörper (verdünnt in der Blockierlösung) inkubiert. Zur Visualisierung der spezifischen Proteinbanden wird in der Folge der Primärantikörper wiederum mit einem (Sekundär-)Antikörper detektiert, der zusätzlich kovalent an ein Enzym gebunden ist, das unter Zugabe eines geeigneten Substrates ein fluoreszentes, chromogenes oder chemilumineszentes Signal emittiert, wobei bei dieser Arbeit die letztgenannte Technik zum Einsatz kam. Die chemilumineszenten Signale werden anschließend mit Hilfe von Röntgenfilmen sichtbar gemacht, wobei die Filme hierzu mit variablen Zeitspannen auf der fixierten Membran belichtet werden, um die optimale Signalstärke zu ermitteln. Nach einem Waschschrift kann die Membran erneut geblockt und für die Immundetektion eines anderen Proteins beispielsweise des „Housekeeping“ Referenzgens β -Actin benutzt werden (Burnette, 1981).

3.3.2 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Durchführung eines Experimentes wurden je Zelllinie etwa 6×10^6 Zellen verwendet, entsprechend einer Zellkulturflasche bei 80% Konfluenz. Die Proteinisolation erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Absaugen des Kulturmediums
2. Zweimaliges Waschen mit 10 ml Dulbecco's 1x PBS
3. Zugabe von 1,5 ml PBS in die Zellkulturflasche und anschließendes Abschaben der adhären Zellen mit einem sterilem Zellschaber
4. Transfer der Zellsuspension in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß
5. 5 min Zentrifugation mit 3000 rpm bei 4°C . Verwerfen des Überstandes.
6. Resuspension des Zellpellets je nach Größe in 50-200 μ l RIPA-Lysispuffer (Sigma, St. Louis, MO, USA) (enthält Proteaseinhibitor-Cocktail Complete Mini (Roche, Mannheim, D))
7. 15 min Inkubation auf Eis, dabei alle 3 min vortexen
8. Ultraschallbehandlung zur vollständigen Zellyse: 20 sec, 2 Zyklen, 50%

9. Zentrifugation bei 13000 U/min für 10 min bei 4°C
10. Transfer des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß. Lagerung bei -20°C

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um innerhalb des Immunoblots äquivalente Proteinmengen in den einzelnen Versuchen einsetzen zu können, wurde im Vorfeld die Proteinkonzentration der jeweiligen Lysate mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit (Merck, Darmstadt, D) gemessen.

Die Testmethode erlaubt, basierend auf einer modifizierten Form der Biuretreaktion, die photometrische Bestimmung von Proteinmengen in Zelllysaten. Den Proteinlösungen werden zu diesem Zweck Kupfersulfat und Bicinchoninsäure (engl. *bicinchoninic acid* = BCA) zugesetzt. Die Proteine reduzieren in der Folge die Cu^{2+} -Ionen des Kupfersulfats im alkalischen Milieu zu Cu^{+} -Ionen. Die Anzahl der reduzierten Kupfermoleküle ist in dieser Beziehung direkt proportional zur Proteinmenge in der Lösung. Im zweiten Schritt bilden jeweils zwei BCA-Moleküle mit den freigewordenen Cu^{+} -Ionen einen dunkelvioletten Chelatkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Auf diesem Weg kann mit Hilfe von Standardproteinlösungen nachstehend die Proteinkonzentration in unbekannten Proben ermittelt werden (Smith, et al., 1985).

Bei dieser Studie wurde der Test gemäß den Angaben des Herstellers nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Ansatz der benötigten Menge BCA-Reagenz: pro 5 ml BCA-Solution Zusatz von je 0,1 ml 4% Kupfersulfat (Mischungsverhältnis 50:1)
2. Auftrag der unverdünnten Standardproteinlösungen (variable Konzentrationen von 0-2.000 µg/ml) auf eine 96-Well Platte (10 µl Standard + 200 µl BCA-Reagenz/Well)
3. Auftrag der 1:10 verdünnten Proben (1 µl Probe + 200 µl BCA-Reagenz/Well)
4. 30 min Inkubation bei 37°C. Anschließend Abkühlung auf Eis.
5. Photometrische Messung bei 595 nm (Tecan, Genios, Männedorf, CH; Software Magellan V. 7.0)

Alle Proben wurden jeweils dreimal aufgetragen und gemessen. Der Mittelwert aus diesen Messungen diente im Anschluss als Berechnungsgrundlage zur Normierung der eingesetzten Proteinmengen.

3.3.4 Immunoblot

Die praktische Durchführung des Immunoblots gliederte sich in drei Abschnitte. Die hierzu in Anwendung gebrachten Pufferlösungen sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Verwendete Pufferlösungen im Verlauf des Immunoblots

Puffer	Herstellung
10x TBS-Puffer (1l):	24,2 g Tris Base 80 g NaCl mit HCl auf pH 7,6 einstellen mit H ₂ O _{dest.} auf 1l auffüllen
TBST-Waschpuffer (1l):	100ml 10x TBS-Puffer 1ml Tween-20 mit H ₂ O _{dest.} auf 1l auffüllen
10x Elektrodenpuffer (1l):	30 g Tris Base 144 g Glycin 50 ml 20%iges SDS mit H ₂ O _{dest.} auf 1l auffüllen
10x Transferpuffer (1l):	30 g Tris Base 142 g Glycin 100 ml Methanol mit H ₂ O _{dest.} auf 1l auffüllen

3.3.4.1 Gelherstellung

Die Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine lagen gemäß entsprechenden Literaturangaben im Bereich von 30-92 kDa. Daher wurde zunächst ein an diese Voraussetzung angepasstes 10% Trenngel mit den in Tabelle 8 genannten Bestandteilen zur Proteinauftrennung hergestellt.

Tabelle 8: Zusammensetzung eines 10% Trenngels

Reagenz	Menge
Acrylamid (40%)	2,5 ml
1 M Tris pH 8,8	3,75 ml
H ₂ O _{dest}	3,6 ml
SDS 10%	100 µl
APS 10%	50 µl
TEMED	10 µl

Anschließend wurde das Gel in flüssigem Zustand in die formgebende Kammer des Elektrophoresesystems (Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad, München, D) überführt und nachfolgend 1 ml Isopropanol aufgeschüttet, um eine definierte Abgrenzung des Trenngels zu erreichen. Im nächsten Schritt wurde vorab das Sammelgel mit den in Tabelle 9 genannten Bestandteilen hergestellt und daraufhin das Trenngel, nach dessen vollständiger Polymerisation, mit diesem überschichtet. Während der Aushärtung des Sammelgels wurde gleichzeitig ein Kunststoffkamm mit definierter Kantenlänge zur Formgebung der Geltaschen in die Gelkammer eingelegt.

Tabelle 9: Zusammensetzung des 10% Sammelgels

Reagenz	Menge
Acrylamid (40%)	750 µl
0,5 M Tris pH 6,8	900 µl
H ₂ O _{dest}	5,7 ml
SDS 10%	75 µl
APS 10%	50 µl
TEMED	7 µl

3.3.4.2 SDS-PAGE und Blotting

Im Rahmen der SDS-PAGE wurde zunächst die eingesetzte Proteinmenge auf 30 µg je Probe normiert. Zur Vorbereitung auf die elektrophoretische Auftrennung wurden die Proteinlösungen anschließend mit einem entsprechenden Volumen an SDS-haltigem Laemmli-Puffer (Roti Load 1 (4x), Carl-Roth, Karlsruhe, D) im Mischungsverhältnis 1:4 verdünnt und nachfolgend für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden daraufhin zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (15 µl SeeBlue Plus2 Prestained Standard, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in separate Taschen auf das Gel aufgetragen und anschließend in der mit Elektropuffer gefüllten Kammer für ca. 90 min bei 100 V aufgetrennt.

Im Zuge des sich anschließenden Blots wurde zunächst die PVDF-Membran für 1 min in Methanol inkubiert und anschließend mit Transferpuffer getränkt, um diese für den Proteintransfer vorzubereiten. Daraufhin wurden die Gele aus ihren Kammern gelöst und zusammen mit stabilisierenden Filterpapieren ein „Gel-Membran-Sandwich“ gebildet. Diese Stützkonstruktion wurde anschließend entsprechend ihrer Elektrodenanordnung in der mit Transferpuffer gefüllten Blot-Box platziert und die gelbundenen Proteine in der Folge für ca. 90 min bei 140 mA auf die Membran geblottet.

3.3.4.3 Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper

Der spezifische Proteinnachweis wurde nach dem unten beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die hierbei genutzten Primärantikörper sind in Tabelle 10 aufgelistet. Ergänzend werden in Tabelle 11 die zugehörigen Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase* = HRP) -gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt. Die HRP-Kopplung ermöglicht in diesem Zusammenhang die Visualisierung der spezifischen Proteinbanden, da dieses Enzym unter Zugabe von Luminol (Roti-Lumin, Carl-Roth, Karlsruhe, D) ein detektierbares, chemilumineszentes Lichtsignal an der Bindungsstelle des Sekundärantikörpers emittiert.

Protokoll:

1. Inkubation der Membran in 3% bovinem Serumalbumin (BSA) zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindestellen für 30 min
2. Inkubation mit Primärantikörpern (gelöst in 3% BSA) über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler
3. 3x 5 min Waschen mit TBST-Waschpuffer
4. Inkubation mit Sekundärantikörper für 1 h

5. 3x 5 min Waschen mit TBST-Waschpuffer
6. Inkubation in Luminol-Lösung für 1 min
7. Überführen der Membran in eine Entwicklungskassette
8. Filmentwicklung in der Dunkelkammer nach antikörperabhängigen Belichtungszeiten zwischen 1 und 15 min
9. 3x 5 min Waschen mit TBST-Waschpuffer
10. Blocken mit 3%-igem BSA für 30 min
11. Inkubation mit Primärantikörper β -Actin für 1 h
12. 3x 5 min Waschen mit TBST-Waschpuffer
13. Inkubation mit Sekundärantikörper für 1 h
14. 3x 5 min Waschen mit TBST-Waschpuffer
15. Inkubation in Luminol-Lösung für 1 min
16. Filmentwicklung mit β -Actin Antikörper nach 1 min Belichtungszeit

Tabelle 10: Spezifische Primärantikörper

Name	Hersteller	Prod. #	Herkunft	Konzentration
TCF 3 (D15G11)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	2883	Kaninchen, monoklonal	1 : 1.000
TCF 4 (C48H11)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	2569	Kaninchen, monoklonal	1 : 1.000
SLUG	Abcam (Cambridge, UK)	ab27568	Kaninchen, polyklonal	1 : 1.000
β-Catenin	BD Biosciences (Bedford, MA, USA)	610153	Maus, monoklonal	1 : 1.000
β-Actin	Abcam (Cambridge, UK)	ab8227	Kaninchen, polyklonal	1 : 12.000

Tabelle 11: Sekundärantikörper

Name	Hersteller	Prod. #	Herkunft	Zielantikörper	Konzentration
Stabilized Goat Anti-Mouse IgG (HRP linked)	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)	32430	Ziege, polyklonal	β -Catenin	1 : 1.000
Stabilized Goat Anti-Rabbit IgG (HRP linked)	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)	32460	Ziege, polyklonal	TCF 3, TCF 4, SLUG, β -Actin	1 : 3.000

3.3.5 Densitometrische Auswertung

Die auf Röntgenfilmen dokumentierten Immunoblots wurden mit einer Auflösung von 300 dpi eingescannt (CanoScan Lide 500, Canon, Chichibu, JP; Software CanoScan Toolbox X for Mac OS X, Version 4.9.3.4) und im Anschluss mit Hilfe von Adobe Photoshop CS 3 entsprechend dem untenstehenden Protokoll densitometrisch erfasst und ausgewertet. Bei der in Punkt 5 des Protokolls genannten relativen Quantifizierung wird das Verhältnis der Ziel-DNA zu der Anzahl an PCR-Produkten eines endogenen Referenzgens ermittelt. Zu diesem Zweck werden für die Aufrechterhaltung basaler Zellfunktionen wichtige, sogenannte „Housekeeping“-Gene als Referenztranskripte herangezogen, da diese in den Zellen konstitutiv exprimiert werden und dementsprechend in allen Proben gleichermaßen enthalten sein sollten.

Protokoll:

1. Umkehrung der Farbinformation in Graustufen
2. Invertierung der Bildinformation
3. Markierung der einzelnen Banden mit dem Polygon-Lasso-Werkzeug bei 500% Zoom
4. Dokumentation des Produktes aus Tonmittelwert und der Pixelanzahl für jede Bande
5. Relative Quantifizierung der einzelnen Proteinbanden anhand der Referenzbande für das „Housekeeping“-Gen β -Actin

3.4 Chromatin-Immunpräzipitation

3.4.1 Prinzip

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) stellt eine Methode dar, mit deren Hilfe Protein-DNA Interaktionen im Chromatinkontext einer lebenden Zelle nachgewiesen werden können (Orlando, 2000). Das Verfahren erlaubt einerseits, zahlreiche Proteine zu identifizieren, die mit einer bestimmten DNA-Region assoziiert sind, andererseits können umgekehrt auch die DNA-Abschnitte ermittelt werden mit denen ein untersuchtes Protein in Verbindung steht (Weinmann & Farnham, 2002).

Der methodische Ansatz beinhaltet dazu zunächst die reversible Quervernetzung der Protein-DNA-Komplexe in der Zelle durch eine Kondensationsreaktion mittels Formaldehyd. Nach Zelllyse und Fragmentierung der chromosomalen DNA werden anschließend durch selektive Immunpräzipitation diejenigen DNA-Elemente angereichert, welche spezifisch vom untersuchten DNA-Bindeprotein gebunden werden. Die DNA-Elemente werden abschließend von den quervernetzten Protein-Antikörperkomplexen gereinigt und können dann unter anderem mittels quantitativer Real-Time-PCR (RT- qPCR) nachgewiesen werden (List & Walter, 2007). Die Abb. 6 zeigt eine Übersicht des methodischen Prinzips.

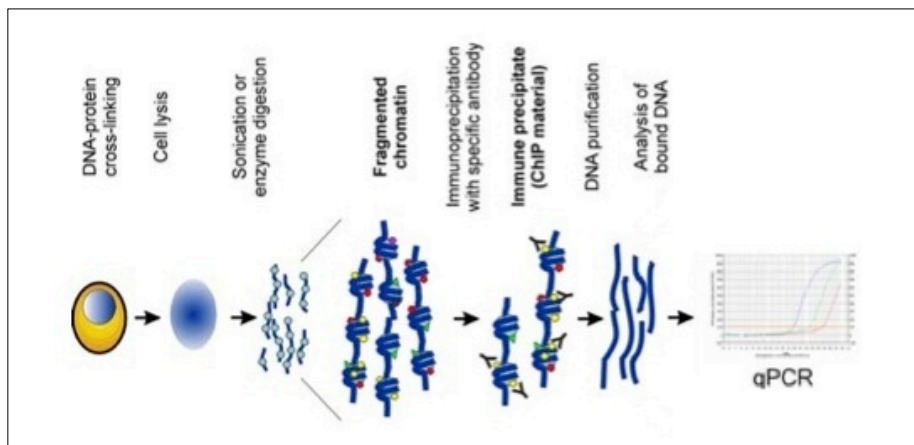


Abb. 6: Prinzip der Chromatin-Immunpräzipitation

Die Abbildung zeigt den methodischen Ablauf der Chromatin-Immunpräzipitation. Im ersten Schritt werden die Zellen mit Formaldehyd inkubiert, um die zellulären Protein-DNA-Komplexe reversibel zu fixieren. Über mehrere Aufbereitungsschritte (Zelllyse, Fragmentierung der chromosomalen DNA) werden dann mittels selektiver Immunpräzipitation diejenigen DNA-Abschnitte aus der Gesamtheit zellulären DNA isoliert, die vom untersuchten DNA-Bindeprotein spezifisch gebunden werden. Daran schließt sich ein Reinigungsprotokoll an, in dessen Verlauf die spezifischen DNA-Fragmente von den Antikörper-Proteinkomplexen getrennt werden. Abschließend erfolgt die Analyse der DNA-Proben mittels RT-qPCR (Collas, 2010).

3.4.2 Herstellung der immunpräzipitierten Chromatinproben

Für alle ChIP Assays wurde das SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (New England Biolabs, Frankfurt a. M., D) verwendet und entsprechend dem Protokoll des Herstellers verfahren. Zur Durchführung eines Experimentes wurden ca. 4×10^7 Zellen benötigt, um eine entsprechende Chromatinkonzentration zu erreichen. Das entsprach je nach Zelllinie etwa 6 Zellkulturflaschen bei 80% iger Konfluenz.

Der gesamte Prozess gliedert sich in fünf Teilabschnitte und einem zusätzlichen Protokoll zur Optimierung der DNA-Konzentration und der DNA-Fragmentlängen. Alle nicht näher benannten Reagenzien und Enzyme waren Bestandteil des Kits.

3.4.2.1 DNA-Protein Quervernetzung und Chromatin Nucleaseverdau

Benötigte Pufferlösungen:

- 12 ml Dulbecco's 1x PBS + 120 μ l 0,1 M Phenylmethanesulfonylfluorid Solution (PMSF) (Sigma Aldrich Chemie, München, D)
- 10 ml 1x Puffer A (2,5 ml 4x Puffer A + 7,5 ml Wasser) + 5 μ l 1 M DTT + 50 μ l 200x Protease Inhibitor Cocktail (PIC) + 100 μ l PMSF
- 11 ml 1x Puffer B (2,75 ml 4x Puffer B + 8,25 ml Wasser) + 5,5 μ l 1M DTT
- 1 ml 1x ChIP Puffer (100 μ l 10x ChIP Puffer + 900 μ l Wasser) + 5 μ l 200x PIC + 10 μ l PMSF

Durchführung:

1. Zugabe von je 625 μ l 16%-igen Formaldehyds (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) zu jeder Zellkulturflasche mit 10ml Medium und anschließende 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur zur DNA-Protein Quervernetzung
2. Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 2ml 10x Glycin und Inkubation für weitere 5 min bei Raumtemperatur
3. Zweimaliges Waschen mit 20 ml eisgekühltem Dulbecco's 1x PBS
4. Zugabe von 2 ml PBS + PMSF je Zellkulturschale, Ernten der Zellen mittels Zellschaber (BD Falcon Cell Scraper, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA) und anschließendes Sammeln aller Zellen in einem 15 ml Falcon

5. 5 min Zentrifugation (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg, D) mit 1.500 rpm bei 4° C, Verwerfen des Überstandes und Resuspendierung des Zellpellets in 10 ml Puffer A + DTT + PIC + PMSF. Anschließend 10 min Inkubation auf Eis bei regelmäßiger Durchmischung alle 3 min durch Schwenken des Röhrchens
6. 5 min Zentrifugation mit 3.000 rpm bei 4° C, Verwerfen des Überstandes, Resuspendierung des Zellpellets in 10 ml eiskaltem Puffer B + DTT. Wiederholung der Zentrifugation. Erneutes Verwerfen des Überstandes und Resuspendierung des Zellpellets in 1 ml Puffer B + DTT. Überführung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf Cup, Eppendorf, Hamburg, D).
7. Zugabe von 5 µl (PCI 13) bzw. 4 µl (HOK) Micrococcal Nuclease und 20 min Inkubation bei 37° C im Thermomixer bei 1.000 rpm (Thermomixer Comfort 5355, Eppendorf, Hamburg, D) zum Verdau der DNA auf eine Fragmentlänge von etwa 150-900 bp.
8. Abstoppen des Verdaus durch Zugabe von 100 µl 0,5 M EDTA und Kühlung des Reaktionsgefäßes auf Eis
9. 1 min Zentrifugation mit 13.000 rpm bei 4° C und Verwerfen des Überstandes
10. Resuspendierung des Zellpellets in 1 ml 1x CHIP Puffer + PIC + PMSF und anschließende Aufteilung zu je 500 µl auf zwei Reaktionsgefäße
11. Ultraschallbehandlung (Sono Plus, Bandelin, Berlin, D) des Zellpellets, um die Zellmembran aufzubrechen (vgl. Abschnitt Optimierung der DNA Konzentration und Fragmentlängen):
 - PCI 13: 3x 20 sec, 2 Zyklen, 30%
 - HOK: 3x 30 sec, 2 Zyklen, 60%
12. Reinigung der Zelllysate durch 10 min Zentrifugation mit 10.000 rpm bei 4° C
13. Transfer der Überstände in ein neues Reaktionsgefäß. Verwerfen der zurückbleibenden Zelltrümmer.

Die aus diesem Procedere gewonnene, quervernetzte Chromatinpräparation wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80° C (586 Basic AFC, Heraeus, Hanau, D) eingefroren. Zur Analyse des Verdaus und der Bestimmung der DNA Konzentration wurden jeder Präparation vorher 50 µl entnommen.

3.4.2.2 Analyse des Chromatinverdaus und der Konzentration

1. Zugabe von 100 µl nucleasefreien Wassers (Sigma-Aldrich Chemie, München, D), 6 µl 5 M NaCl und 2 µl RNase A zur 50 µl Chromatinprobe zum Verdau der in der Probe befindlicher RNAs. Anschließendes Vortexen (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) und 30 min Inkubation bei 37° C.
2. Zugabe von 2 µl Proteinase K zum Verdau in der Probe befindlicher Proteine. Durchmischung mittels Vortexen und anschließende 2 h Inkubation bei 65° C.
3. Aufreinigung der DNA Probe analog des in Abschnitt 4.4.2.6 beschriebenen Prozesses

Zur anschließenden Analyse der Fragmentlängen wurden 10 µl der gereinigten DNA Probe mit 2 µl 6x Loading Dye (Fermentas, St. Leon-Rot, D) vermischt und analog dem in Punkt 3.2.5 dargestellten Verfahren gelelektrophoretisch aufgetrennt bzw. dokumentiert.

Die Chromatinkonzentration der Probe wurde mittels Spektralphotometrie (Picodrop Microtitre, Picodrop, Saffron Walden, UK) in einem Wellenlängenbereich von 230-850 nm gemessen. Als Messreferenz diente in diesem Zusammenhang der zur Aufreinigung gebrauchte DNA Elutionspuffer. Mit Hilfe der zum Messsystem gehörigen Software (Version 2.08) wurde aus dem für Doppelstrang-DNA typischen Absorptionsmaximum bei 260 nm die Konzentration der Probe errechnet.

3.4.2.3 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde nach untenstehendem Protokoll durchgeführt. Die dabei verwendeten Antikörper sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Protokoll:

1. Auftauen der quervernetzten Chromatinpräparation (vgl. 2.2.2.1) auf Eis
2. Vorbereitung der Masterlösung je Ansatz:
 - 400 µl 1x ChIP Puffer (40 µl 10x ChIP Puffer + 360 µl Wasser)
 - 2 µl PIC
 - 100 µl der quervernetzten Chromatinpräparation
3. Entnahme einer 10 µl Probe (2% eines Ansatzes) aus der Masterlösung und Lagerung bei -20° C bis zur weiteren Verwendung. Dieser Probe wurde im weiteren Verlauf kein Antikörper zugeben und enthielt dementsprechend 2% der Chromatinkonzentration eines Ansatzes. Bei der Auswertung der qPCR diente die Probe in der Folge als

Referenzwert zur quantitativen Berechnung der Reaktionsprodukte.

4. Über Nacht Inkubation der Ansätze mit je 1 µg des jeweiligen Antikörpers bei 4°C im Rotationsmischer (Kisker Biotech, Steinfurt, D).

Tabelle 12: Im Rahmen der CoIP verwendete Antikörper

Name	Hersteller	Prod. #	Herkunft	Volumen (1 µg)
Normal Rabbit IgG (Negativkontrolle)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	2729	Kaninchen, polyklonal	1 µl
Histon H3 Antibody (Positivkontrolle)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	2650	Kaninchen, polyklonal	10 µl
TCF 3 (D15G11)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	2883	Kaninchen, monoklonal	2,27 µl
TCF 4 (C48H11)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	2569	Kaninchen, monoklonal	14,49 µl
SLUG	Abcam (Cambridge, UK)	ab27568	Kaninchen, polyklonal	10 µl

3.4.2.4 Waschen des immunpräzipitierten Chromatins

Zur Isolierung der spezifischen Immunkomplexe wurden den einzelnen Ansätzen im Anschluss an die Präzipitation zunächst je 30 µl Protein G Magnetic Beads zugegeben und die Proben anschließend für 2 h bei 4° C im Rotationsmischer inkubiert.

Das dahinterstehende Prinzip beruht auf der hohen Affinität von Protein G (ein rekombinantes bakterielles Zellwandprotein) zur unspezifischen Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps IgG. Es eignet sich daher, um spezifische IgG-Immunkomplexe nachzuweisen bzw. aus Zelllysaten zu isolieren (Bjorck & Kronvall, 1984; Eliasson, et al., 1988). Seine Kopplung an magnetische Partikel erleichtert insbesondere die Isolation der gesuchten Immunkomplexe, da sie deren physikalische Trennung von unspezifischen Proteinen mit Hilfe einer magnetischen Trennvorrichtung ermöglicht. Abb. 7 verdeutlicht die Methode.

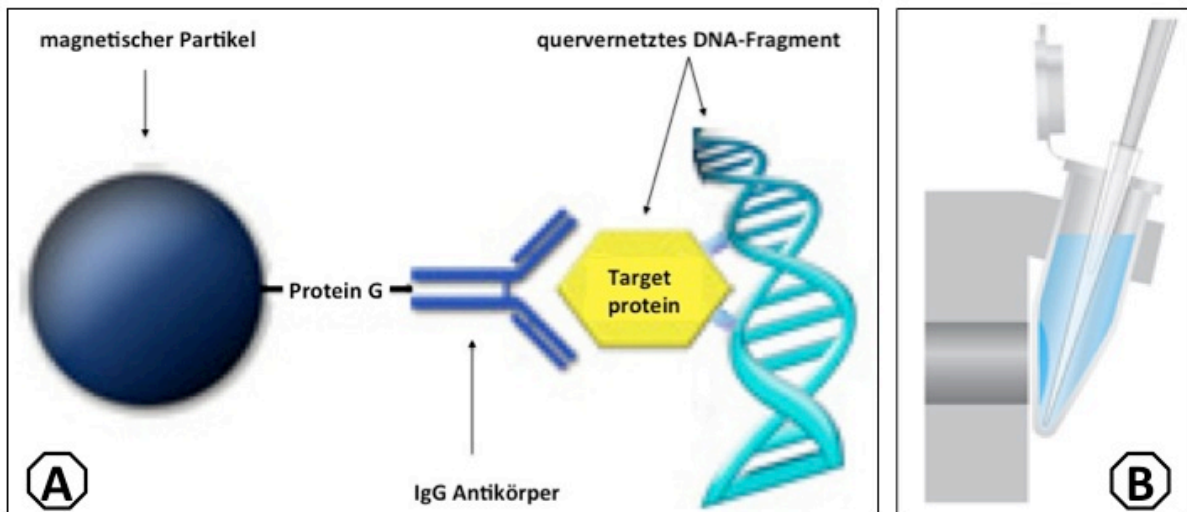


Abb. 7: Isolation der spezifischen Immunkomplexe mittels Protein G-Magnetic-Beads

In der linken Bildhälfte (A) ist ein Protein G-Magnetic-Bead-gebundener Immunkomplex dargestellt. Protein G bindet spezifisch die Fc-Region von IgG-Immunglobulinen. Seine Kopplung an einen magnetischen Partikel ermöglicht eine physikalische Isolierung der spezifischen Immunkomplexe aus einem Zelllysate mit Hilfe einer magnetischen Trennvorrichtung (biozym.com, 2011). Die rechte Bildhälfte (B) zeigt exemplarisch diesen Abscheideprozess im Reaktionsgefäß während eines Waschvorgangs (biotechniques.com, 2011).

Nach Inkubation mit den Protein G-Magnetic-Beads wurden die Proben nach folgendem Protokoll gereinigt:

1. Vorbereitung der Waschlösungen je Ansatz:
 - Niedrigsalzhaltige Waschlösung : 3 ml 1x ChIP Puffer (300 µl 10x ChIP Puffer + 2,7 ml Wasser)
 - Hochsalzhaltige Waschlösung: 1 ml 1x ChIP Puffer (100 µl 10x ChIP Puffer + 900 µl Wasser) + 70 µl 5 M NaCl
2. Platzierung der Ansätze in der magnetischen Trennvorrichtung (Magnetic Separation Rack, Merck, Darmstadt, D) (vgl. Abbildung) für 2 min bis zur Abscheidung der Magnetic Beads-Protein G-gebundenen Immunkomplexe. Verwerfen der Überstände.
3. Waschen durch Zugabe von 1 ml der niedrigsalzhaltigen Waschlösung und Inkubation für 5 min im Rotationsmischer. Anschließend analoges Vorgehen wie in Punkt 2.
4. Zweimalige Wiederholung des Waschvorgangs mit der niedrigsalzhaltigen Waschlösung, um die restlichen überschüssigen Antikörper und DNA-Fragmente aus den Ansätzen zu entfernen.
5. Wiederholung des Waschvorgangs mit 1 ml der hochsalzhaltigen Waschlösung, um

unspezifisch gebundene Protein G-Magnetic Beads von der DNA abzulösen und aus der Lösung zu entfernen.

6. Fortfahren mit der Eluierung des Chromatins aus den Immunkomplexen.

3.4.2.5 Eluierung des Chromatins aus den Immunkomplexen

1. Auftauen der 2% Probe (vgl. 2.2.2.3) auf Eis. Zugabe von 150 µl 1x ChIP Elutionspuffer (75 µl 2x ChIP Elutionspuffer + 75 µl Wasser) und weitere Lagerung bei Raumtemperatur bis Punkt 6.
2. Platzierung der Ansätze in der magnetischen Trennvorrichtung für 2 min bis zur Klärung der Lösung. Verwerfen der Überstände.
3. Zu jedem Ansatz Zugabe von 150 µl 1x ChIP Elutionspuffer.
4. Eluierung des Chromatins aus den Magnetic Beads-Protein G – Immunkomplexen und Umkehrung der Protein – DNA Quervernetzung für 30 min bei 65° C im Thermomixer mit 1200 rpm.
5. Platzierung der Ansätze in die magnetische Trennvorrichtung für 2 min bis zur Klärung der Lösung. Transfer der Überstände in neue Reaktionsgefäße.
6. Zu allen Ansätzen und der 2% Probe Zugabe von 6 µl 5 M NaCl + 2 µl Proteinase K zum Proteinverdau und anschließende 2 h Inkubation bei 65° C
7. Fortfahren mit der DNA-Aufreinigung.

3.4.2.6 DNA-Aufreinigung

Basierend auf dem Prinzip der solide-Phasen-Extraktion (SPE) wurde die DNA mit Hilfe von Drehbeschleunigungssäulen (DNA Purification Columns, New England Biolabs, Frankfurt a. M., D) nach folgendem Protokoll aufgereinigt:

1. Zugabe von 750 µl DNA – Bindungspuffer und anschließendes kurzes Vortexen
2. Transfer von 450 µl jeden Ansatzes in eine DNA-Aufreinigungssäule
3. 30 sec Zentrifugation mit 14.000 rpm bei Raumtemperatur (Mini Spin, Eppendorf, Hamburg, D) um die DNA an die Filtermembran zu binden. Verwerfen des Unterstandes.
4. Transfer der verbliebenen 450 µl und Wiederholung von Punkt 3.
5. Zugabe von 750 µl DNA-Waschpuffer und Wiederholung von Punkt 3.

6. 30 sec Zentrifugation mit 14.000 rpm bei Raumtemperatur. Anschließender Transfer des Filterröhrchens in ein neues Reaktionsgefäß. Verwerfen des Sammelröhrchens.
7. Zugabe von 50 µl DNA Elutionspuffer und Eluierung der DNA aus der Membran des Filterröhrchens mittels 30 sec Zentrifugation mit 14.000 rpm bei Raumtemperatur.
8. Lagerung der gewonnenen DNA Proben bei -20° C.

3.4.3 Analyse mittels quantitativer Real-Time-PCR (RT-qPCR)

3.4.3.1 Prinzip

Die quantitative Real-Time-PCR basiert auf dem Prinzip der konventionellen Polymerase Kettenreaktion (PCR) und erlaubt über die Zugabe von Fluoreszenzmarkern neben dem qualitativen Nachweis zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA-Menge. Im Rahmen des PCR-Laufs wird dabei während jedes Reaktionszyklus die Fluoreszenzintensität gemessen, die bei der Bildung der PCR-Produkte entsteht. Die gewonnenen Messwerte liefern graphisch als Funktion dargestellt eine Amplifikationskurve, deren sigmoider Verlauf den typischen Ablauf der Reaktion widerspiegelt. Während in der ersten Phase die Menge an PCR-Produkten noch unterhalb der Nachweisgrenze liegt, geht die Reaktion im weiteren Verlauf in eine Phase über, bei der die DNA-Synthese auf Grund im Überschuss vorhandener Reaktionssubstrate nahezu exponentiell verläuft. Mit zunehmendem Substratmangel flacht die Reaktion im dritten Teil schließlich ab und geht in eine Plateauphase über. Als Berechnungsgrundlage zur Quantifizierung der gewonnenen DNA-Mengen dient der C_T -Wert (engl.: *cycle threshold* = Schwellenwertzyklus). Dieser Wert bezeichnet den Zyklus, in dem zum ersten Mal ein vom unspezifischen Hintergrund signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal messbar ist. Er markiert zugleich den Übergang der Reaktion in die linear verlaufende exponentielle Phase, innerhalb derer die Messwerte direkt proportional zur Menge der gebildeten PCR-Produkte sind und insofern den Rückschluss auf die Menge an eingesetzter Ziel-DNA erlauben (Bangsow, Deutsch, & Engel, 2007). Die Abb. 8 zeigt den Zusammenhang.

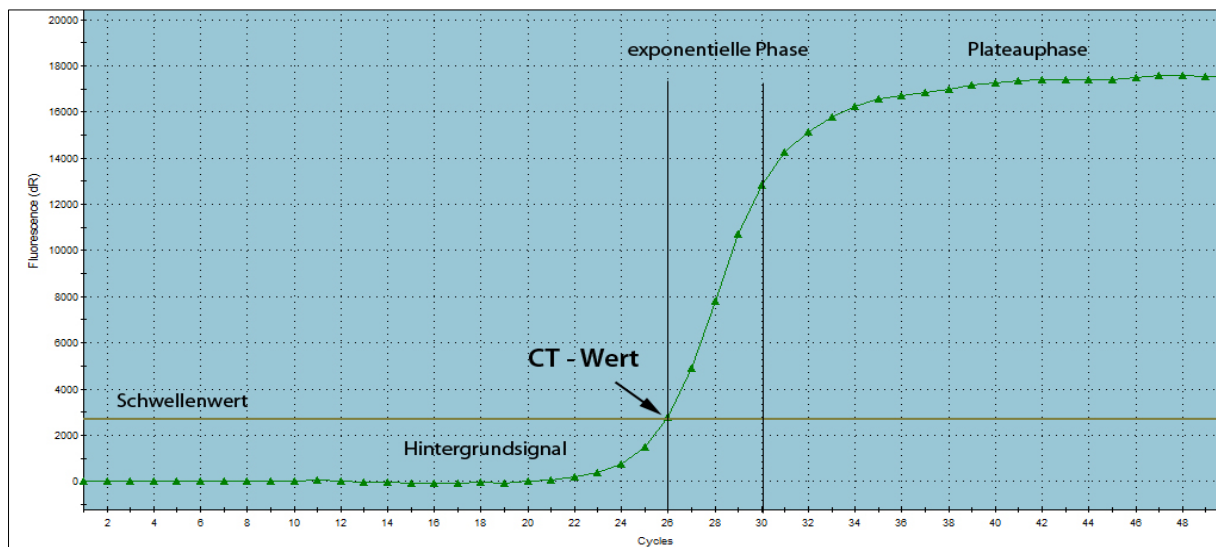


Abb. 8: RT-qPCR Amplifikationskurve (Beispielbild eines eigenen Versuches)

Die Abbildung zeigt den typischen sigmoiden Verlauf einer RT-qPCR Amplifikationskurve. Der C_T -Wert markiert den Übergang der Reaktion in die exponentielle Phase und dient zugleich als Berechnungsgrundlage zur Quantifizierung der eingesetzten Ziel-DNA.

Im Zuge dieser Arbeit wurden RT-qPCRs sowohl mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden, als auch mit Sybr Green I als Fluoreszenzmarker durchgeführt. Die sich daraus ergebenden unterschiedlichen Reaktionsansätze werden im Folgenden dargestellt.

3.4.3.2 RT-qPCR mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden

RT-qPCR Versuchsansätze mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden bieten gegenüber den konventionellen unspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen den Vorteil, dass nur die gewünschten PCR-Produkte markiert werden und keine DNA Artefakte oder Primer-Dimere die Signale verfälschen können. Die dazu bei dieser Studie in Anwendung gebrachten Taq-Man-UPL- Sonden (Roche, Mannheim, D) binden während des Primerannealings innerhalb des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Sie bestehen aus einer Sequenz von 8 Locked Nucleic Acids (LNA), chemisch modifizierten Nukleotidanaloga mit einer höheren thermodynamischen Stabilität als konventionelle DNA-Nukleotide, und besitzen an ihrem 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxyfluorescein) sowie einen Quencher an ihrem 3'-Ende. Der Quencher unterdrückt das Fluoreszenzsignal solange, bis die Taq-Polymerase im Laufe der Tochterstrangssynthese die gebundene Sonde erreicht und diese mittels ihrer 5'-3'

Exonucleaseaktivität hydrolytisch spaltet. Infolge der Trennung emittiert FAM anschließend ein detektierbares Fluoreszenzsignal mit einem Emissionsmaximum λ_{max} bei 517 nm.

Zur praktischen Durchführung wurden Mastermixe für die jeweiligen Versuchsansätze mit den in Tabelle 13 genannten Bestandteilen erstellt. Die hierbei eingesetzten Primer sind in Tabelle 14 aufgelistet und wurden individuell für die HECA-Promotorregion konzipiert und von Eurofins MWG Synthesis (Ebersberg, D) bezogen. Die Basensequenz dieser Region und die Primeransatzstellen sind im Anhang detailliert dargestellt. Zusätzlich wurde ein Mastermix mit den im Kit enthaltenen Kontrollprimer RPL30 Exon 3 angesetzt. Die zu den Primerpaaren passenden UPL-Sonden wurden mit Hilfe der Online-Anwendung Universal ProbeLibrary Assay Design Center auf der Internetseite des Herstellers (www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_030000) ermittelt und sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 13: Lightcycler Reaktionsansatz (20 µl)

Menge	Reagenz
10,4 µl	Wasser (PCR Grade)
4 µl	TaqMan-Mastermix
0,2 µl	Primer forward
0,2 µl	Primer reverse
0,2 µl	UPL-Sonde
5 µl	DNA (1:5 verdünnt)

Tabelle 14: Verwendete Primer im Rahmen von RT-qPCR Versuchen

Primer	Basensequenz
HECA 1 for	5'-CCCTAACTTCCACACCTGAGT-3'
HECA 1 rev	5'-CAGAAAAGGTGAGGGTTTGC-3'
HECA 2 for	5'-TTTGAGCTGAGACCTGAAGGA-3'
HECA 2 rev	5'-GGAAGAGCTCCCCTTGATCT-3'
HECA 3 for	5'-AGGAGGCCACCGAAGAAC-3'
HECA 3 rev	5'-CCTGCTTGACTTGCTCCAC-3'

Tabelle 15: Verwendete UPL-Sonden und zugehörige Primerpaare

UPL-Sonde	Basensequenz	Primerpaar
# 32	5'-CTGCTCCC-3'	HECA 1
# 12	5'-GGAAGGAG-3'	HECA 2
# 59	5'-TGCCACTG-3'	HECA 3, RPL30

Nach dem Transfer der Reaktionsansätze in Glaskapillaren und anschließender 1 min Zentrifugation bei 3.600 rpm (LC Carousel Centrifuge 2.0, Roche, Mannheim, D) wurden die RTq-PCR Versuche mit dem Light-Cycler qPCR-Automaten (Roche, Mannheim, D) und zugehöriger Programmsoftware Version 2.0 nach dem in Tabelle 16 dargestellten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 16: Light-Cycler Reaktionsprotokoll

Programmschritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95° C	10 min
2. Amplifikation (45 Zyklen)	Denaturierung 95° C	10 sec
	Primer-Annealing 60° C	30 sec
	Elongation 72° C	1 sec
3. Kühlung	40° C	30 sec

3.4.3.3 RT-qPCR mit Sybr Green I

Sybr Green I ist ein asymmetrischer Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff, der unspezifisch in der kleinen Furche aller doppelsträngigen DNA-Moleküle bindet. Infolge der chemischen Bindungsreaktion emittiert der Nukleinsäure-Farbstoffkomplex ein detektierbares Fluoreszenzsignal mit einem Emissionmaximum λ_{\max} bei 521 nm.

Aufgrund seiner unspezifischen Bindungseigenschaften können die Messergebnisse allerdings durch DNA Artefakte oder Primer-Dimere verfälscht werden. Um die Spezifität der Messergebnisse zu optimieren, wurde daher im Versuchsansatz eine, die Bildung von DNA-Artefakten und Primer-Dimeren minimierende, Hot-Start Polymerase benutzt. Ergänzend wurde im Anschluss an den PCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse der amplifizierten Produkte durchgeführt, um unspezifische Signale auszuschließen.

Zur praktischen Durchführung wurde zunächst eine Sybr Green I Reaktionsstammlösung mit den in Tabelle 17 genannten Bestandteilen angesetzt.

Tabelle 17: Sybr Green I Reaktionsstammlösung (1ml)

Menge	Reagenz
200 µl	10x Puffer Y
40 µl	10 mM dNTPs
720 µl	Wasser (PCR Grade)
40 µl	10x Sybr Green I

Im Anschluss wurden Mastermixe für die Reaktionsansätze mit den in Tabelle 18 genannten Bestandteilen erstellt. Die diesbezüglich verwendeten Primerpaare entsprachen denjenigen aus den RT-qPCR Versuchen mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden (siehe Tabelle 14).

Tabelle 18: Sybr Green I Reaktionsansatz je Well (20 µl)

Menge	Reagenz
6 µl	Wasser (PCR Grade)
10 µl	Sybr Green I Reaktionsstammlösung
0,5 µl	Primer forward
0,5 µl	Primer reverse
0,1 µl	Hot-Taq-Polymerase
3 µl	DNA

Nach dem Auftrag der Reaktionsansätze auf eine 96-Wellplatte (Kisker Biotech, Steinfurt, D) und anschließender 30 sec Zentrifugation bei 2.000 rpm (Multifuge 3 S-R, Heraeus, Hanau, D) wurden die RT-qPCR Versuche mit dem PCR-Automaten Mx3005 P (Stratagene, Oberhaching, D) und zugehöriger Programmsoftware MxPro Version 4.1 nach dem in Tabelle 19 dargestellten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 19: Sybr Green I Reaktionsprotokoll

Programmschritt		Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung		95° C	3 min
2. Amplifikation (50 Zyklen)	Denaturierung	95° C	10 sec
	Primer-Annealing	62° C	30 sec
	Elongation	72° C	1 min
3. Schmelzkurve	Denaturierung	95° C	1 min
	1. Teil	55° C	30 sec
	2. Teil	55° C bis 95° C	Slope 0,5°C/sec

3.4.3.4 Auswertung mittels relativer Quantifizierung

Die gemessenen C_T -Werte wurden zur Auswertung in MS Excel Mac 2011 übertragen und die PCR-Produkte anschließend anhand der $\Delta \Delta C_T$ -Methode relativ quantifiziert. Zu diesem Zweck wurden die Werte zunächst innerhalb einer jeweils durch ein Primerpaar definierten Messreihe auf die zugehörige 2% Probe normiert und nachfolgend mit dem Wert der Positivkontrolle (Histon H3) für das „Housekeeping“-Gen RPL30 verglichen. Zur Präzisierung der Ergebnisse wurde abschließend die Amplifikationseffizienz der Primer in die Berechnung miteinbezogen.

4. Ergebnisse

Die Abschnitte 4.1 und 4.2 der hier aufgeführten Ergebnisse sind als Vorversuche der eigentlichen Hauptversuchsreihe in Abschnitt 4.3 zu sehen. Sie werden dennoch dargestellt, da diese nach Meinung des Autors einen sinnvollen Beitrag zur Gesamtinterpretation der Untersuchungsreihe liefern.

4.1 Genexpressionsnachweis auf Transskriptionsebene

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollte zunächst, basierend auf dem in Punkt 3.2.1 erläuterten Versuchsprinzip, qualitativ nachgewiesen werden, dass die zur Signalweiterleitung benötigten Mediatoren des Wnt-Signalwegs bzw. der Transskriptionsfaktor SLUG in beiden Zelllinien exprimiert werden. Die Analyse der Genexpression erfolgte hierbei mittels konventioneller PCR und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung (vgl. 3.2.4).

4.1.1 Ergebnisse der PCI 13-Zelllinie

Um die erhobenen Daten zu verifizieren, wurden die Experimente mit drei separaten PCI 13-Zelllinien durchgeführt. Die Gelbilder wiesen insgesamt für alle untersuchten mRNA's deutliche Signale vor, wobei die Banden für TCF3 und TCF4, ebenso wie SLUG und β -Catenin, eine jeweils vergleichbare Ausprägung hatten. Abb. 9 zeigt ein exemplarisches Gelbild.

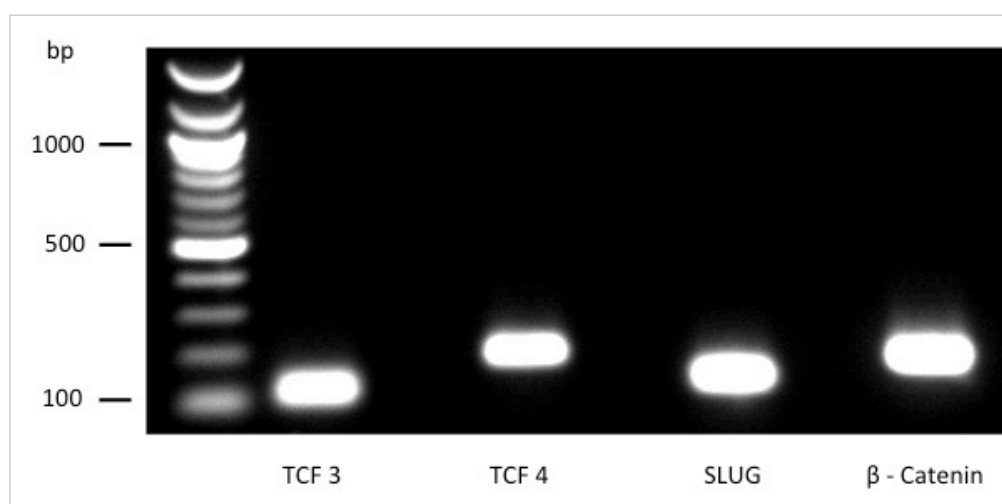


Abb. 9: gelelektrophoretische Auftrennung der PCI 13-cDNA-PCR-Produkte

Dargestellt ist ein Gelbild nach Amplifikation von PCI 13-cDNA mit spezifischen Primern (vgl. **Tabelle 5**) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung. Zur Identifizierung der einzelnen Banden wurde ein 100bp Marker mit auf das Gel aufgetragen (links im Bild). Je Primerpaar wurde eine separate No-Template Kontrollprobe in den PCR-Lauf mit einbezogen und ebenfalls mit auf das Gel aufgetragen, um unspezifische Signale

auszuschließen. Von links nach rechts angeordnet, sind die Banden der jeweiligen spezifischen PCR-Produkte zu sehen. Das Gelbild zeigt für alle untersuchten Faktoren eine deutliche Bande und liefert insofern den qualitativen Nachweis für ihre Expression auf Transskriptionsebene. In Bezug auf ihre Ausdehnung und Intensität zeigen jeweils TCF3 und TCF4, sowie SLUG und β -Catenin untereinander vergleichbare Banden.

4.1.2 Ergebnisse der HOK-Zelllinie

Die in Analogie zu PCI 13 durchgeführten Genexpressionsanalysen bei HOK-Zellen zeigten Unterschiede zwischen beiden Zelllinien auf. Um die Daten als richtig nachzuweisen erfolgten die Untersuchungen an drei separaten HOK-Zellkulturen. Während die Banden von SLUG und β -Catenin bei der gelelektrophoretischen Auftrennung in Relation zu den PCI 13 Versuchen eine nahezu kongruente Ausdehnung und Intensität zeigten, fielen die Signale für TCF3 und TCF4 vergleichsweise schwächer aus. Abb. 10 zeigt ein exemplarisches Gelbild.

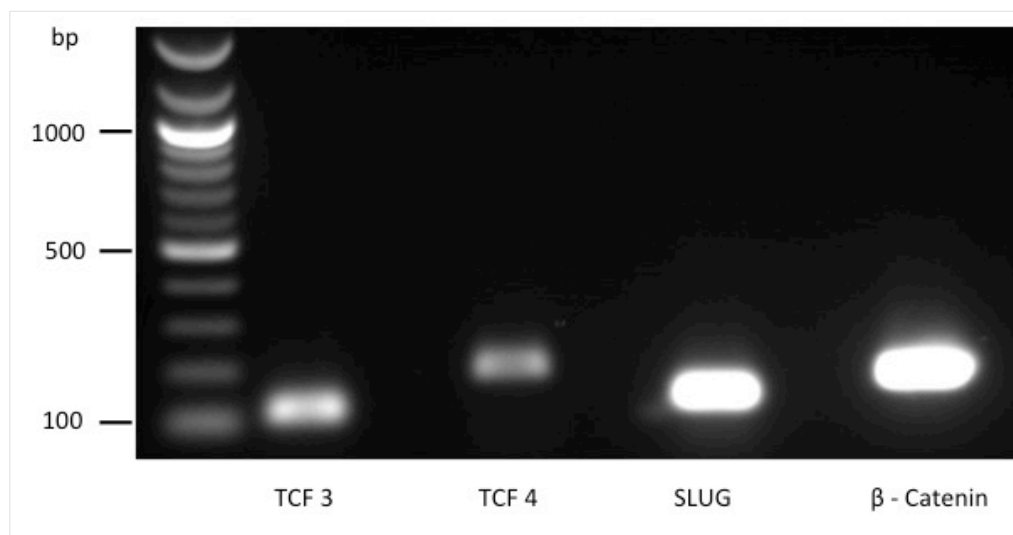


Abb. 10: gelelektrophoretische Auftrennung der HOK-cDNA-PCR-Produkte

Analoges Versuchs- und Darstellungsprinzip wie in **Abb. 9**. Während SLUG und β -Catenin ähnlich starke Signale zeigen, sind demgegenüber die Banden von TCF3 und TCF4 schwächer ausgeprägt. Auffällig ist, dass anders als bei den PCI 13-Zellen, die Signale von TCF3 und TCF4 im Vergleich untereinander in ihrer Ausprägung differenzieren, d.h. die TCF3-Bande deutlicher hervortritt als die TCF4-Bande.

4.2 Immunoblot-Analyse

Die mRNA-Expressionsanalysen ließen erkennen, dass bei einem Vergleich der beiden Zelllinien Diskrepanzen hinsichtlich der Signalausprägung von TCF3 und TCF4 bestehen, während die Banden von SLUG und β -Catenin eine nahezu kongruente Ausdehnung und Intensität zeigen. In der Folge wurde, basierend auf dem in Punkt 3.3.1 erläuterten Versuchsprinzip, anhand von Immunoblot-Analysen exemplarisch jeweils eine Kultur PCI13-bzw. HOK-Zellen im Hinblick darauf untersucht, ob sich diese Beobachtungen gleichermaßen auf Protein-Ebene bestätigen lassen. Zur Präzisierung der Analysen wurden die Signale der Immunoblots anschließend densitometrisch erfasst und relativ quantifiziert (vgl. 3.3.5). Da sich die folgenden Ausführungen auf einen exemplarischen Versuch beziehen erfolgte dagegen keine statistische Auswertung.

4.2.1 Ergebnisse der PCI 13 Zelllinie

Die Immunoblot-Analyse der PCI 13 Zelllinie lieferte mehrere Gesichtspunkte. Zum einen zeigte sich eine signifikante Signaldiskrepanz zwischen TCF3 und TCF4, d.h. während nur wenig TCF3-Proteine detektiert wurden, fielen die Signale für TCF4 weit deutlicher aus. Zum anderen stellte sich für SLUG nicht nur die erwartete 30kDa-Bande deutlich dar, sondern darüberhinaus wurden auch Signale im Bereich von 37kDa und 90kDa sichtbar. Für β -Catenin zeigte sich die erwartete 92kDa-Bande. Abb. 11 zeigt die Westernblot-Filme der Analyse.

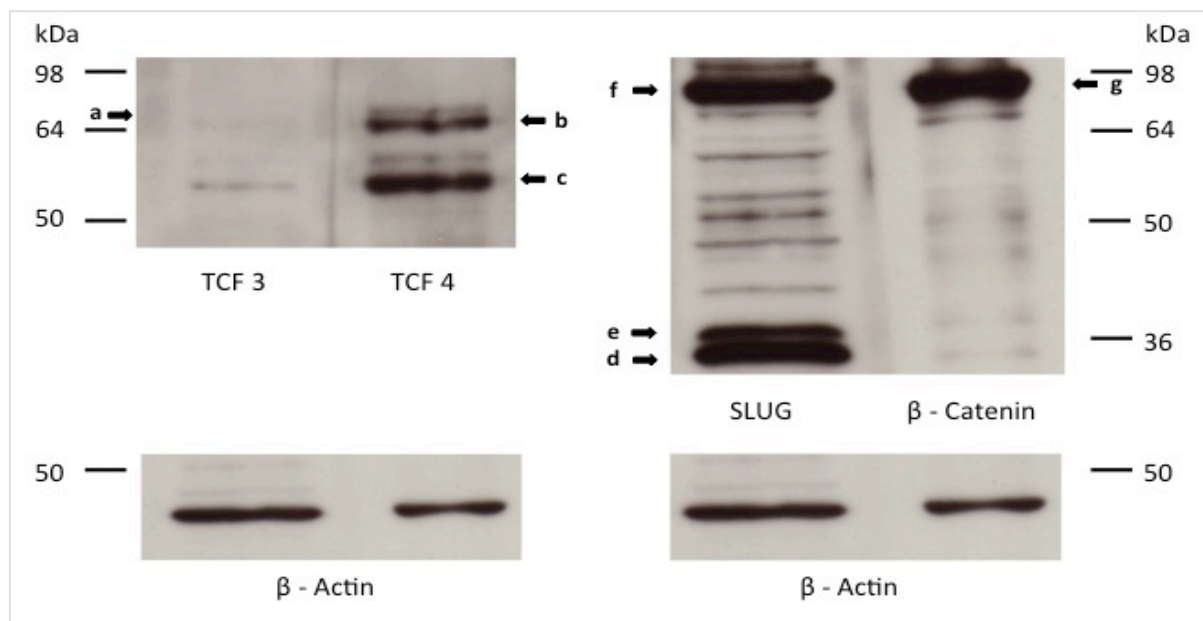


Abb. 11: Immunoblot-Analyse der PCI 13 Zelllinie

Dargestellt sind die Spuren der jeweilig untersuchten Proteine nach deren Detektion mit spezifischen Antikörpern (vgl. **Tabelle 10**). Um die Vergleichbarkeit sowohl der einzelnen Faktoren untereinander als auch zwischen

den beiden Zelllinien zu gewährleisten, wurden einheitlich je Spur 30 µg Protein eingesetzt. Die linke Bildhälfte zeigt den Filmausschnitt mit den Banden von TCF3 bzw. TCF4 und darunter die jeweils zugehörige β -Actin Referenzbande. In der Literatur wird für TCF3 eine Isoform mit einem Molekulargewicht von 78kDa angegeben, für TCF4 dagegen zwei Varianten mit je 79kDa bzw. 58kDa. Während im Rahmen des Experiments beide TCF4 Proteinvarianten (b,c) deutlich nachgewiesen werden, ist die bei 78kDa erwartete TCF3 Bande (a) nur schwach ausgeprägt und augenscheinlich kaum von unspezifischen Hintergrundsignalen zu unterscheiden. Die rechte Bildhälfte zeigt den Filmausschnitt mit den Banden von SLUG und β -Catenin sowie darunterliegend die jeweils zugehörige β -Actin Referenzbande. Für SLUG lieferte der Versuch nicht nur eine den Angaben der Literatur entsprechende Bande bei 30kDa (d), sondern darüber hinaus ebenso deutliche Signale bei 37kDa (e) und 90kDa (f). In der Spur von β -Catenin ist die literaturgemäß erwartete Bande bei 92kDa (g) deutlich sichtbar.

Um die Ergebnisse der sich anschließenden densitometrischen Auswertung zwischen den beiden Zelllinien vergleichen zu können, lag der Fokus bei der relativen Quantifizierung auf den Signalen, die entsprechend der Literatur erwartet worden waren, d.h. insbesondere für SLUG konzentriert sich die Auswertung auf die 30kDa Bande. Insgesamt fiel auf, dass vor allen Dingen die relative Proteinkonzentration von TCF3 unerwartet niedrig war. Diagramm 1 zeigt die Ergebnisse.

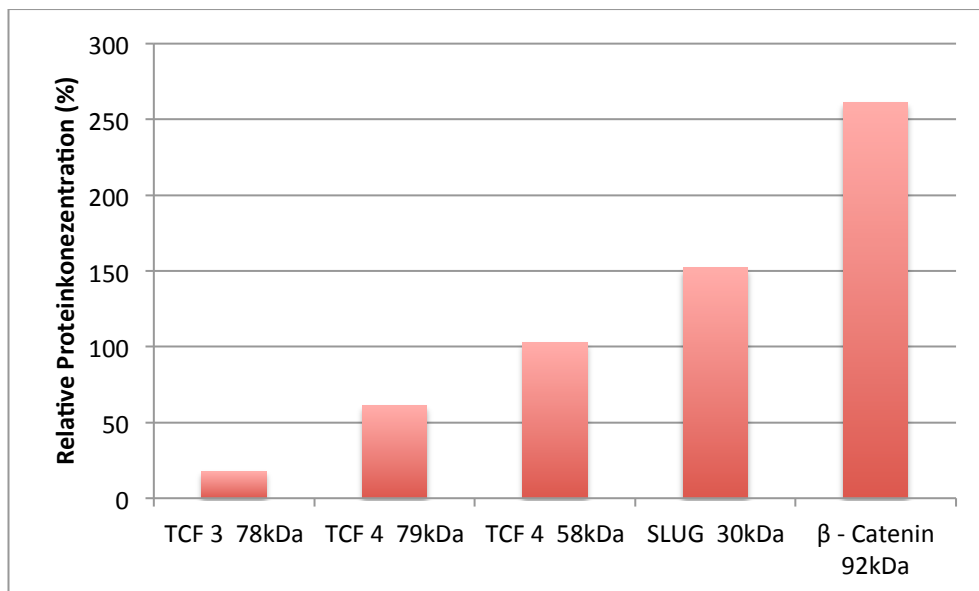


Diagramm 1: Densitometrische Analyse des PCI 13 Immunoblots

Dargestellt ist die relative Proteinkonzentration der untersuchten Faktoren im Verhältnis zum β -Actin Referenzsignal. Auffällig ist die Signaldiskrepanz zwischen TCF3 und TCF4. Während auf mRNA-Ebene die Expression von TCF3 und TCF4 bei PCI 13 Zellen noch nahezu auf dem gleichen Niveau zu liegen scheint (vgl. **Abb. 9**), zeichnet sich auf Proteinebene ein davon abweichendes Bild ab. Die relative Proteinkonzentration von TCF3 liegt bei 17,8% (78kDa) und ist damit deutlich unterhalb des Niveaus der beiden TCF4 Isoformen mit 60,9%

(79kDa) bzw. 102,9% (58kDa) angesiedelt. Die relativen Konzentrationen von SLUG mit 152 % (30kDa), sowie von β -Catenin mit 261,4% (92kDa) liegen im Gegensatz dazu im literaturgemäß erwarteten Bereich.

4.2.2 Ergebnisse der HOK-Zelllinie

Die Immunoblot-Analyse der HOK-Zelllinie wies im Vergleich zur PCI 13-Zelllinie einige Unterschiede auf. Einerseits ließ sich im Bereich der Wnt-Faktoren ein vergleichsweise deutlicheres TCF3 Signal beobachten, wohingegen die beiden Banden von TCF4 in Relation zu PCI 13 abgeschwächt erschienen. Andererseits offenbarte die Untersuchung bei SLUG neben der 30kDa und den beiden, bereits bei PCI 13 beobachteten, 37kDa und 90kDa Banden, weitere markante Signale im Bereich von 45kDa und 50kDa. In der Spur von β -Catenin zeigte sich wiederum die erwartete 92kDa-Bande. Abb. 12 zeigt die Westernblot-Filme der Analyse.

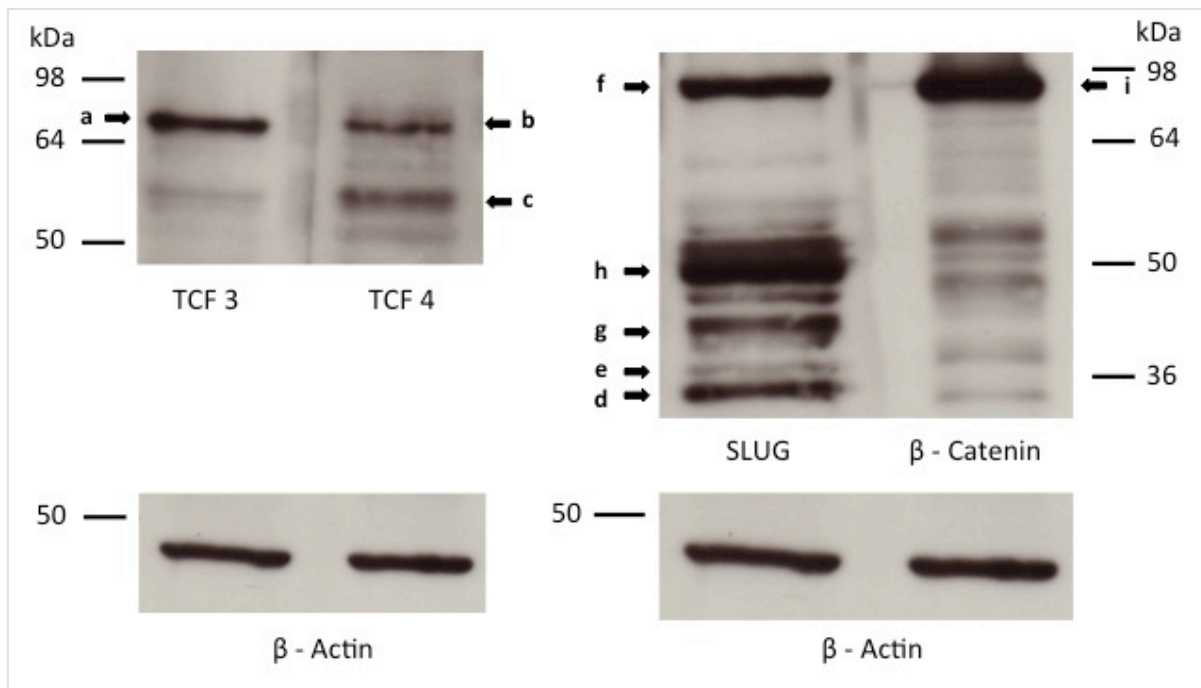


Abb. 12: Immunoblot-Analyse der HOK-Zelllinie

Analoges Versuchs- und Darstellungsprinzip wie in **Abb. 11**. Im Vergleich zu PCI 13 lassen sich mehrere Unterschiede beobachten. Während sich für das 78kDa-Protein TCF3 (a) ein wesentlich deutlicheres Signal (vgl. **Abb. 11** (a)) zeigt, erscheinen sowohl die 79kDa-Bande (b) als auch die 58kDa-Bande (c) von TCF4 vergleichsweise schwächer als bei PCI 13 (vgl. **Abb. 11** (b,c)). Darüber hinaus zeigen sich in der SLUG-Spur neben der 30kDa-Bande (d) und den beiden, ebenfalls bei PCI 13 beobachteten, Banden bei 37kDa (e) und 90kDa (f), weitere Signale im Bereich von 45kDa (g) bzw. 50kDa (h). Auffällig in dieser Beziehung ist, dass augenscheinlich das 50kDa Signal am stärksten ausgeprägt ist, wohingegen die Signale der bereits aus dem PCI 13 Versuch bekannten Banden vergleichsweise schwächer erscheinen. Demgegenüber lassen sich für das β -Catenin-Signal bei 92kDa (i) keine wesentliche Unterschiede zu PCI 13 feststellen.

Die densitometrische Auswertung des Immunoblots ließ erkennen, dass bei HOK, anders als bei PCI 13, die relativen quantitativen Verhältnisse von TCF3 und TCF4 gemessen an der mRNA-Expressionanalyse (vgl. Abb. 10) konstant bleiben. Diagramm 2 zeigt die Ergebnisse der Auswertung.

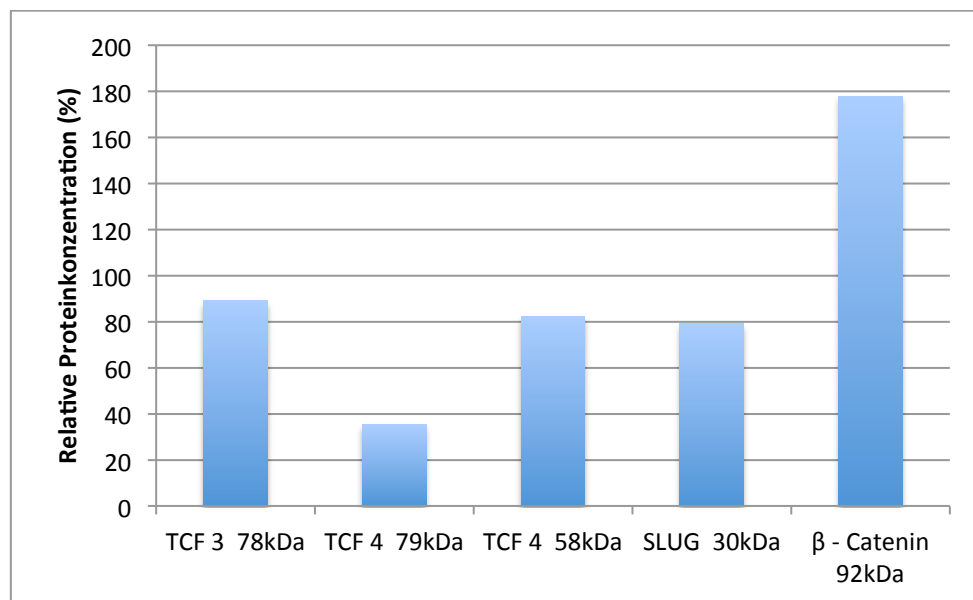


Diagramm 2: Densitometrische Auswertung des HOK-Immunoblots

Analoges Darstellungsprinzip wie in **Diagramm 1**. Im Gegensatz zu PCI 13 entsprechen bei den HOK die relativen quantitativen Verhältnisse innerhalb der Wnt-Faktoren im Wesentlichen den auf Basis des mRNA-Expressionsmodells erwarteten Relationen, d.h. die TCF3 (78kDa)-Konzentration liegt mit 89% höher als die der beiden TCF4-Isoformen mit 35,2% (79kDa) bzw. 82,3% (58kDa) (vgl. **Abb. 10**). Dagegen liegt der SLUG-Wert (30kDa) mit 79,2% unterhalb der Wnt-Faktoren. Mit einer relativen Konzentration von 177,83% liefert auf der anderen Seite β-Catenin (92kDa) den insgesamt höchsten Wert der Untersuchungsreihe.

4.2.3 Zusammenfassender Vergleich zwischen PCI 13 und HOK

Insgesamt betrachtet, zeigten sich bei einem Vergleich der beiden Zelllinien im Hinblick auf die relative Proteinkonzentration der untersuchten Faktoren signifikante Unterschiede. Diagramm 3 fasst die Ergebnisse der Immunoblot-Analysen zusammen und stellt diese Unterschiede heraus.

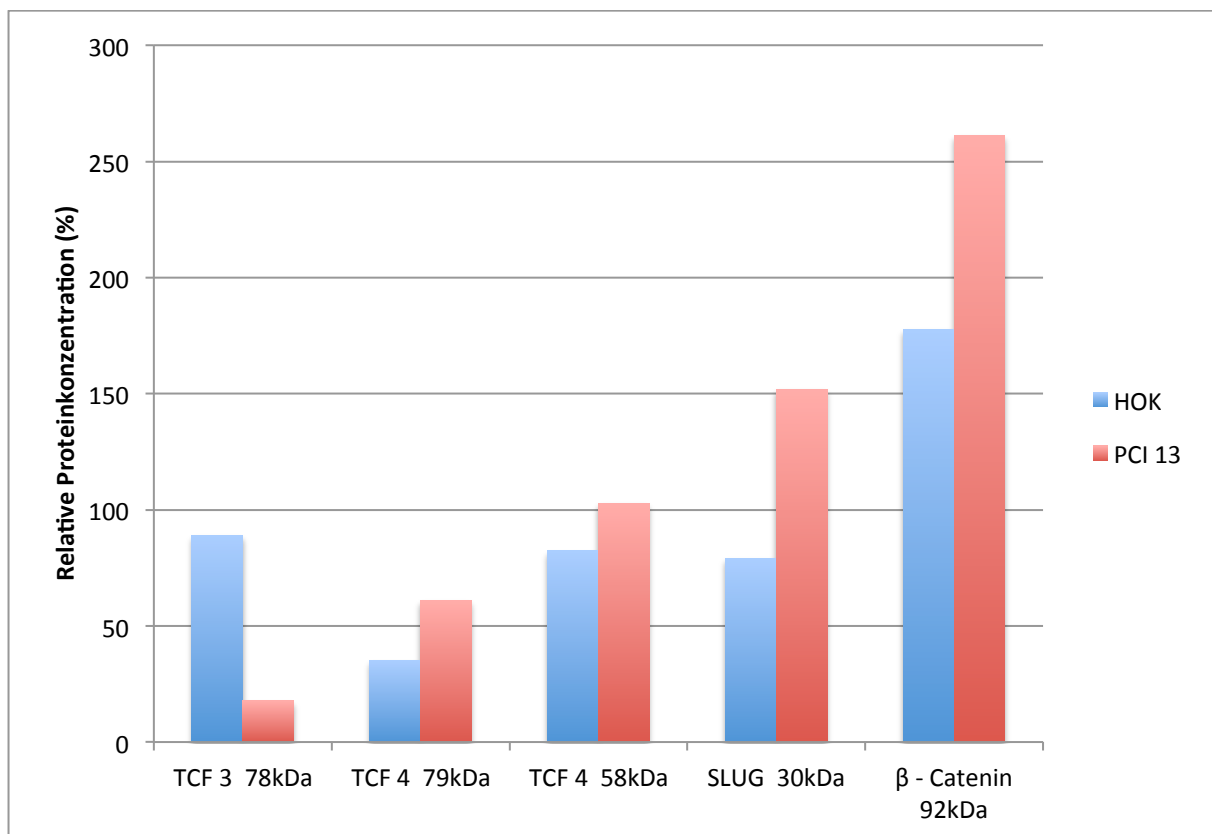


Diagramm 3: Vergleichende Proteinkonzentrationsanalyse zwischen PCI 13 und HOK

Zusammenfassende Darstellung aus **Diagramm 1** und **Diagramm 2**. Während bei HOK Wnt-Faktor TCF3 eine relativ höhere Konzentration als die beiden TCF4 Isoformen aufweist, drehen sich diese Verhältnisse bei PCI 13 um. Im direkten Vergleich der einzelnen Faktoren zeigt sich, dass die HOK-Zellen einerseits über eine höhere TCF3 Konzentration verfügen als PCI 13, andererseits ihr TCF4-Niveau für beide Varianten aber vergleichsweise niedriger liegt. Sowohl für die 30kDa-Bande von SLUG, als auch für β-Catenin hat PCI 13 den höheren Wert.

4.3 Untersuchung der Faktorbindung in der HECA-Promotorregion

Die Chip-Assays im dritten Abschnitt dieser Arbeit wurden zunächst mit dem Ziel durchgeführt, die Bindung der Wnt-Faktoren bzw. SLUG am HECA-Promotor, basierend auf dem in Punkt 3.4.1 dargestellten Versuchsprinzip, grundsätzlich nachzuweisen. Als Untersuchungsmaterial dienten dabei anfänglich unbehandelte PCI 13-Zellen. Im weiteren Verlauf wurden dann separate PCI 13-Kulturen mit dem Wnt-Antagonisten FH535 bzw. mit dem Wnt-Agonisten BIO inkubiert und in analoger Weise analysiert, um zu überprüfen, ob sich dadurch ein modulierender Effekt in Bezug auf die Bindung der Faktoren an die HECA-Promotorregion einstellt. Abschließend wurden die Experimente mit unbehandelten HOK-Zellen wiederholt, um die Ergebnisse aus den PCI 13 Versuchen mit gesundem Kontrollgewebe vergleichen zu können. Dargestellt sind im Folgenden jeweils die besten Ergebnisse einer Versuchsreihe. Auf Grund des Versuchsdesigns wurde dagegen auf eine statistische Auswertung verzichtet, da diese keine sinnvollen Ergebnisse liefern würde. Vielmehr lag das Hauptaugenmerk auf den reproduzierbaren tendenziellen Signalunterschieden innerhalb einer Versuchsreihe. Teile der hier präsentierten Daten wurden von Dowejko et al. übernommen und publiziert (Dowejko, et al., 2012).

4.3.1 Ergebnisse mit unbehandelten PCI 13-Zellen

4.3.1.1 RT-qPCR mit UPL-Sonden

Da die Aufgabenstellung anfänglich ein schwaches Signal erwarten ließ, wurden zunächst RT-qPCRs mit spezifischen UPL-Sonden entsprechend der in Punkt 3.4.3.2 dargestellten Methode durchgeführt, wobei der Fokus zunächst auf den Wnt-Faktoren TCF3 und TCF4 lag. Zur Verifikation der Daten wurden die Versuche mit Probenmaterial aus drei separaten PCI 13-Kulturen insgesamt fünfmal wiederholt. Zur Auswertung wurden die gemessenen Signale gemäß der in Punkt 3.4.3.4 dargestellten Methode relativ quantifiziert und anschließend als Säulendiagramm dargestellt. Die Analysen belegen die Bindung beider Faktoren in der HECA-Promotorregion, wobei TCF4 im Vergleich zu TCF 3 ein stärkeres Signal zeigte. In Diagramm 4 ist das Experiment mit den deutlichsten Signalen dargestellt.

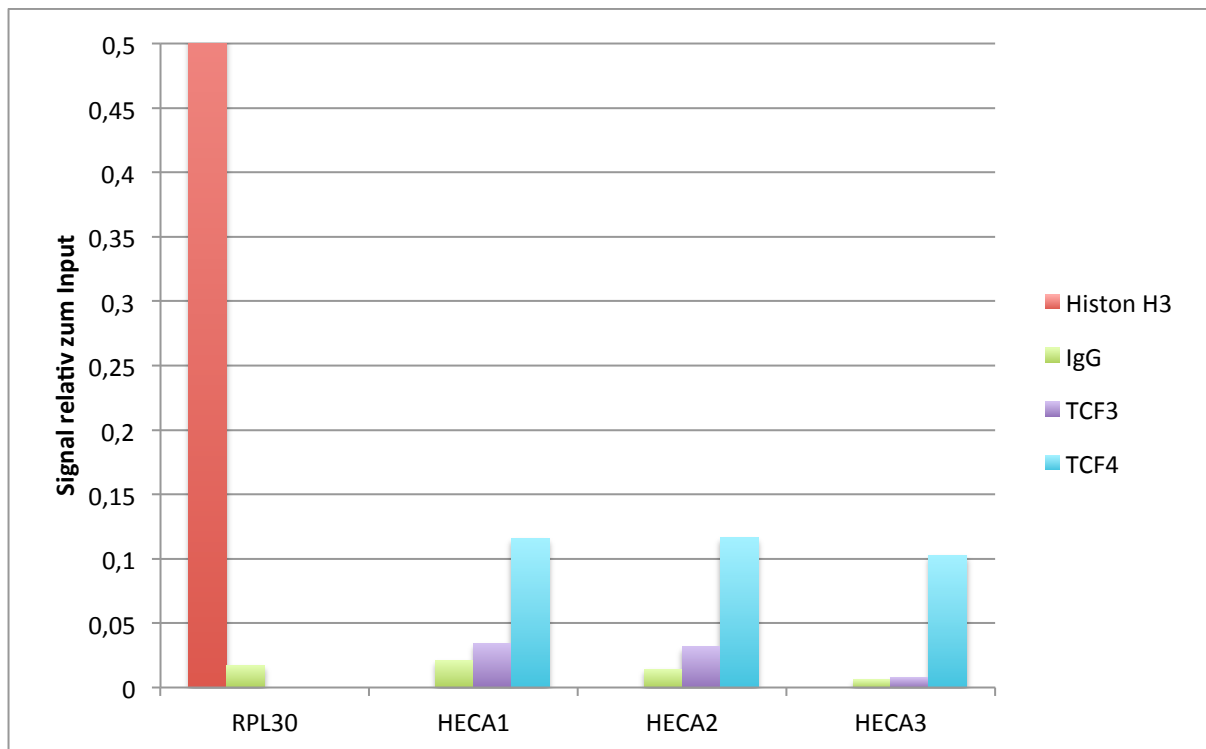


Diagramm 4: Analyse eines Chip-Assays unbehandelter PCI 13-Zellen anhand RT-qPCR mit UPL-Sonden

Dargestellt sind die relativen Signale der einzelnen Proben nach deren Amplifikation mit den HECA-Primern 1 -3 (vgl. **Tabelle 14**), sowie das Kontroll- bzw. Referenzsignal der Histon H3-Probe nach Amplifikation mit RPL30-Primern. Die HECA-Primer wurden spezifisch für die Promotorregion des HECA-Gens konstruiert. Die jeweiligen Annealing-Stellen sind im Anhang dargestellt. Kontaminationen der jeweiligen Mastermixe wurden durch Mitführen einer No-Template-Kontrollprobe für jeden Primer ausgeschlossen. Zusätzlich wurden für jedes Primerpaar anhand der IgG-Negativkontrollprobe (grün) unspezifische Hintergrundsignale detektiert, um die Spezifität der Signale zu erhöhen. Die Hochwertachse beschreibt das relative Signal der einzelnen Proben im Vergleich zur Histon H3-Positivkontrollprobe (rot), wobei der Übersicht halber eine Skalierung von maximal 0,5 gewählt wurde. Auf der Rechtswertachse sind, geordnet nach Primerpaaren, in unterschiedlichen Farben die jeweiligen Proben aufgetragen. Für alle drei HECA-Primer zeigt sich ein einheitliches Bild. Sowohl TCF3 (violett), als auch TCF4 (blau) heben sich vom IgG-Hintergrundsignal (grün) ab, wobei die Differenz zwischen TCF3 und IgG schwächer ausgeprägt ist, als zwischen TCF4 und IgG. Im Vergleich untereinander zeigt TCF4 das stärkere Signal.

4.3.1.2 RT-qPCR mit Sybr Green

Anknüpfend an die oben beschriebenen Experimente wurde der Versuchsaufbau im weiteren Verlauf einerseits um den Faktor SLUG erweitert und andererseits die RT-qPCR-Methode aus Kostengründen auf Sybr Green als Fluoreszenzmarker umgestellt, d.h. alle weiteren RT-qPCR Experimente wurden entsprechend der in Punkt 3.4.3.3 dargestellten Methode durchgeführt. Zur Verifikation der Daten wurden die Versuche mit Probenmaterial aus drei separaten PCI 13-Kulturen insgesamt siebenmal wiederholt. Auswertung und Analyse erfolgten analog zu den RT-qPCR-Experimenten mit UPL-Sonden. Die Daten bestätigen zum einen die Ergebnisse aus diesen Versuchen und belegen zum anderen, dass auch SLUG in der HECA-Promotorregion bindet. Diagramm 5 zeigt exemplarisch den RT-qPCR-Lauf mit den deutlichsten Signalen.

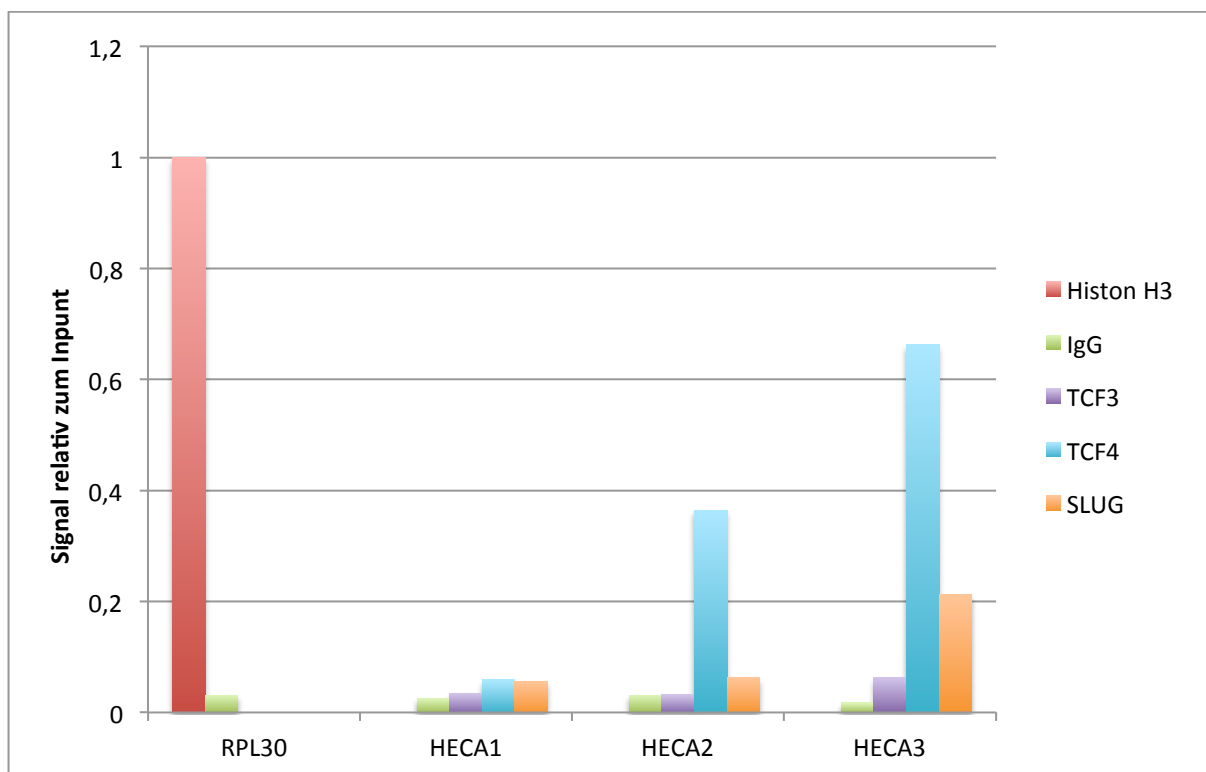


Diagramm 5: Analyse eines Chip-Assays unbehandelter PCI 13-Zellen anhand RT-qPCR mit Sybr Green

Analoges Auswertungs- und Darstellungsprinzip wie in **Diagramm 4**, erweitert um den Transkriptionsfaktor SLUG (orange). Bei allen drei HECA-Primerpaaren bestätigen sich im Hinblick auf die Bindung von TCF3 und TCF4 an den HECA-Promotor tendenziell die Ergebnisse aus den RT-qPCR Versuchen mit UPL-Sonden. Beide Faktoren heben sich auch hier vom IgG-Hintergrundsignal ab, wobei TCF4 wiederum das deutlich stärkere Signal zeigt. Genauso zeigen die SLUG-Proben bei allen drei HECA-Primerpaaren im Vergleich zum unspezifischen IgG-Signal höhere Werte. Bezogen auf TCF3 und TCF4 stellt sich ein uneinheitliches Bild dar. Während die SLUG-Werte innerhalb der Primervergleichsgruppe höher als die TCF3-Daten liegen, sind diese zugleich niedriger als die entsprechenden TCF4-Signale.

4.3.2 Ergebnisse nach Inkubation mit dem Wnt-Agonisten BIO

Für weiterführende Untersuchungen wurden zwei PCI 13-Kulturreihen mit dem Wnt-Agonisten BIO entsprechend der in Punkt 3.1.2 dargestellten Methode vorbehandelt und im Anschluss analog zu den unbehandelten Zellreihen untersucht. Zur Verifikation der Daten wurden die RT-qPCR-Läufe insgesamt sechsmal wiederholt. Die Daten bestätigen teilweise die Ergebnisse aus den vorangegangenen Experimenten, wobei die absolute Signalstärke der TCF4 und SLUG-Versuchsreihe im Vergleich zu den analogen Werten der unbehandelten PCI 13-Zellen tendenziell erhöht erschienen. In Diagramm 6 ist exemplarisch der Versuchslauf mit den stärksten Signalwerten dargestellt.

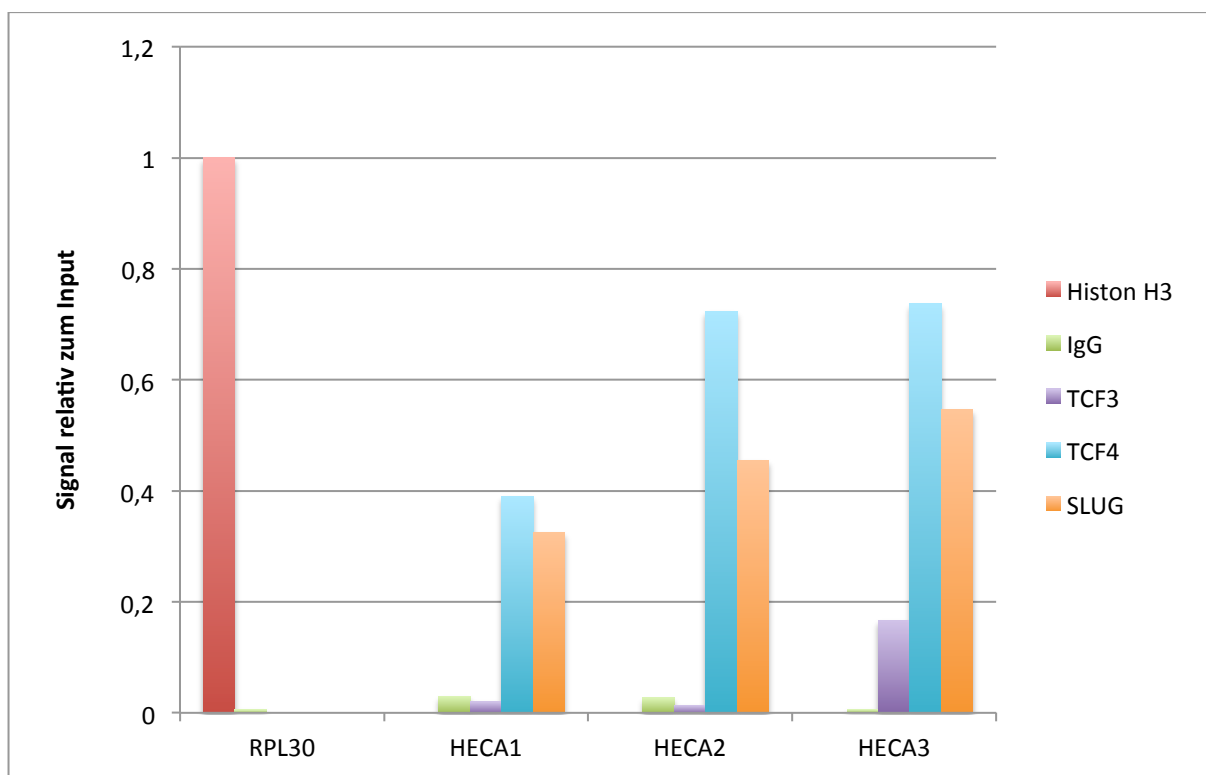


Diagramm 6: RT-qPCR-Analyse eines Chip-Assays mit BIO vorbehandelter PCI 13-Zellen

Analoges Auswertungs- und Darstellungsprinzip wie in **Diagramm 5**. Während sich beim HECA 3-Primerpaar die Daten aus den vorangegangenen Experimenten bestätigen, weichen die Werte bei HECA 1 und HECA 2 für TCF3 im Vergleich dazu ab und liegen unterhalb des unspezifischen IgG-Signals. Betrachtet man davon unabhängig die Signalverhältnisse der einzelnen Proben untereinander, bleibt die Grundtendenz jedoch unverändert, d.h. TCF4 zeigt gefolgt von SLUG die höchsten Signale, das TCF3-Signal hingegen ist am schwächsten ausgeprägt. Insgesamt betrachtet, scheint im Vergleich zu unbehandelten PCI 13-Zellen die absolute Signalstärke der TCF4 und der SLUG-Versuchsreihe tendenziell erhöht zu sein.

4.3.3 Ergebnisse nach Inkubation mit dem Wnt-Antagonisten FH535

Zum Vergleich mit den Ergebnissen aus Punkt wurde eine weitere PCI 13 Kultur mit dem Wnt-Antagonisten FH535 entsprechend dem in Punkt 3.1.2 geschilderten Procedere inkubiert und analog analysiert. Die Experimente wurden insgesamt dreimal wiederholt. Wie in den BIO-Versuchen bestätigen sich ebenso in dieser Versuchsreihe größtenteils die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche, wobei die absolute Signalstärke in Relation dazu erniedrigt erschien. Diagramm 7 zeigt das Experiment mit den deutlichsten Signalen.

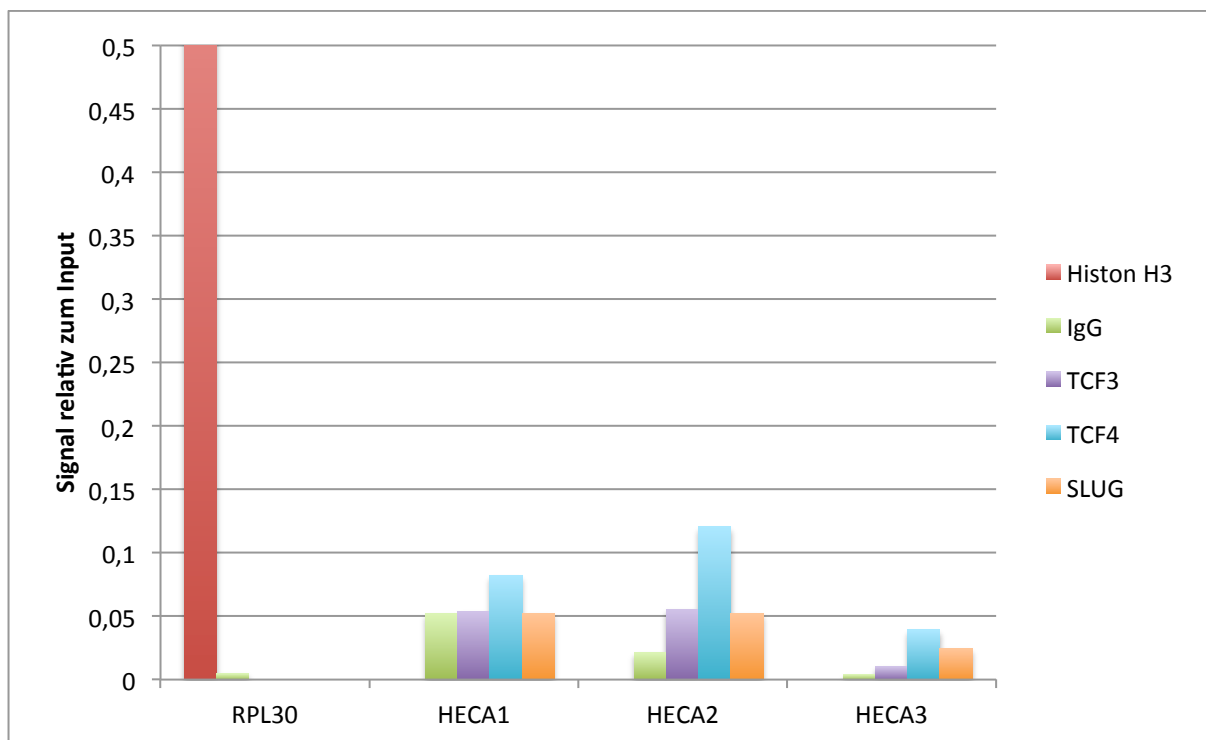


Diagramm 7: RT-qPCR-Analyse eines Chip-Assays mit FH535 vorbehandelter PCI 13-Zellen

Analoges Auswertungs- und Darstellungsprinzip wie in **Diagramm 5**. Die HECA 2- und HECA 3-Daten bestätigen im Wesentlichen wiederholt die Ergebnisse aus den vorangegangenen Versuchen. Bei HECA 1 hingegen hebt sich nur das Signal für TCF4 schwach vom Hintergrund ab. Während sich die Grundtendenz der Signalverhältnisse untereinander im Bezug auf TCF3 und TCF4 auch hier unverändert zeigt, wird das SLUG-Signal dem nur bei HECA 3 gerecht, d.h. für die anderen beiden Primer ist es hier im Unterschied zu den vorangegangenen Versuchen niedriger als TCF3. Vergleicht man insgesamt die Signalstärke mit den vorangegangenen Sybr-Green RT-qPCR-Läufen bei PCI 13-Zellen fällt im Vergleich dazu die allgemein niedrige Signalstärke auf.

4.3.4 Ergebnisse mit HOK-Zellen

Um die Ergebnisse aus den PCI 13 Studien mit gesundem Kontrollgewebe vergleichen zu können wurden drei HOK-Zellkulturreihen analog analysiert. Zur Verifikation der Daten wurden insgesamt sechs RT-qPCR-Läufe durchgeführt. Die Experimente bestätigten zum wiederholten Mal, dass sowohl die Wnt-Faktoren TCF3 und TCF4 als auch SLUG an der HECA-Promotorregion binden. Im Unterschied zu PCI 13 zeigten die HOK-Zellen jedoch stärkere TCF3-Signale, die teilweise die gemessenen TCF4-Werte übertrafen. In Diagramm 8 ist exemplarisch das Experiment mit den höchsten Signalen dargestellt.

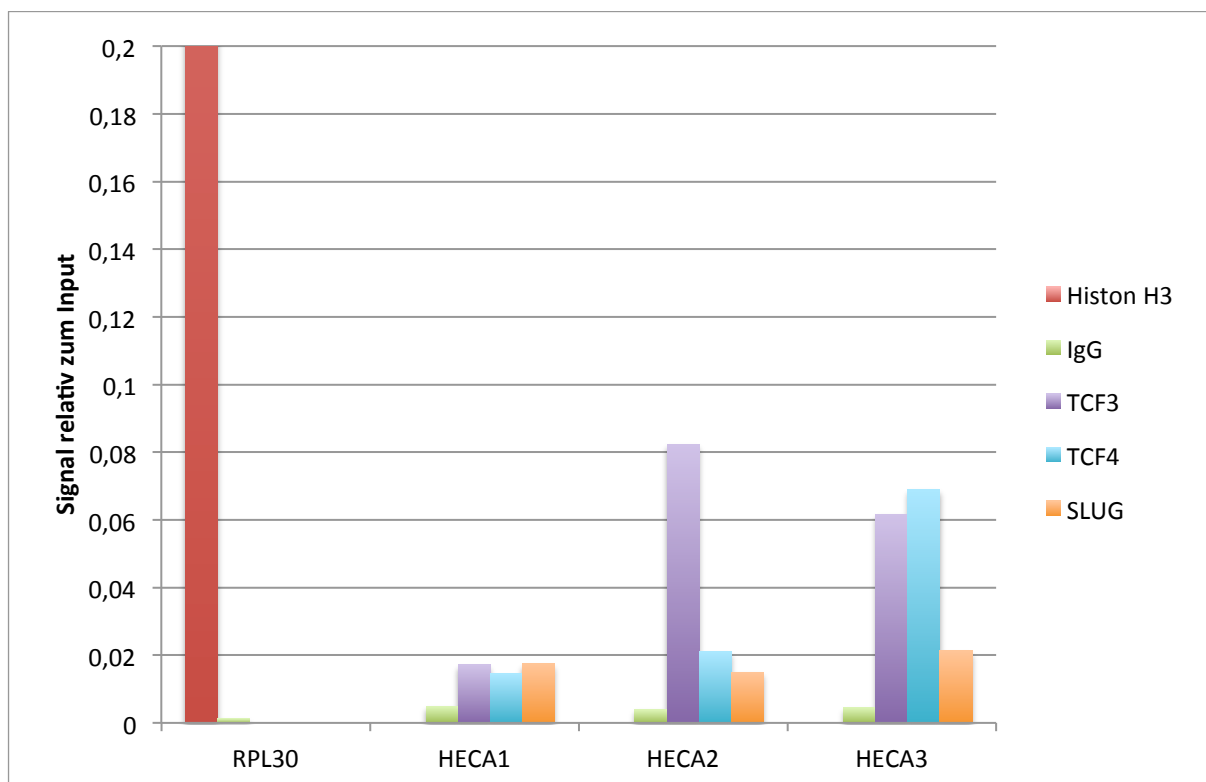


Diagramm 8: RT-qPCR-Analyse eines Chip-Assays mit unbehandelten HOK-Zellen

Analoges Auswertungs- und Darstellungsprinzip wie in **Diagramm 5**. Bei allen drei HECA-Primerpaaren heben sich TCF3, TCF4 und SLUG signifikant vom unspezifischen IgG-Hintergrundsignal ab. Im Vergleich der einzelnen Proben untereinander zeichnet sich ein uneinheitliches Bild. Bei HECA 1 zeigt TCF3 das höchste Signal, gefolgt von SLUG und schließlich von TCF4. Gleichermaßen erreicht TCF3 im Bereich von HECA 2 die höchsten Werte und überragt sowohl TCF4 als auch SLUG. Bei HECA 3 hingegen zeigt TCF4 das deutlichste Signal, gefolgt von TCF3 und SLUG. Vergleicht man die HOK-Experimente mit den PCI 13 Versuchsreihen, fallen vor allem die verhältnismäßig höheren TCF3-Werte auf, die teilweise ebenfalls TCF4 überragen. Bei den SLUG-Werten hingegen lassen sich in Relation dazu keine signifikanten Unterschiede feststellen.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab, die Regulation der Genexpression des HECA-Proteins durch den Wnt-Signalweg bzw. den Transkriptionsfaktor SLUG nachzuweisen. Dadurch soll ein Beitrag zur weiteren Aufklärung der molekularen Pathogenese von OSCC geleistet und im Sinne einer Pilotstudie die Voraussetzung für tiefergehende funktionelle Analysen geschaffen werden. HECA zählt zu einer neuen Klasse von Zellzyklusregulatoren und wird im Kontext von OSCC als neuer putativer Tumorsuppressor gehandelt (Dowejko, et al., 2009).

Zur Durchführung dieser Studie wurden die Zelllinie PCI 13, repräsentativ für OSCC-Zellen, und die primäre (Stamm-) Zelllinie HOK als gesundes Kontrollgewebe verwendet. Beide Zelllinien wurden forschungstechnisch etabliert und präzise charakterisiert. Aufgrund der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse eignen sich Zellkulturreihen dieser Art in besonderem Maße zum Studium grundlegender molekularer Vorgänge innerhalb von Zellen und gelten daher gemeinhin als valides Modell der präklinischen Grundlagenforschung (Lin, et al., 2007).

Moderne molekularbiologische Untersuchungsmethoden wie die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Chromatin-Immunpräzipitation erlauben die Untersuchung von Protein-DNA Interaktionen im Kontext lebender Zellen (Orlando, 2000). Der Nachweis einzelner Interaktionen ist dabei nicht isoliert zu betrachten, sondern muss stets vor dem Hintergrund des zugrundeliegenden molekularen Regelnetzwerks gesehen werden. Insofern gilt es, die im Zuge dieser Studie gewonnen Erkenntnisse in den zellulären Gesamtkontext einzuordnen, um daraus mögliche Schlüsse über die zugrundeliegenden Regelmechanismen zu ziehen. Darauf aufbauend stellt sich die Frage, inwieweit die gewonnen Erkenntnisse einen therapeutischen Nutzen für OSCC-Patienten haben könnten.

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 RT-PCR

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob die zur Signalweiterleitung benötigten Mediatoren des Wnt-Signalwegs bzw. der Transkriptionsfaktor SLUG in beiden Zelllinien überhaupt exprimiert werden. Zur Analyse wurde die RT-PCR angewandt, weil diese Methode erlaubt selbst geringe Mengen an RNA-Molekülen nachzuweisen (Veres, et al., 1987). Der Fokus lag im Zuge dessen auf dem rein qualitativen Beleg der Faktorexpression. Deswegen wurden die Experimente in Form einer diesem Zweck dienlichen konventio-

nellen Endpunkt-PCR mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Reaktionsprodukte durchgeführt. Als Nachteil des Verfahrens muss allerdings gesehen werden, dass die dokumentierten Signale der Versuche allenfalls eine semiquantitative Abschätzung der exprimierten RNA-Menge zulassen. Für genauere Aussagen könnten an diesem Punkt detaillierte quantitative Genexpressionsanalysen mittels RT-qPCR durchgeführt werden.

Der Versuchsaufbau beinhaltet mehrere potentielle Fehlerquellen. So stellt zum einen die Isolierung intakter RNA-Moleküle aus den Zellen einen kritischen Schritt für einen validen Genexpressionsnachweis dar. Trotz Einhaltung der gebotenen Sorgfalt kann es dennoch während des Aufreinigungsverfahrens zur RNase-bedingten Degradation der zu untersuchenden Transskripte kommen. Um dieser möglichen Fehlerquelle Rechnung zu tragen, wurden deshalb während des Isolationsprozesses stark denaturierende Guanidin-Thiocyanat Puffer in Anwendung gebracht, die RNAsen nachweislich inaktivieren (Chomczynski & Sacchi, 1987).

Zum anderen könnten die PCR-Ergebnisse auch durch DNA-Artefakte oder Primer-Dimere verfälscht worden sein. Um Verunreinigungen der Proben beispielsweise durch Hautpartikel oder andere Fremd-DNA auszuschließen, wurden darum auf der einen Seite separate Kontrollproben ohne jeglichen DNA-Zusatz in den Versuchsaufbau miteinbezogen. Auf der anderen Seite wurden zur Durchführung der PCR-Läufe Hot-Start Polymerasen benutzt, die erwiesenermaßen die Bildung von Primer-Dimeren minimieren und auf diesem Weg die Spezifität und Sensivität einer PCR erhöhen (D'Aquila, et al., 1991).

Zur Ausräumung dennoch bestehender Unsicherheiten könnten die Versuche anhand von sogenannten Northern-Blots bestätigt werden. Ähnlich dem Western-Blot werden bei diesem Verfahren zelluläre RNA-Moleküle zunächst ihrer Größe nach gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Der eigentliche spezifische Nachweis bestimmter RNA-Moleküle erfolgt dann anschließend mittels Hybridisierung mit komplementären Gensonden (Alwine, Kemp, & Stark, 1977).

5.1.2 Immuno-Blot

Im zweiten Abschnitt dieser Studie sollte primär untersucht werden, ob sich die zu untersuchenden Faktoren in beiden Zelllinien auch auf Translationsebene nachweisen lassen. Darauf aufbauend stellte sich die Frage, inwieweit sich die auf Transkriptionsebene semiquantitativ abgeschätzten Mengenrelationen auf Proteinebene fortsetzen. Die diesbezüglich verwen-

dete Methode des Westernblots gilt gemeinhin als Standardtechnik zum Nachweis von Proteinen und wurde ausgewählt, da diese gegenüber alternativen Verfahren wie beispielsweise dem ELISA (engl. = *enzyme-linked immunosorbent assay*) einige Vorteile bietet. So erlaubt ein ELISA lediglich die Detektion und Quantifizierung eines bestimmten Proteins, geblottete Proteinbanden hingegen gestatten die Suche nach mehreren unterschiedlich relevanten Proteinen, indem verschiedene Antikörper zugesetzt und anschließend wieder entfernt werden können. Ergänzend dazu liefert die Auftrennung der Proteinbanden eine zusätzliche Information über die Größe des detektierten Polypeptids. Anhand der Überprüfung eines internen Mengenstandards ist zudem eine relative Quantifizierung des jeweiligen Proteingehalts durchführbar, wodurch sich die Proteinkonzentrationen verschiedener Proben untereinander vergleichen lassen. Nachteile des Westernblots sind, dass er zeitaufwendiger als ein ELISA ist und teilweise aufwändige Optimierungen der Versuchsbedingungen erforderlich sind (Kurien & Scofield, 2006).

Neben versuchsbedingten Fehlerquellen besteht ferner die Möglichkeit, dass die binnen dieses Studienabschnittes eingesetzten Antikörper nicht nur an den jeweilig untersuchten Transkriptionsfaktoren spezifisch gebunden haben, sondern vielmehr ebenfalls unspezifische Bindungen eingegangen sind. Um eine daraus resultierende potentielle Fehldeutung der erhobenen Daten auszuschließen, könnten die Experimente im Hinblick darauf mit Antikörpern gleicher Spezifität eines anderen Herstellers wiederholt werden.

5.1.3 Chip-Assay

Im dritten Abschnitt sollte anhand von Chip-Assays die physische Bindung der Wnt-Faktoren TCF3 und TCF4 sowie des Transkriptionsfaktors SLUG in der HECA-Promotorregion nachgewiesen werden. Diese Nachweistechnik gilt heute als Verfahren der Wahl, um Protein-DNA Interaktionen zu untersuchen (Collas, 2010) und bietet gegenüber alternativen Methoden wie dem DNase Footprinting Assay den Vorteil, die untersuchte Interaktion im Chromatin-kontext einer lebenden Zelle nachweisen zu können (Orlando, 2000; Brenowitz, et al., 1986). Ein Problem der Methode besteht darin, dass im Versuchsverlauf trotz Einhaltung der gebotenen Sorgfalt im Zuge der Durchführung nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch unspezifisch gebundenes Chromatin in die Analyseansätze gelangt und in der Folge die Signale der sich anschließende RT-qPCR-Analyse verfälschen kann (Collas, 2010). In der Literatur sind

zu diesem Thema mehrere potentielle Ursachen für dieses so genannte „Hintergrundchromatin“ bei Chip-Experimenten beschrieben.

Einerseits wurde von Dahl et al. (2007) in einer Studie zur Etablierung eines prozessoptimierten Chip-Assay Protokolls gezeigt, dass während des Aufreinigungsprozesses des immunpräzipitierten Chromatins, trotz mehrmaliger Waschvorgänge, geringe Mengen unspezifischer DNA-Fragmente an den Wänden der Reaktionsgefäße haften bleiben. Um diese Fehlerquelle zu eliminieren bzw. zumindest zu reduzieren, schlagen die Autoren daher vor, im Versuchsverlauf unmittelbar nach dem letzten Waschvorgang mit hochsalzhaltiger Lösung, die Protein-G-Magnetic-Beads-gebundenen Immunkomplexe in ein neues Reaktionsgefäß zu transferieren (= engl. „*tube shift*“) und erst dann mit der Eluierung des Chromatins aus diesen Komplexen fortzufahren.

Bei diesem Arbeitsschritt kommt noch ein weiterer Aspekt in Bezug auf das Hintergrundchromatin zum Tragen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die im Versuchsablauf zur Isolierung der DNA-Protein-Immunkomplexe genutzten Protein G-Magnetic Beads, trotz ihrer hohen Affinität zur unspezifischen Fc-Region von IgG-Antikörpern, teilweise ebenso unspezifisch an die DNA binden und deswegen nicht nur die gesuchten IgG-Immunkomplexe aus Zelllysaten isoliert werden, sondern auch zu einem geringen Teil unspezifische DNA-Fragmente (Bjorck & Kronvall, 1984; Eliasson, et al., 1988). Diese methodische Fehlerquelle lässt sich allerdings mangels präziserer Alternativen nach derzeitigem Stand nicht beheben (Collas, 2010).

Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die verwendeten Antikörper nicht nur an den jeweilig untersuchten Transkriptionsfaktoren spezifisch gebunden haben, sondern vielmehr ebenfalls unspezifische Bindungen mit anderen Faktoren bzw. DNA-Fragmenten eingegangen sind und diese Anteile hierdurch mit aus den Zelllysaten isoliert wurden. Um eine daraus resultierende potentielle Fehldeutung der erhobenen Daten auszuschließen, könnten die Versuche insofern mit Antikörpern gleicher Spezifität eines anderen Herstellers wiederholt werden. Insgesamt ist es aber trotz stetiger verfahrenstechnischer Verbesserungen derzeit nicht möglich, das Hintergrundchromatin vollständig aus den Analyseansätzen zu eliminieren (Dahl & Collas, 2007).

Aus diesem Grund kommt insbesondere aussagekräftigen Negativkontrollproben eine besondere Bedeutung zu. In der Literatur finden sich dazu vielfältige Ansätze, wobei häufig als klassische Negativkontrolle eine separate Probe ohne Antikörper in Anwendung gebracht wird. Anhand dieses, auch als „Bead-only“ bezeichneten, Kontrollansatzes kann der Betrag

durch Protein G-Beads unspezifisch gebundener Chromatinfragmente bestimmt und in der Auswertung entsprechend berücksichtigt werden. Nachteilig an dieser Methode ist jedoch, dass derjenige Anteil am Hintergrundchromatin dabei nicht erfasst wird, der potentiell durch die im Rahmen des Experiments eingesetzten Antikörper verursacht wird. Um die Spezifität, und damit die Aussagekraft, des Analyseergebnisses eines Chip-Experiments dahingehend zu optimieren, wird in der Literatur deswegen empfohlen, einer parallelen Chromatinpräparation einen unspezifischen Antikörper desselben Isotyps zu zusetzen und diesen Ansatz anschließend als Negativkontrolle zu verwenden. Dadurch wird erreicht, dass nicht nur der durch die Protein G-Beads verursachte sondern auch der von unspezifischen Bindungen der verwendeten Antikörpern herrührende Anteil am Hintergrundchromatin erfasst wird und in der Datenanalyse miteinberechnet werden kann (Collas, 2010). Dieser Empfehlung folgend wurden deshalb im Zuge dieser Arbeit separate Proben mit unspezifischen IgG-Antikörpern als Negativreferenz genutzt um eine optimale Spezifität der gemessenen Signale zu gewährleisten.

Um die dennoch bestehenden Unsicherheiten auszuräumen könnten die Ergebnisse der Chip-Experimente anhand eines sogenannten „Pulldown Assays“ verifiziert werden. Diese Methode findet u.a. Anwendung um außerhalb einer lebenden Zelle Interaktionspartner für eine Ziel-DNA zu finden (Wu, 2006). Das Versuchsprinzip basiert diesbezüglich auf dem Ausnutzen der Affinität Biotin-markierter Ziel DNA zu einer Streptavidin-Matrix. Nach der Zugabe potentieller Interaktionspartner, z. B. in Form von Transskriptionsfaktoren oder eines Zelllysats, gefolgt von einem entsprechenden Waschprotokoll verbleiben die Interaktionspartner an der Ziel-DNA und damit an die Matrix gebunden und können daraufhin untersucht werden (Deng, et al., 2003; Bruggink & Hayes, 2004). Auf diesem Weg würden die oben beschriebenen, systemimmanenten Fehlerquellen der Immunopräzipitation von vornherein umgangen und die im Verlauf dieser Studie nachgewiesenen Protein-DNA-Interaktionen könnten somit bestätigt werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Regulation der HECA-Expression durch den kanonischen Wnt-Signalweg

Die Studien von DasGupta et al. (2005) und Tang et al. (2008) lassen eine Verbindung HECAs mit dem kanonischen Wnt-Signalweg vermuten. An diesem Punkt anknüpfend wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, inwieweit die Expression des HECA-Gens bei der OSCC-Zelllinie PCI 13 und der gesunden Kontrollzelllinie HOK durch diesen Regulationspfad gesteuert wird. Hierbei wurde zunächst die Expression der zur Signalweiterleitung notwendigen Faktoren TCF3, TCF4 und β -Catenin in beiden Zelllinien sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene untersucht. In den RT-PCR-Analysen fiel auf, dass während bei PCI 13 die Transkriptionsraten von TCF3 und TCF4 auf augenscheinlich vergleichbaren Niveaus liegen (vgl. 4.1.1), scheinen die HOK-Zellen hingegen einerseits insgesamt weniger dieser Faktoren und andererseits mehr TCF3 als TCF4 Transskripte zu exprimieren (vgl. 4.2.2). Auf Translationsebene zeichneten sich dagegen davon abweichende Tendenzen ab. Die Westernblot-Analyse bestätigte zwar bei HOK den tendenziellen Expressionsunterschied zwischen TCF3 und TCF4. Ebenso zeigte PCI 13 für beide TCF4-Isoformen und β -Catenin die insgesamt höhere Proteinkonzentration im Vergleich zu HOK. Die TCF3-Konzentration war dagegen bei den PCI 13-Zellen niedriger als die TCF4-Konzentration und lag zudem deutlich unterhalb dem HOK-Referenzwert (vgl. 4.2.3). Dieser Unterschied manifestierte sich schließlich in gleicher Weise bei den Chip-Assay-Analysen. Einerseits wurde darin der Nachweis erbracht, dass sowohl bei PCI 13 als auch bei HOK beide Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion des HECA-Gens binden. Andererseits ließ sich beim Vergleich der beiden Zelllinien ebenfalls eine verhältnismäßige Signaldiskrepanz innerhalb der Transkriptionsfaktoren beobachten, d.h. während bei PCI 13 das TCF4-Signal überwog, lagen bei HOK umgekehrt die Werte für TCF3 teilweise höher (vgl. 4.3.1.1, 4.3.1.2, 4.3.4). Diese Erkenntnisse bestätigten sich genauso in den ergänzenden Untersuchungen mit Wnt-Modulatoren vorbehandelter PCI 13-Zellen. Regulatorische Effekte durch den Wnt-Agonisten BIO bzw. den Wnt-Antagonisten FH535 ließen sich aber nur bedingt beobachten. Während sich die Signalstärke speziell von TCF4 unter dem Einfluss von BIO tendenziell zu steigern schien, schwächte sich das Signal unter FH535-Einfluss im Allgemeinen ab (vgl. 4.3.2, 4.3.3).

Die Expressionsanalysen auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene belegen zum einen, dass der Wnt-Signalweg sowohl bei HOK als auch bei PCI 13 aktiv ist und nachfolgend die Regulation der HECA-Expression durch diese Signalkaskade grundsätzlich denkbar ist.

Zum anderen deuten die Untersuchungen daraufhin, dass dieser Regulationspfad bei OSCC vergleichsweise aktiver ist, als in gesundem Referenzgewebe. Dabei scheint es im Zuge der Tumoretablierung zu einer Verschiebung binnen der signalweiterleitenden Transkriptionsfaktoren zu kommen, d.h. während bei gesunden HOK-Zellen die Signaltransduktion verstärkt über TCF3 erfolgt, wird diese bei der OSCC-Zelllinie PCI 13 primär durch TCF4 vermittelt. In der Literatur finden sich dazu mögliche Erklärungsansätze, die diese Beobachtungen glaubhaft erscheinen lassen.

Auf der einen Seite betonen zahlreiche Publikationen, dass der kanonische Wnt-Signalweg nicht nur in der embryonalen Entwicklung sondern auch in der Homöostase der regenerativen Erneuerung bestehender Gewebe eine zentrale Rolle spielt (Cadigan & Peifer, 2009; Clevers, 2006). Bekanntlich geht diese Erneuerung von pluripotenten Stammzellen in den jeweiligen Geweben aus (Solter, 2006). Als Stammzellen der menschlichen Mukosa zählen zu dieser Gruppe wiederum gleichfalls die im Zuge dieser Arbeit als gesunde Kontrollzellen verwendeten HOK. In Studien zur Bedeutung und Funktion der einzelnen Wnt-Faktoren wurde nun dargelegt, dass TCF3 über zumeist repressive Funktionen die Pluripotenz bzw. die Selbsterneuerung von Stammzellen reguliert (Tam, et al., 2008; Cole, et al., 2008; Yi, et al., 2008), und deshalb ein essentieller Faktor für die langfristige Gewebekomöostase ist (Nguyen, et al., 2009). In Verbindung mit dem Wissen um die Stammzellfunktion der HOK, lässt sich daraus ableiten, dass TCF3 eventuell genauso bei HOK diese Funktionen innehat, was insofern wiederum eine plausible Begründung dafür liefern könnte, weshalb dieser Faktor bei HOK im Vergleich zu TCF4 augenscheinlich sowohl verstärkt transkribiert (vgl. 4.1.2), als auch translatiert wurde (vgl. 4.2.2) und in der Folge das Signal in den Chip-Assays dominierte (vgl. 4.3.4). In Ergänzung hierzu belegen die Untersuchungen von Lin et al. (2011), dass TCF3 zudem tumorsuppressive Eigenschaften besitzt. Im Kontext von Tumorerkrankungen ist die Geninformation derartiger Peptide bekanntlich häufig mutiert, so dass die Transkriptionsprodukte hieraus zumeist funktionslos bleiben und in der Folge von den Zellen verstärkt abgebaut werden (Sherr, 2004). Betrachtet man diese Zusammenhänge in Verbindung mit den Signalen von TCF3 bei PCI 13, lässt dies die Interpretation zu, dass das TCF3-Gen bei dieser Zelllinie zwar gleichermaßen wie TCF4 transkribiert wird (vgl. 4.1.1), posttranskriptional aber einer verstärkten Degradation unterliegt, weshalb es dann folglich auf Translationsebene nur noch in Spuren detektierbar war (vgl. 4.2.1) und in der Konsequenz in den Chip-Assays verglichen mit TCF4 die wesentlich schwächeren Signale zeigte (vgl. 4.3.1; 4.3.2; 4.3.3).

Auf der anderen Seite scheinen β -Catenin und TCF4 von PCI 13 sogar verstärkt exprimiert zu werden. Das lässt sich insbesondere aus der Westernblot-Analyse ableiten, da hier die relative Proteinkonzentration der beiden Faktoren deutlich über dem HOK-Referenzwert lag (vgl. 4.2.3). Dieses Ergebnis steht einerseits im Einklang mit den Studien von Ueda et al. (2006), die ebenfalls eine aberrante Expression von β -Catenin bei OSCC nachwiesen. Andererseits ist in dieser Beziehung von TCF4 bislang nichts bekannt. Untersuchungen an anderen Tumorzelllinien konnten aber belegen, dass die Expression von TCF4 bei einigen Formen des CRC mit der β -Catenin-Expression korreliert (Balaz, et al., 2010) und darüber hinaus bestimmte TCF4-Isoformen mit der Entwicklung und Progression von Prostata-, Leber-, und Colorektalkarzinomen assoziiert sind (Sun, et al., 2006; Tsedensodnom, et al., 2011; Shitashige, et al., 2008). Vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich daraus eine dahingehende Verbindung bzw. Wirkung von TCF4 auch im Kontext von OSCC vermuten, was in dieser Hinsicht wiederum eine denkbare Erklärung für seine vergleichsweise gesteigerte Transkription (vgl. 4.1.1) bzw. Translation (vgl. 4.2.3) wäre und in der Konsequenz zudem die, binnen der Chip-Assays beobachtete, verstärkte Signaltransduktion durch diesen Faktor (vgl. 4.3.1.1, 4.3.1.2, 4.3.2, 4.3.3) plausibel erscheinen lässt.

Zusammengenommen können diese Erkenntnisse eine einsichtige Begründung für die oben genannte These liefern, warum bei PCI 13 das TCF4-Signal dominierte, während die Signalverhältnisse bei HOK umgekehrt waren. Diesbezüglich muss jedoch betont werden, dass insbesondere die Westernblot-Analyse der Proteinexpression nur exemplarisch erfolgte und dieser Versuch infolgedessen für eine definitive Aussage entsprechend wiederholt werden müsste. Daneben gilt es zu bedenken, dass von den einzelnen Wnt-Faktoren, bedingt durch alternatives Splicing bzw. Transkription über alternative Promotorregionen, sowie posttranslationale Modifikationen, zahlreiche Varianten existieren, die sowohl in gesundem Gewebe als auch im Kontext von Tumorerkrankungen in differenzierter Weise exprimiert werden und dementsprechend unterschiedliche Wirkungsweisen haben können (Weise, et al., 2010; Howng, et al., 2004; Shiina, et al., 2003). So sind beispielsweise einige Fälle dokumentiert, in denen TCF4, dem oben gesagten widersprechend, tumorsuppressive Eigenschaften zeigt (Angus-Hill, et al., 2011; Shulewitz, et al., 2006). Um letztlich aufzuklären, welche jeweilige Isoform in der HECA-Promotorregion bindet, müssten daher RNAi-basierte Versuchsreihen durchgeführt werden, die es erlauben gezielt einzelne Gene und die daraus resultierenden Transkripte zu inaktivieren.

Die Ergebnisse der Chip-Assays belegen in erster Linie, dass die Expression des HECA-Proteins bei beiden Zelllinien durch den kanonischen Wnt-Signalweg reguliert wird und bestätigen somit die Studien von DasGupta et al. (2005) und Tang et al. (2008), die ihrerseits eine dahingehende Verbindung sowohl bei *Drosophila* als auch bei CRC-Zellen nachgewiesen hatten. In zweiter Linie lässt sich auf Basis der aktuellen Literatur vermuten, dass die Regulationsbeziehung zwischen der HECA-Expression und dem Wnt-Signalweg negativer Natur ist. Diese These wird dabei zunächst durch Studien gestützt, die belegen, dass, abweichend vom Grundmodell der Signaltransduktion des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, die Expression von Wnt-Zielgenen bei aktivem Signal grundsätzlich nicht nur angestoßen, sondern vielmehr genauso unterdrückt werden kann (Hoverter & Waterman, 2008; Hoppler & Kavanagh, 2007). Im Kontext von Malignomen sind in dieser Hinsicht mehrere Fälle dokumentiert, in denen die Expression tumorgenetisch kritischer Faktoren speziell durch den Wnt-Signalweg inhibiert wird. Beispielsweise zeigten Delmas et al. (2007), dass der TCF/ β -Catenin-Komplex bei Melanozyten in der Lage ist, die Expression des Zellzyklusinhibitors p16^{INK4a} direkt zu supprimieren, was letztlich die Immortalisierung dieser Zellen zur Konsequenz hat und nachfolgend die Entwicklung eines malignen Melanoms erheblich fördert. In anderen Publikationen wurde eine derartige Beziehung ebenfalls für das Zelladhäsionsmolekül E-cadherin (Jamora, et al., 2003), sowie dem der Metastasierung entgegenwirkenden, membranständigen Glykoprotein CD82 (Synonym: KAI1) nachgewiesen (Kim, et al., 2005). Diese Beispiele verdeutlichen, dass die Wnt-vermittelte Unterdrückung der Genexpression bestimmter Faktoren eine durchaus gewichtige Rolle im Verlauf der Karzinogenese spielen kann und lassen darüber hinaus eine derartige Regulationsbeziehung in Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit auch für HECA plausibel erscheinen. Weitere Indizien für diese Annahme liefern wiederum die Untersuchungen von Dowejko et al. (2012). Die Forschergruppe wies zum einen nach, dass während der malignen Transformation vom gesunden Plattenepithel über das primäre OSCC bis hin zur Metastasierung auf transkriptioneller Ebene zu einer kontinuierlichen Abnahme der HECA-Expression kommt. Zugleich belegen Studien, dass der Wnt-Signalweg, neben zahlreichen weiteren Tumorarten, gleichermaßen bei OSCC konstitutiv aktiviert ist (Molinolo, et al., 2009). Betrachtet man diese Erkenntnisse im Zusammenhang, erlaubt dies den Schluss, dass die kontinuierliche Abnahme der HECA-Expression während der OSCC-Progression möglicherweise Folge eines überaktiven Wnt-Signalwegs ist. Zum anderen demonstrierten Dowejko et al. (2012) in einer vergleichenden Expressionsstudie an OSCC- und HOK-Zellen, dass die HECA-Transkriptkonzentration unter dem Einfluss des Wnt-Agonisten BIO dosisabhängig

signifikant abfällt bzw. unter dem Einfluss des Wnt-Antagonisten FH535 dosisabhängig signifikant ansteigt. BIO inhibiert das Enzym GSK3- β und inaktiviert damit ein zentrales Element des β -Catenin-Zerstörungskomplexes. In der Folge akkumuliert β -Catenin in der Zelle und sorgt auf diesem Weg für eine verstärkte Signalweiterleitung (Polychronopoulos, et al., 2004). FH535 blockiert dagegen den β -Catenin/TCF-Komplex im Nucleus der Zelle und blockiert auf diesem Weg die Signalweiterleitung innerhalb des Wnt-Signalwegs (Handeli & Simon, 2008). Diese Beobachtungen zusammengenommen bestätigen insofern einerseits die These, dass die HECA-Expression durch den Wnt-Signalweg negativ reguliert wird und liefern andererseits auch eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse der Chip-Assays mit BIO bzw. FH535 vorbehandelter PCI 13-Zellen. Demnach lässt sich bei den unter BIO-Einfluss stehenden Zellen die Signalerhöhung von TCF4 als direkte Folge der Signalverstärkung interpretieren (vgl. 4.3.2). In Anbetracht, dass aktuelle Studien vermuten, dass die Inaktivierung von GSK3- β bei OSCC onkogene Wirkungen entfaltet (Mishra, 2010), könnte die Signalerhöhung hingegen aber genauso mittelbare Konsequenz des insgesamt gesteigerten infolge der GSK3- β Inhibierung auf vermehrte Proliferation ausgerichteten Stoffwechsels der OSCC-Zellen sein. Demgegenüber scheint der Wnt-Antagonist FH535 den gegenteiligen Effekt zu erzielen und das Signalniveau insgesamt abzusenken (vgl. 4.3.3). Vor dem Hintergrund, dass diese Substanz bei Colon-, Lungen-, und Leberkrebszellen nachweislich einen antiproliferativen Effekt zeigt (Handeli & Simon, 2008), könnte dies im Umkehrschluss zu den BIO-Experimenten bedeuten, dass die Signallerniedrigung in diesem Fall mittelbare Konsequenz einer infolge der Signalweiterleitungsblockade reduzierten Stoffwechsellaage der OSCC-Zellen sein könnte. Insgesamt lassen sich die Aussagen zu den Wirkungen von BIO und FH535 auf Basis der erhobenen Datenmenge aber nur tendenziell treffen. Für präzisere Aussagen, insbesondere über die Höhe des Signalunterschieds müssten dementsprechend mehr Versuchsläufe durchgeführt und die Werte statistisch gemittelt werden. Dennoch stellte diese pharmakologische Modulation des Wnt-Signalwegs ein weiteres Indiz für die Spezifität der TCF-Bindung an den HECA-Promotor dar.

Abschließend bleibt anzumerken, dass in Bezug auf die Regulationsbeziehung zwischen HECA und dem Wnt-Signal an diesem Punkt einige Fragen offen bleiben müssen. Weitere Untersuchungen könnten insbesondere klären, inwiefern zwischen der hier beschriebenen Regulationsbeziehung und dem Stadium oder der Differenzierung eines OSCC eine Abhängigkeit besteht. Daneben stellt sich die Frage, ob sich dieser Regelkreis ebenso bei anderen Malignomen im Kopf-/ Halsbereich nachweisen lässt.

5.2.2 Regulation der HECA-Expression durch SLUG

Einige Daten weisen daraufhin, dass die Expression HECAs durch den Transkriptionsfaktor SLUG reguliert wird (Dowejko, et al., 2009). Ziel dieser Arbeit war es daher, diese Annahme am Beispiel der OSCC-Zelllinie PCI 13 und der gesunden Kontrollzelllinie HOK zu überprüfen. Die zu diesem Zweck im ersten Abschnitt durchgeführten RT-PCR-Analysen zeigten, dass SLUG auf Transkriptionsebene in beiden Zelllinien nahezu auf dem gleichen Niveau exprimiert wird (vgl. 4.1.1, 4.1.2). Auf Translationsebene hingegen wies PCI 13 im Vergleich zu HOK die höhere Konzentration für diesen Transkriptionsfaktor auf (vgl. 4.2.3). Auffällig hierbei war allerdings, dass sich in der Westernblot-Analyse nicht nur die erwartete Bande bei 30 kDa zeigte, sondern bei PCI 13 noch zusätzliche Banden im Bereich von 37 kDa und 90 kDa (vgl. 4.2.1), sowie bei HOK darüberhinaus noch weitere Banden im Bereich zwischen 45 kDa und 50 kDa detektiert wurden (vgl. 4.1.2). Die abschließend durchgeführten Chip -Assay-Analysen belegen, dass SLUG sowohl bei PCI 13 als auch bei HOK in der Promotorregion des HECA-Gens bindet (vgl. 4.3.1.2, 4.3.4). In den ergänzenden Untersuchungen an, mit Wnt-Modulatoren vorbehandelten, PCI 13-Zellen ließ sich zudem beobachten, dass sich das SLUG-Signal unter dem Einfluss von BIO zu verstärken scheint (vgl. 4.3.2), während es unter dem Einfluss von FH535 absinkt (vgl. 4.3.3).

Die Expressionsanalysen auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene belegen zum einen, dass SLUG sowohl bei HOK als auch bei PCI 13 aktiv ist und folglich die Regulation der HECA-Expression durch diesen Transkriptionsfaktor grundsätzlich denkbar ist. Zum anderen deutet insbesondere die Westernblot-Analyse daraufhin, dass SLUG bei OSCC möglicherweise überexprimiert wird. Diese Erkenntnis ist von Interesse, weil das Protein als Regulator der epithelial-mesenchymalen Transition bewiesenermaßen eine Schlüsselrolle bei Invasion und Metastasierung einiger menschlicher Malignome, wie beispielsweise dem adenoidzystischen Karzinom oder dem Gliom, zu spielen scheint (Casas, et al., 2011; Tang, et al., 2010; Yang, et al., 2010). Ferner wurde der Expressionslevel dieses Faktors in mehreren Publikationen als potentieller prognostischer Marker vorgestellt. So geht seine Überexpression beispielsweise mit einer schlechten Prognose beim Magenkarzinom und CRC einher (Uchikado, et al., 2011; Shioiri, et al., 2006) und korreliert mit der Malignität des Osteosarkoms (Sharili, et al., 2011). Zusammengefasst wird aus diesen Studien deutlich, dass SLUG vermutlich auch bei OSCC ein kritischer Faktor der Metastasierung ist und sein Expressionsniveau darum bei diesen Tumoren gleichermaßen als potentieller prognostischer Marker in Frage kommt. Die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind in dieser Hinsicht al-

lerdings zu wenig aussagekräftig. Für ein exakteres Bild könnten an diesem Punkt vergleichende Expressionsstudien an OSCC-Zelllinien unterschiedlicher Stadien und Differenzierung durchgeführt werden. Überdies bleibt anzumerken, dass sich diese Ausführungen auf die Werte für die literaturgemäß erwartete 30 kDa Bande innerhalb des Westernblots beziehen. Dieser Versuch lieferte aber noch zusätzliche Banden, für die es in der Literatur bisher keine Erklärung gibt. Als potentielle Ursachen dafür kommen mehrere Gesichtspunkte in Betracht. Zum einen wird SLUG seiner Klassifikation nach zu den Typ-C2H2 Zink- Finger Transkriptionsfaktoren gezählt und ist damit ein Mitglied der strukturell ähnlichen SNAIL-Proteinfamilie (NCBI Gene-ID: 6591) (Nieto, 2002). Der verwendete SLUG-Antikörper (ab27568, Abcam, Cambridge, UK) wiederum ist seiner Natur nach polyklonal, d.h. er war nicht nur gegen ein bestimmtes Epitop des SLUG-Peptids gerichtet, sondern es wurden potentiell mehrere Epitope detektiert. Deswegen lässt sich nicht ausschließen, dass dadurch eventuell ebenso weitere Mitglieder der SNAIL-Proteinfamilie im Sinne einer Kreuzreaktion von diesem Antikörper markiert wurden. Zum anderen ist es durchaus denkbar, dass von SLUG selber mehrere verzweigte Formen, alternative Splicing-Varianten oder, beispielsweise durch Glykosylierung oder Phosphorylierung, posttranslational modifizierte Abkömmlinge mit jeweils unterschiedlichen Molekulargewichten existieren, die infolge der polyklonalen Eigenschaften des Antikörpers neben dem gesuchten 30 kDa-Peptid ebenfalls detektiert wurden. Um diese Vermutungen zu bestätigen oder zu widerlegen, ist daher noch einige Grundlagenforschung notwendig.

Die Ergebnisse der Chip-Assays lassen demgegenüber insgesamt den Schluss zu, dass die Expression HECAs auch beim Menschen durch SLUG reguliert wird und bestätigen somit die These von Dowejko et al. (2009). Auf Basis der aktuellen Literatur lässt sich allerdings nicht eindeutig klären, welcher Natur diese Regulationsbeziehung ist. Auf der einen Seite deuten Erkenntnisse aus anderen Studien daraufhin, dass die HECA-Expression mutmaßlich positiv durch SLUG reguliert wird. Diese Ansicht gründet sich einerseits auf die Arbeiten von Stenberg et al. (1998), die nachwiesen, dass das HECA-homolog *headcase* bei *Drosophila* durch dessen SLUG-homolog *escargot* positiv reguliert wird. Andererseits gibt es Hinweise, dass SLUG die Expression weiterer Faktoren wie beispielsweise des Tumorsuppressors E-cadherin sowohl bei *Drosophila* (Tanaka-Matakatsu, et al., 1996), als auch in menschlichem Gewebe (Tseng, et al., 2010) positiv reguliert, so dass insgesamt eine positive Regulation der HECA-Expression durch diesen Transkriptionsfaktor nicht ausgeschlossen erscheint. Die überwiegende Mehrheit der aktuellen Publikationen sieht SLUG hingegen als transkriptionellen Re-

pressor. Beispielsweise deuten einige Erkenntnisse daraufhin, dass E-cadherin durch diesen Transskriptionsfaktor gerade nicht positiv, sondern vielmehr negativ reguliert wird (Moreno-Bueno, et al., 2006; Bolós, et al., 2003; Hajra, et al., 2002). Daneben sind noch weitere Fälle dokumentiert, in denen SLUG nachweislich diese Wirkung ausübt, wie beispielsweise dem Vitamin-D-Rezeptor (Larriba, et al., 2009) oder dem Tumorsuppressor p53 sowie weiteren proapoptischen Faktoren (Kajita, et al., 2004; Inukai, et al., 1999). Betrachtet man diese antiapoptischen Eigenschaften SLUGs im Zusammenhang mit den tumorsuppressiven Funktionen HECAs, stellt sich eine negative Regulationsbeziehung zwischen beiden Faktoren als ebenso wahrscheinlich dar wie eine positive. Um letztlich zu klären, wie die HECA-Expression im konkreten Fall durch SLUG gesteuert wird, könnten dazu vergleichende HECA-Expressionsstudien an SLUG-überexprimierenden Zellen durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der Chip-Assays mit Wnt-Modulatoren vorbehandelter PCI 13-Zellen förderten noch einen weiteren beachtenswerten Aspekt zu Tage. Aus Studien an humanen Osteoblasten ist bekannt, dass die Expression von SLUG seinerseits durch den Wnt-Signalweg reguliert wird (Lambertini, et al., 2010). Interessanterweise steigerte sich unter Einfluss des Wnt-Agonisten BIO das SLUG-Signal deutlich (vgl. 4.3.2), während es sich unter Einfluss des Wnt-Antagonisten FH535 absenkte (vgl. 4.3.3), so dass eine dahingehende Verbindung zwischen SLUG und dem Wnt-Signalweg potentiell auch im Kontext von OSCC vermutet werden kann. Diese Hinweise für sich genommen sind allerdings nicht hinreichend aussagekräftig, um darin einen Beleg für diese Regulationsbeziehung zu sehen. Für einen definitiven Nachweis könnten entsprechende, an den Versuchen dieser Arbeit bezüglich HECA orientierte, Chip-Assays in gleicher Weise für SLUG durchgeführt werden.

5.2.3 Klinische Relevanz

Die Mortalitätsrate der OSCC hat sich seit Jahrzehnten trotz der Einführung neuer Therapieverfahren und erweiterten diagnostischen Möglichkeiten nicht wesentlich verbessert (Haddad & Shin, 2008). Konkret sterben nach wie vor ca. 50% der betroffenen Patienten innerhalb von 5 Jahren nach der Diagnosestellung (Argiris, et al., 2008). Ausschlaggebend hierfür sind im Wesentlichen zwei Umstände. Zum einen metastasieren die neoplastischen Zellen der OSCC relativ frühzeitig in regionale Lymphknoten und sind zudem mit den aktuellen diagnostischen Verfahren nur schwer zu lokalisieren (Roepman, et al., 2005). Zum anderen erweisen sich die OSCC als relativ resistent gegenüber den konventionellen Chemotherapeutika Paclitaxel, Docetaxel, Cetuximab und Cisplatin (Wang & Lippard, 2005). Zugleich ist seit Jahren bekannt, dass die aberrante Aktivität des Wnt-Signalwegs nachhaltig zur Entwicklung und Progression zahlreicher menschlicher Krebserkrankungen inklusive der OSCC beiträgt (Molinolo, et al., 2009). Aus diesen Gründen fokussiert sich die Suche nach neuen therapeutischen Ansatzpunkten zunehmend auch auf Inhibitoren dieses Regulationspfades (Barker & Clevers, 2006). Interessanterweise entdeckte man im Zuge dessen, dass eine Reihe bekannter Substanzen aus der Gruppe der NSAIDs (engl. = *non-steroidal-anti-inflammatory drugs*) sowie einige Vitamin-A bzw. Vitamin-D-Derivate in der Lage sind die Signalweiterleitung direkt oder indirekt zu beeinflussen, beispielsweise indem sie das Wnt-Zielgen Cyclooxygenase 2 (=COX2) inhibieren oder E-cadherin aktivieren (Reddy, et al., 2000; Pálmer, et al., 2001; Boon, et al., 2004). Manche der NSAIDs scheinen außerdem das Expressionsniveau von β -Catenin bzw. seine zelluläre Verteilung zu beeinflussen (Maier, et al., 2005). Ferner liefern epidemiologische Studien Hinweise darauf, dass sich infolge dieser Wirkungsweisen bei Langzeitgabe dieser Substanzklasse offensichtlich ein tumorpräventiver Effekt einstellt (Smigel, 2000).

Neben diesen bereits bekannten Substanzen berichten weitere Studien von niedermolekularen Verbindungen, die in der Lage sind, die Interaktion zwischen β -Catenin und TCF4 zu blockieren. In HTS-Untersuchungen (engl.: *high-throughput-screening*) zeigte sich in Bezug darauf, dass insbesondere die aus Pilzen stammenden Verbindungen PKF115-584, PKF-222-815 und CPG049090 potente Inhibitoren dieses Komplexes sind und aus diesem Grund als zukünftige Therapeutika eventuell in Frage kommen (Lepourcelet, et al., 2004; Barker & Clevers, 2006). Darüber hinaus wurden vielversprechende antikörperbasierte Therapiestrategien entwickelt, die sich gezielt gegen Elemente des Wnt-Signalwegs richten, die nachgewiesenermaßen bei bestimmten Krankheiten überexprimiert werden, wie beispielsweise die

Wnt-Moleküle selbst oder die Fz-Rezeptoren (You, et al., 2004; Nagayama, et al., 2005). Gleichmaßen sind die Anwendung therapeutischer Proteine wie der SFRPs und der Einsatz onkolytischer Adenoviren, die sich selektiv in Krebszellen mit aberranter TCF/ β -Catenin-Aktivität replizieren, gegenwärtig Gegenstand präklinischer Forschung an Tumormodellen (DeAlmeida, et al., 2007; Chen & McCormick, 2001; Malerba, et al., 2003). Welcher dieser Ansätze letztlich Eingang in klinische Therapiestrategien finden wird, bleibt abzuwarten. Interessant in Verbindung mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist dabei die Tatsache, dass der Tumorsuppressor HECA seinerseits in der Lage ist, bei OSCC-Zellen der Wnt-induzierten Zellproliferation entgegenzuwirken, indem er mit einigen Hauptkomponenten der Zellzyklusregulation interagiert. Zudem gibt es Hinweise, dass die HECA-vermittelte Zellzyklusmodulation die Chemosensitivität von OSCC gegenüber Cisplatin steigert (Dowejko, et al., 2012). Insofern könnte die gezielte Steigerung der HECA-Expression über die Inhibierung des Wnt-Signalwegs künftig ein potentieller Weg sein, um cisplatin-resistente OSCC effektiver zu behandeln.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Genregulation des putativen Tumorsuppressors HECA beim oralen Plattenepithelkarzinom. Ausgehend von Hinweisen aus der Literatur lag der Fokus dabei auf dem Nachweis der Regulationsbeziehung zwischen HECA und dem kanonischen Wnt-Signalweg einerseits und dem Transkriptionsfaktor SLUG andererseits. Der kanonische Wnt-Signalweg spielt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle während der Embryogenese und der regenerativen Erneuerung bestehender Gewebe. Zugleich ist seine konstitutive Aktivierung Kennzeichen vieler Tumorarten, inklusive der OSCC. SLUG hingegen ist ein Regulator der epithelial-mesenchymalen Transition und gilt als kritischer Faktor im Bezug auf die Invasion und Metastasierung bei diversen menschlichen Malignomen.

Die Untersuchung erfolgte in drei Stufen, wobei alle Daten jeweils als Vergleich zwischen der OSCC-Zelllinie PCI-13 und der gesunden Kontrollzelllinie HOK erhoben wurden. In den ersten beiden Stufen wurde dabei anhand konventioneller PCR- und Westernblot-Analysen zunächst nachgewiesen, dass die im Rahmen des Wnt-Signalwegs zur Signalweiterleitung benötigten Faktoren TCF3, TCF4 und β -Catenin sowie der Transkriptionsfaktor SLUG in beiden Zelllinien sowohl transkribiert, als auch in ihre jeweilige Peptidform translatiert werden. Aufgrund einer Literaturrecherche wurde eine genregulatorische Beziehung zwischen HECA und diesen Faktoren vermutet. Darauf aufbauend ließ sich im dritten Abschnitt mittels Chromatin-Immunpräzipitation und anschließender quantitativer Real-Time-PCR schließlich die physische Bindung dieser Faktoren an den HECA-Promotor direkt nachweisen. Diese Ergebnisse erlauben zusammengekommen den Schluss, dass die Expression des HECA-Gens sowohl durch den kanonischen Wnt-Signalweg als auch durch SLUG reguliert wird. In Ergänzung dazu kann über die Natur dieser Regulationsbeziehungen aus dem Kontext der Literatur abgeleitet werden, dass die HECA-Expression durch Wnt-Signale vermutlich negativ kontrolliert wird, für den Transkriptionsfaktor SLUG hingegen ist eine eindeutige Kategorisierung nach dem aktuellen Stand der Forschung nicht möglich. Weitere Studien könnten an diesem Punkt ansetzen und die genauere Natur der Regulation durch SLUG klären. Ebenso stellt sich die Frage, inwieweit zwischen den gefundenen Regulationsbeziehungen und dem Stadium bzw. der Differenzierung von OSCC eine Abhängigkeit besteht. Aus klinischer Sicht könnte die gezielte pharmakologische Modulation der HECA-Expression neue therapeutische Wege bei der Behandlung Wnt-abhängiger oraler Plattenepithelkarzinome eröffnen.

7. Literaturverzeichnis

1. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., & Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J*, 16(13):3797-804.
2. Alper, S., Laws, R., Lackford, B., Boyd, W., Dunlap, P., Freedman, J., et al. (2008). Identification of innate immunity genes and pathways using a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(19):7016-21.
3. Alwine, J., Kemp, D., & Stark, G. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(12):5350-4.
4. Andrews, E., Seaman, W., & Webster-Cyriaque, J. (2009). Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: A role for HPV. *Oral Oncol*, 45(6):486-91.
5. Angus-Hill, M., Elbert, K., Hidalgo, J., & Capecchi, M. (2011). T-cell factor 4 functions as a tumor suppressor whose disruption modulates colon cell proliferation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci*, 108(12):4914-9.
6. Arbouzova, N., & Zeidler, M. (2006). JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development*, 133(14):2605-16.
7. Arce, L., Yokoyama, N., & Waterman, M. (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene*, 25(57):7492-504.
8. Argiris, A., Karamouzis, M., Raben, D., & Ferris, R. (2008). Head and neck cancer. *Lancet*, 371(9625):1695-709.
9. Atcha, F., Syed, A., Wu, B., Hoverter, N., Yokoyama, N., Ting, J., et al. (2007). A unique DNA binding domain converts T-cell factors into strong Wnt effectors. *Mol Cell Biol*, 27(23):8352-63.
10. Böcker, W., Denk, H., Heitz, P., & Moch, H. (2008). *Lehrbuch Pathologie* (4. Auflage Ausg.). München: Elsevier.
11. Bach, E., Vincent, S., Zeidler, M., & Perrimon, N. (2003). A sensitized genetic screen to identify novel regulators and components of the Drosophila janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Genetics*, 165(3):1149-66.
12. Baker, H., Patel, V., Molinolo, A., Shillitoe, E., Ensley, J., Yoo, G., et al. (2005). Proteome-wide analysis of head and neck squamous cell carcinomas using laser-capture microdissection and tandem mass spectrometry. *Oral oncol*, 41(2):183-99.
13. Balaz, P., Plaschke, J., Krüger, S., Görgens, H., & Schackert, H. (2010). TCF-3, 4 protein expression correlates with beta-catenin expression in MSS and MSI-H colorectal cancer from HNPCC patients but not in sporadic colorectal cancers. *nt J Colorectal Dis*, 25(8):931-9.
14. Bangsow, T., Deutsch, U., & Engel, H. (2007). Real-time PCR und RT-PCR. In M. Jansohn, *Gentechnische Methoden* (S. 176-180). München: Elsevier.
15. Barker, N., & Clevers, H. (2006). Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 5(12):997-1014.
16. Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 434 (7035):864-870.
17. Beck-Mannagetta, J., & Hutarew, G. (2009). Plattenepithelkarzinom und potenziell maligne Veränderungen der Mundschleimhaut. *Hautarzt*, 60(8):859-865.
18. Behrens, J., von Kries, J., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., et al. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382(6592):638-42.
19. Bhanot, P., Brink, M., Samos, C., Hsieh, J., Wang, Y., Macke, J., et al. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature*, 382(6588):225-30.
20. Bilic, J., Huang, Y., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C., Bienz, M., et al. (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*, 316(5831):1619-22.
21. *biotechniques.com*. (2011). (Informa Biosciences) Abgerufen am 10. März 2011 von http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00006/Magnetic_Bead_Purific_6111a.jpg
22. Biozym Scientific GmbH. (2011). *biozym.com*. (Biozym Scientific GmbH) Abgerufen am 28. August 2011 von <http://www.biozym.com/DesktopModules/WebShop/shopdisplayproducts.aspx?productid=17071&id=1303>
23. Bjorck, L., & Kronvall, G. (1984). Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol*, 133(2): 969-974.
24. Blauwkamp, T., Chang, M., & Cadigan, K. (2008). Novel TCF-binding sites specify transcriptional repression by Wnt signalling. *EMBO J*, 27(10):1436-46.
25. Blot, W., McLaughlin, J., Winn, D., Austin, D., Greenberg, R., Preston-Martin, S., et al. (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*, 48(11):3282-7.

26. Bolós, V., Peinado, H., Pérez-Moreno, M., Fraga, M., Esteller, M., & Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci*, 116(Pt 3):499-511.
27. Boon, E., Keller, J., Wormhoudt, T., Giardiello, F., Offerhaus, G., van der Neut, R., et al. (2004). Sulindac targets nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signalling in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis and in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer*, 90(1):224-9.
28. Brenowitz, M., Senear, D., Shea, M., & Ackers, G. (1986). Quantitative DNase footprint titration: a method for studying protein-DNA interactions. *Methods Enzymol*, 130:132-81.
29. Bruggink, F., & Hayes, S. (2004). Identification of DNA binding proteins using the NoShift Transcription Factor Assay Kit. *Nature Methods*, 1, 177-179.
30. Brumby, A., & Richardson, H. (2005). Using *Drosophila melanogaster* to map human cancer pathways. *Nat Rev Cancer*, 5(8):626-39.
31. Burnette, W. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112(2):195-203.
32. Cadigan, K., & Peifer, M. (2009). Wnt Signaling from Development to Disease: Insights from Model Systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(2):a002881.
33. Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., et al. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*, 56(11):2488-92.
34. Carlsson, P., Waterman, M., & Jones, K. (1993). The hLEF/TCF-1a HMG protein contains a context- dependent transcriptional activation domain that induces the TCR-alpha enhancer in T cells. *Genes Dev*, 7(12A):2418-30.
35. Casas, E., Kim, J., Bendesky, A., Ohno-Machado, L., Wolfe, C., & Yang, J. (2011). Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res*, 71(1):245-54.
36. Cavallo, R., Cox, R., Moline, M., Roose, J., Polevoy, G., Clevers, H., et al. (1998). *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signaling activity. *Nature*, 395(6702):604-8.
37. Chang, K., Lin, S., Mangold, K., Jean, M., Yuan, T., Lin, S., et al. (2000). Alterations of adenomatous polyposis Coli (APC) gene in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 29 (3):223-6.
38. Chen, R., & McCormick, F. (2001). Selective targeting to the hyperactive beta-catenin/T-cell factor pathway in colon cancer cells. *Cancer Res*, 61(11):4445-9.
39. Chien, C., Chang, C., Yang, S., Chen, S., & Huang, C. (2006). A homologue of the *Drosophila* headcase protein is a novel tumor marker for early-stage colorectal cancer. *Oncol Rep*, 15(4):919-26.
40. Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1):156-9.
41. Claudio, P., Cui, J., Ghafouri, M., Mariano, C., White, M., Safak, M., et al. (2006). Cdk9 phosphorylates p53 on serine 392 independently of CKII. *J Cell Physiol*, 208(3):602-12.
42. Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, (127):469-480.
43. Cole, M., Johnstone, S., Newman, J., Kagey, M., & Young, R. (2008). Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev*, 22(6):746-55.
44. Collas, P. (2010). The Current State of Chromatin Immunoprecipitation. *Mol Biotechnol*, (45):87-100.
45. Constantinescu, S., Girardot, M., & Pecquet, C. (2008). Mining for JAK-STAT mutations in cancer. *Trends Biochem. Sci.*, 33(3):122-31.
46. Dahl, J., & Collas, P. (2007). Q2ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of developmentally regulated genes in human carcinoma cells. *Stem Cells*, 25(4):1037-46.
47. Daniels, D., & Weis, W. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol*, 12(4):364-71.
48. D'Aquila, R., Bechtel, L., Videler, J., Eron, J., Gorczyca, P., & Kaplan, J. (1991). Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic Acids Res*, 19(13):3749.
49. DasGupta, R., Kaykas, A., Moon, R., & Perrimon, N. (2005). Functional genomic analysis of the Wnt-wingless signaling pathway. *Science*, 308(5723):826-33.
50. DeAlmeida, V., Miao, L., Ernst, J., Koeppen, H., Polakis, P., & Rubinfeld, B. (2007). The soluble wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo. *Cancer Res*, 67(11):5371-9.
51. Delmas, V., Beermann, F., Martinuzzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., et al. (2007). Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev*, 21(22):2923-35.

52. Deng, W., Zhu, Y., Montero, A., & Wu, K. (2003). Quantitative analysis of binding of transcription factor complex to biotinylated DNA probe by a streptavidin-agarose pulldown assay. *Anal Biochem*, 323(1):12-8.
53. Dowejko, A. (2004). Histologische und genetische Untersuchungen zur Funktion von headcase im visuellen System von *Drosophila melanogaster*. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften*. Regensburg.
54. Dowejko, A., Bauer, R., Bauer, K., Müller-Richter, UD., & Reichert, TE. (2012). The human HECA interacts with cyclins and CDKs to antagonize Wnt-mediated proliferation and chemoresistance of head and neck cancer cells. *Exp Cell Res*, 318(5):489-99.
55. Dowejko, A., Bauer, R., Müller-Richter, UD., & Reichert, TE. (2009). The human homolog of the *Drosophila* headcase protein slows down cell division of head and neck cancer cells. *Carcinogenesis*, 30(10):1678-85.
56. Eliasson, M., Olsson, A., Palmcrantz, E., Wiberg, K., Inganäs, M., Guss, B., et al. (1988). Chimeric IgG-binding Receptors Engineered from Staphylococcal Protein A and Streptococcal Protein G. *J Biol Chem*, 263(9):4323-7.
57. Ellwanger, K., Saito, H., Clement-Lacroix, P., Maltry, N., Niedermeyer, J., Lee, W., et al. (2008). Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density. *Mol Cell Biol*, 28(15):4875-82.
58. Gavert, N., & Ben-Ze'ev, A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med*, 14(5):199-209.
59. Giese, K., Cox, J., & Grossscheldt, R. (1992). The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell*, 69(1):185-95.
60. Gillespie, M., Rubinchik, S., Hoel, B., & Sutkowski, N. (2009). Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer: What You Need to Know in 2009. *Curr Treat Options Oncol*, 10(5-6):296-307.
61. Giot, L., Bader, J., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., et al. (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 302(5651):1727-36.
62. Grandis, J., Drenning, S., Zeng, Q., Watkins, S., Melhem, N., Endo, S., et al. (2000). Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(8):4227-32.
63. Haddad, R., & Shin, D. (2008). Recent Advances in Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*, 359(11):1143-54.
64. Hajra, K., Chen, D., & Fearon, E. (2002). The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res*, 62(6):1613-8.
65. Hanahan, D., & Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, (1):57-70.
66. Handeli, S., & Simon, J. (2008). A small-molecule inhibitor of Tcf/ β -catenin signaling down-regulates PPAR γ and PPAR δ activities. *Mol Cancer Ther*, (7): 521.
67. He, X., Semenov, M., Tamai, K., & Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 131(8):1663-77.
68. Heinrich, P., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 374(Pt 1):1-20.
69. Heo, D., Snydermann, C., Gollin, S., Pan, S., Walker, E., Deka, R., et al. (1989). Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res*, 49(18):5167-75.
70. Hoang, B., Moos, M., Vukicevic, S., & Luyten, F. (1996). Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to *Drosophila* frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *J Biol Chem*, 271(42):26131-7.
71. Hoppler, S., & Kavanagh, C. (2007). Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci*, 120(Pt 3):385-93.
72. Hoverter, N., & Waterman, M. (2008). A Wnt-fall for gene regulation: Repression. *Sci. Signal*, 1, pe43.
73. Howng, S., Huang, F., Hwang, S., Lieu, A., Sy, W., Wang, C., et al. (2004). Differential expression and splicing isoform analysis of human Tcf-4 transcription factor in brain tumors. *Int J Oncol*, 25(6):1685-92.
74. Hsieh, J., Kodjabachian, L., Rebbert, M., Rattner, A., Smallwood, P., Samos, C., et al. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*, 398(6726):431-6.
75. Hunter, K., Parkinson, E., & Harrison, P. (2005). Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, 5(2):127-35.
76. Inukai, T., Inoue, A., Kurosawa, H., Goi, K., Shinjyo, T., Ozawa, K., et al. (1999). SLUG, a c-myc-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol Cell*, 4(3):343-52.
77. Ishida, K., Ito, S., Wada, N., Deguchi, H., Hata, T., Hosoda, M., et al. (2007). Nuclear localization of β -catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. *Mol Cancer*, 6:62.
78. Itasaki, N., Jones, C., Mercurio, S., Rowe, A., Domingos, P., Smith, J., et al. (2003). Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signaling. *Development*, 130(18):4295-305.

79. Iwai, S., Katagiri, K., Kong, C., Amekawa, S., Nakazawa, M., & Yura, Y. (2005). Mutations of the APC, beta-catenin, and axin 1 genes and cytoplasmic accumulation of beta-catenin in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131(12):773-82.
80. Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P., & Fuchs, E. (2003). Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature*, 422(6929):317-22.
81. Kahler, R., & Westendorf, J. (2003). Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. *J Biol Chem*, 278(14):11937-44.
82. Kajita, M., McClinic, K., & Wade, P. (2004). Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol*, 24(17):7559-66.
83. Karin, M., & Greten, F. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.*, 5(10):749-59.
84. Katoh, M. (2005). WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol*, (14): 1583–1588.
85. Kim, J., Kim, B., Cai, L., Choi, H., Ohgi, K., Tran, C., et al. (2005). Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature*, 434(7035):921-6.
86. Kimelman, D., & Xu, W. (2006). beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*, 25(57):7482-91.
87. Klaus, A., & Birchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*, 8(5):387-98.
88. Koepp, D. (2010). The replication stress response and the ubiquitin system: a new link in maintaining genomic integrity. *Cell Div.*, 5:8.
89. Kohn, A., & Moon, R. (2005). Wnt and calcium signaling: β -Catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, (38):439–446.
90. Kurien, B., & Scofield, R. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4):283-93.
91. Lambertini, E., Franceschetti, T., Torreggiani, E., Penolazzi, L., Pastore, A., Pelucchi, S., et al. (2010). SLUG: a new target of lymphoid enhancer factor-1 in human osteoblasts. *BMC Mol Biol*, 11:13.
92. Larriba, M., Martín-Villar, E., García, J., Pereira, F., Peña, C., Herreros, A., et al. (2009). Snail2 cooperates with Snail1 in the repression of vitamin D receptor in colon cancer. *Carcinogenesis*, 30(8):1459-68.
93. Leethanakul, C., Patel, V., Gillespie, J., Pallente, M., Ensley, J., Koontongkaew, S., et al. (2000). Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. *Oncogene*, 19 (28):3220–4.
94. Lepourcelet, M., Chen, Y., France, D., Wang, H., Crews, P., Petersen, F., et al. (2004). Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell*, 5(1):91-102.
95. Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., et al. (2005). Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem*, 280(20):19883-7.
96. Licitra, L., Perrone, F., Bossi, P., Suardi, S., Mariani, L., Artusi, R., et al. (2006). High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 24(36):5630-6.
97. Lin, C., Grandis, J., Carey, T., Gollin, S., Whiteside, T., Koch, W., et al. (2007). Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck*, 29(2):163-88.
98. Lin, G., Zhao, L., Yin, F., Lan, R., Li, L., Zhang, X., et al. (2011). TCF3 inhibits F9 embryonal carcinoma growth by the down-regulation of Oct4. *Oncol Rep*, 26(4):893-9.
99. Lindqvist, A., Rodriguez-Bravo, V., & Medema, R. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol.*, 185(2):193-202.
100. List, H., & Walter, K. (2007). Identifizierung und Charakterisierung von DNA Bindeproteinen. In M. Jansohn, *Gentechnische Methoden* (S. 453-457). München: Elsevier.
101. Liu, F., & Millar, S. (2010). Wnt/ β -catenin Signaling in Oral Tissue Development and Disease. *J Dent Res*, 89(4):318-330.
102. Lo Muzio, L., Goteri, G., Capretti, R., Rubini, C., Vinella, A., Fumarulo, R., et al. (2005). Beta-catenin gene analysis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 18(3 Suppl):33-8.
103. Logan, C., & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 20:781–810.
104. Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B., & Baltimore, D. (2004). Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite out- growth. *Cell*, 119(1):97-108.
105. MacDonald, B., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17(1): 9–26.

106. Maeyama, M., Koga, H., Selvendiran, K., Yanagimoto, C., Hanada, S., Taniguchi, E., et al. (2008). Switching in discoid domain receptor expressions in SLUG-induced epithelial-mesenchymal transition. *Cancer*, 113(10):2823-31.
107. Mahomed, F., Altini, M., & Meer, S. (2007). Altered E-cadherin/beta-catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis. *Oral Dis*, 13(4):386–92.
108. Maier, T., Janssen, A., Schmidt, R., Geisslinger, G., & Grösch, S. (2005). Targeting the beta-catenin/APC pathway: a novel mechanism to explain the cyclooxygenase-2-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *FASEB J*, 19(10):1353-5.
109. Makino, N., Yamato, T., Inoue, H., Furukawa, T., Abe, T., Yokoyama, T., et al. (2001). Isolation and characterization of the human gene homologous to the Drosophila headcase (hdc) gene in chromosome bands 6q23-q24, a region of common deletion in human pancreatic cancer. *DNA Seq.*, 11(6):547-53.
110. Malerba, M., Daeffler, L., Rommelaere, J., & Iggo, R. (2003). Replicating parvoviruses that target colon cancer cells. *J Virol*, 77(12):6883-91.
111. Marsit, C., McClean, M., Furniss, C., & Kelsey, K. (2006). Epigenetic inactivation of the SFRP genes is associated with drinking, smoking and HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 119(8):1761–6.
112. Mishra, R. (2010). Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Mol Cancer*, 9:144.
113. Molenaar, M., Van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., et al. (1996). Xtcf-3 Transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in xenopus embryos. *Cell*, 86(3):391-9.
114. Molinolo, A., Amornphimoltham, P., Squarize, C., Castilho, R., Patel, V., & Gutkind, J. (2009). Dysregulated Molecular Networks in Head and Neck Carcinogenesis. *Oral Oncol*, 45(4-5): 324–334.
115. Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Sarrio, D., Peinado, H., Rodríguez-Pinilla, S., Villa, S., et al. (2006). Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 66(19):9543-56.
116. Mori, T., Anazawa, Y., Matsui, K., Fukuda, S., Nakamura, Y., & Arakawa, H. (2002). Cyclin K as a direct transcriptional target of the p53 tumor suppressor. *Neoplasia*, 4(3):268-74.
117. Mukherji, M., Bell, R., Supekova, L., Wang, Y., Orth, A., Batalov, S., et al. (2006). Genome-wide functional analysis of human cell-cycle regulators. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(40):14819-24.
118. Nagayama, S., Fukukawa, C., Katagiri, T., Okamoto, T., Aoyama, T., Oyaizu, N., et al. (2005). Therapeutic potential of antibodies against FZD 10, a cell-surface protein, for synovial sarcomas. *Oncogene*, 24(41):6201-12.
119. Nam, J., Turcotte, T., Smith, P., Choi, S., & Yoon, J. (2006). Mouse Cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J Biol Chem*, 281(19):13247-57.
120. Nguyen, H., Merrill, B., Polak, L., Nikolova, M., Rendl, M., Shaver, T., et al. (2009). Tcf3 and Tcf4 are essential for long-term homeostasis of skin epithelia. *Nat Genet*, 41(10):1068-75.
121. Nieto, M. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(3):155-66.
122. Odajima, T., Sasaki, Y., Tanaka, N., Kato-Mori, Y., Asanuma, H., Ikeda, T., et al. (2005). Abnormal beta-catenin expression in oral cancer with no gene mutation: correlation with expression of cyclin D1 and epidermal growth factor receptor, Ki-67 labeling index, and clinicopathological features. *Hum Pathol*, 36(3):234-41.
123. Olson, L., Tollkuhn, J., Scafoglio, C., Krones, A., Zhang, J., Ohgi, K., et al. (2006). Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination. *Cell*, 125(3):593-605.
124. Orlando, V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci*, 25(3):99-104.
125. Overgaard, J., Kaylan Mohanti, B., Begum, N., Ali, R., Agarwal, J., Kuddu, M., et al. (2010). Five versus six fractions of radiotherapy per week for squamous-cell carcinoma of the head and neck (IAEA-ACC study): a randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol*, (11) 553-560.
126. Pálmer, H., González-Sancho, J., Espada, J., Berciano, M., Puig, I., Baulida, J., et al. (2001). Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol*, 154(2):369-87.
127. Pannone, G., Bufo, P., Santoro, A., Franco, R., Aquino, G., Longo, F., et al. (2010). WNT pathway in oral cancer: epigenetic inactivation of WNT-inhibitors. *Oncol Rep*, 24(4):1035-41.
128. Parkin, D., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55(2):74-108.
129. Patel, V., Hood, B., Molinolo, A., Lee, N., Conrads, T., Braisted, J., et al. (2008). Proteomic analysis of laser-captured paraffin-embedded tissues: a molecular portrait of head and neck cancer progression. *Clin Cancer Res*, 14 (4):1002-1014.
130. Perez-Sayans, M., Somoza-Martin, J., Barros-Angueria, F., Reboiras-López, M., Gándara Rey, J., & García-García, A. (2009). Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review). *Oncology Reports*, 22(6):1277-82.

131. Piepenburg, O., Vorbrüggen, G., & Jäckle, H. (2000). Drosophila segment borders result from unilateral repression of hedgehog activity by wingless signaling. *Mol Cell*, 6(1):203-9.
132. Pinson, K., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B., & Skarnes, W. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signaling in mice. *Nature*, 407(6803):535-8.
133. Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 14(15):1837–51.
134. Polychronopoulos, P., Magiatis, P., Skaltsounis, A., Myrianthopoulos, V., Mikros, E., Tarricone, A., et al. (2004). Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. *J Med Chem*, 47(4):935-46.
135. Potter, C., Turenchalk, G., & Xu, T. (2000). Drosophila in cancer research. An expanding role. *Trends Genet*, 16(1):33-9.
136. Price, M. (2006). CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev*, 20(4):399-410.
137. Reddy, B., Hirose, Y., Lubet, R., Steele, V., Kelloff, G., Paulson, S., et al. (2000). Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res*, 60(2):293-7.
138. Reichart, P. (2003). Orale präkanzeröse Konditionen – eine Übersicht. *Mund Kiefer GesichtsChir*, (7):201–207.
139. Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035):843-50.
140. Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., & Nusse, R. (1987). The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*, 50(4):649-57.
141. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2010). *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends*. 7. Ausgabe, Berlin.
142. Roepman, P., Wessels, L., Kettelarij, N., Kemmeren, P., Miles, A., Lijnzaad, P., et al. (2005). An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nature genetics*, 37(2):182-6.
143. Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., et al. (1998). The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature*, 395(6702):608-12.
144. Ross, C., Ouillette, P., Saddler, C., Shedden, K., & Malek, S. (2007). Comprehensive analysis of copy number and allele status identifies multiple chromosome defects underlying follicular lymphoma pathogenesis. *Clin Cancer Res*, 13(16):4777-85.
145. Schmezer, P., & Plass, C. (2008). Epigenetic aspects in carcinomas of the head and neck. *HNO*, (56):594-602.
146. Schwenzer, N., & Ehrenfeld, M. (2002). *Zahn- Mund- und Kieferheilkunde. Spezielle Chirurgie. Lehrbuch zur Aus- und Weiterbildung* (3. erweiterte und aktualisierte Auflage Ausg., Bd. 2). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
147. Seifert, J., & Mlodzik, M. (2007). Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet*, (8):126–138.
148. Semenov, M., Tamai, K., & He, X. (2005). SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem*, 280(29):26770-5.
149. Semenov, M., Zhang, X., & He, X. (2008). DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. *J Biol Chem*, 283(31):21427-32.
150. Sharili, A., Allen, S., Smith, K., Hargreaves, J., Price, J., & McGonnell, I. (2011). Expression of Snail2 in long bone osteosarcomas correlates with tumour malignancy. *Tumour Biol*, 32(3):515-26.
151. Sherr, C. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell*, 116(2):235-46.
152. Shiina, H., Igawa, M., Breault, J., Ribeiro-Filho, L., Pookot, D., Urakami, S., et al. (2003). The human T-cell factor-4 gene splicing isoforms, Wnt signal pathway, and apoptosis in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 9(6):2121-32.
153. Shioiri, M., Shida, T., Koda, K., Oda, K., Seike, K., Nishimura, M., et al. (2006). Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer*, 94(12):1816-22.
154. Shitashige, M., Hirohashi, S., & Yamada, T. (2008). Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer Sci*, 99(4):631-7.
155. Shulewitz, M., Soloviev, I., Wu, T., Koeppen, H., Polakis, P., & Sakanaka, C. (2006). Repressor roles for TCF-4 and Sfrp1 in Wnt signaling in breast cancer. *Oncogene*, 25(31):4361-9.
156. Smigel, K. (2000). Arthritis drug approved for polyp prevention blazes trail for other prevention trials. *J Natl Cancer Inst*, 92(4):297-9.
157. Smith, L., Lin, M., Brena, R., Lang, J., Schuller, D., Otterson, G., et al. (2006). Epigenetic regulation of the tumor suppressor gene TCF21 on 6q23-q24 in lung and head and neck cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(4):982-7.
158. Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1):76-85.

159. Sogabe, Y., Suzuki, H., Toyota, M., Ogi, K., Imai, T., Nojima, M., et al. (2008). Epigenetic inactivation of SFRP genes in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 32(6):1253-61.
160. Solter, D. (2006). From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet*, 7(4):319-27.
161. Staedeli, R., Hoffmans, R., & Basler, K. (2006). Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr Biol.*, 16(10):R378-85.
162. Stanyon, C., Liu, G., Mangiola, B., Patel, N., Giot, L., Kuang, B., et al. (2004). A Drosophila protein-interaction map centered on cell-cycle regulators. *Genome Biol.*, 5(12):R96.
163. Steneberg, P., Englund, C., Kronhamm, J., Weaver, T., & Samakovlis, C. (1998). Translational readthrough in the hdc mRNA generates a novel branching inhibitor in the drosophila trachea. *Genes Dev*, 12(7):956-67.
164. Su, Y., Fu, C., Ishikawa, S., Kojima, M., Shitoh, K., Schreiber, E., et al. (2008). APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Mol Cell*, 32(5):652-61.
165. Suarez, C., Rodrigo, J., Ferlito, A., Cabanillas, R., Shaha, A., & Rinaldo, A. (2006). Tumours of familial origin in the head and neck. *Oral Oncol*, 42(10):965-78.
166. Sun, P., Xiong, H., Kim, T., Ren, B., & Zhang, Z. (2006). Positive inter-regulation between beta-catenin/T cell factor-4 signaling and endothelin-1 signaling potentiates proliferation and survival of prostate cancer cells. *Mol Pharmacol*, 69(2):520-31.
167. Tam, W., Lim, C., Han, J., Zhang, J., Ang, Y., Ng, H., et al. (2008). T-cell factor 3 regulates embryonic stem cell pluripotency and self-renewal by the transcriptional control of multiple lineage pathways. *Stem Cells*, 26(8):2019-31.
168. Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., et al. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 407(6803):530-5.
169. Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., et al. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell*, 13(1):149-56.
170. Tanaka-Mataatsui, M., Uemura, T., Oda, H., Takeichi, M., & Hayashi, S. (1996). Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in Drosophila trachea regulated by the transcription factor Escargot. *Development*, 122(12):3697-705.
171. Tang, W., Dodge, M., Gundapaneni, D., Michnoff, C., Roth, M., & Lum, L. (2008). A genome-wide RNAi screen for Wnt/beta-catenin pathway components identifies unexpected roles for TCF transcription factors in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, (105) 9697-9702.
172. Tang, Y., Liang, X., Zhu, G., Zheng, M., Yang, J., & Chen, Y. (2010). Expression and importance of zinc-finger transcription factor Slug in adenoid cystic carcinoma of salivary gland. *J Oral Pathol Med*, 39(10):775-80.
173. Tatusov, R., Koonin, E., & Lipman, D. (1997). A genomic perspective on protein families. *Science*, 278(5338):631-7.
174. Theisen, H., Syed, A., Nguyen, B., Lukacsovich, T., Purcell, J., Srivastava, G., et al. (2007). Wingless directly represses DPP morphogen expression via an armadillo/TCF/ Brinker complex. *PLoS ONE*, 2(1):e142.
175. Tsedensodnom, O., Koga, H., Rosenberg, S., Nambotin, S., Carroll, J., Wands, J., et al. (2011). Identification of T-cell factor-4 isoforms that contribute to the malignant phenotype of hepatocellular carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 317(7):920-31.
176. Tseng, R., Lee, S., Hsu, H., Chen, B., Tsai, W., Tzao, C., et al. (2010). SLIT2 attenuation during lung cancer progression deregulates beta-catenin and E-cadherin and associates with poor prognosis. *Cancer Res*, 70(2):543-51.
177. Turner, F., Broad, S., Khanim, F., Jeanes, A., Talma, S., Hughes, S., et al. (2006). Slug regulates integrin expression and cell proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*, 281(30):21321-31.
178. Uchikado, Y., Okumura, H., Ishigami, S., Setoyama, T., Matsumoto, M., Owaki, T., et al. (2011). Increased Slug and decreased E-cadherin expression is related to poor prognosis in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*, 14(1):41-9.
179. Ueda, G., Sunakawa, H., Nakamori, K., Shinya, T., Tsuhako, W., Tamura, Y., et al. (2006). Aberrant expression of beta- and gamma-catenin is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 35(4):356-61.
180. van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., et al. (1997). Armadillo co-activates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell*, 88(6):789-99.
181. Veres, G., Gibbs, R., Scherer, S., & Caskey, C. (1987). The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science*, 237(4813):415-7.
182. Wallingford, J., & Habas, R. (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development*, 132(20):4421-36.
183. Wang, D., & Lippard, S. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*, (4):307-20.
184. Wang, K., Zhang, Y., Li, X., Chen, L., Wang, H., Wu, J., et al. (2008). Characterization of the Kremen-binding site on Dkk1 and elucidation of the role of Kremen in Dkk-mediated Wnt antagonism. *J Biol Chem*, 283(34):23371-5.

185. Warnakulasuriya, S. (2002). Areca nut use following migration and its consequences. *Addict Biol*, (7):127–32.
186. Weaver, T., & White, R. (1995). headcase, an imaginal specific gene required for adult morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 121(12):4149–60.
187. Wei, Q., Yokota, C., Semenov, M., Doble, B., Woodgett, J., & He, X. (2007). R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-catenin signaling. *J Biol Chem*, 282(21):15903–11.
188. Weinmann, A., & Farnham, P. (2002). Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods*, 26(1):37–47.
189. Weise, A., Bruser, K., Elfert, S., Wallmen, B., Wittel, Y., Wöhrle, S., et al. (2010). Alternative splicing of Tcf7l2 transcripts generates protein variants with differential promoter-binding and transcriptional activation properties at Wnt/b-catenin targets. *Nucleic Acids Res.*, 38(6):1964–81.
190. Willert, K., & Jones, K. (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev.*, 20(11):1394–404.
191. Wong, K., Tsang, Y., Chang, Y., Su, J., Di Francesco, A., Meco, D., et al. (2006). Genome-wide allelic imbalance analysis of pediatric gliomas by single nucleotide polymorphic allele array. *Cancer Res.*, 66(23):11172–8.
192. Worsham, M., Chen, K., Meduri, V., Nygren, A., Errami, A., Schouten, J., et al. (2006). Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 132(6):668–77.
193. Wu, K. (2006). Analysis of protein-DNA binding by streptavidin-agarose pulldown. *Methods Mol Biol*, 338:281–90.
194. Xu, Q., Wang, Y., Dabdoub, A., Smallwood, P., Williams, J., Woods, C., et al. (2004). Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell*, 116(6):883–95.
195. Yang, H., Menon, L., Black, P., Carroll, R., & Johnson, M. (2010). SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas. *BMC Cancer*, 10:301.
196. Yi, F., Pereira, L., & Merrill, B. (2008). Tcf3 functions as a steady-state limiter of transcriptional programs of mouse embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*, 26(8):1951–60.
197. You, L., He, B., Xu, Z., Uematsu, K., Mazieres, J., Fujii, N., et al. (2004). An anti-Wnt-2 monoclonal antibody induces apoptosis in malignant melanoma cells and inhibits tumor growth. *Cancer Res*, 64(15):5385–9.
198. Yu, D., Zhao, R., Hsu, E., Cayer, J., Ye, F., Guo, Y., et al. (2010). Cyclin-dependent kinase 9-cyclin K functions in the replication stress response. *EMBO Rep.*, 11(11):876–82.
199. Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., et al. (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development*, 135(2):367–75.
200. Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., et al. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*, 438(7069):873–7.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungen

Abb. 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten in Deutschland 1980 – 2006, ICD-10 C00–14 Fälle pro 100.000 (Europastandard) (RKI 2010)	3
Abb. 2: Modell der genomischen Instabilität und Progression bei OSCC	6
Abb. 3: Übersicht über Wnt-Agonisten und-Antagonisten	8
Abb. 4: Vereinfachter Überblick über den kanonischen Wnt-Signalweg	10
Abb. 5: Mechanismen der Genregulation durch TCF/LEF-Komplexe	12
Abb. 6: Prinzip der Chromatin-Immunpräzipitation	36
Abb. 7: Isolation der spezifischen Immunkomplexe mittels Protein G-Magnetic-Beads	41
Abb. 8: RT-qPCR Amplifikationskurve (Beispielbild eines eigenen Versuches)	44
Abb. 9: gelelektrophoretische Auftrennung der PCI 13-cDNA-PCR-Produkte	49
Abb. 10: gelelektrophoretische Auftrennung der HOK-cDNA-PCR-Produkte	50
Abb. 11: Immunoblot-Analyse der PCI 13 Zelllinie	51
Abb. 12: Immunoblot-Analyse der HOK-Zelllinie	53

8.2 Tabellen

Tabelle 1: Template-Primer Mastermix (13 µl)	25
Tabelle 2: Reverse-Transkriptase Reaktionsansatz (7 µl)	25
Tabelle 3: RT-PCR Programm	25
Tabelle 4: PCR-Reaktionsansatz	26
Tabelle 5: Verwendete Primer der PCR-Versuche	26
Tabelle 6: PCR-Programm	26
Tabelle 7: Verwendete Pufferlösungen im Verlauf des Immunoblots	31
Tabelle 8: Zusammensetzung eines 10% Trenngels	32
Tabelle 9: Zusammensetzung des 10% Sammelgels	32
Tabelle 10: Spezifische Primärantikörper	34
Tabelle 11: Sekundärantikörper	35
Tabelle 12: Im Rahmen der CoIP verwendete Antikörper	40
Tabelle 13: Lightcycler Reaktionsansatz (20 µl)	45
Tabelle 14: Verwendete Primer im Rahmen von RT-qPCR Versuchen	45
Tabelle 15: Verwendete UPL-Sonden und zugehörige Primerpaare	46
Tabelle 16: Light-Cycler Reaktionsprotokoll	46
Tabelle 17: Sybr Green I Reaktionsstammlösung (1ml)	47
Tabelle 18: Sybr Green I Reaktionsansatz je Well (20 µl)	47
Tabelle 19: Sybr Green I Reaktionsprotokoll	47

8.3 Diagramme

Diagramm 1: Densitometrische Analyse des PCI 13 Immunoblots	52
Diagramm 2: Densitometrische Auswertung des HOK-Immunoblots	54
Diagramm 3: Vergleichende Proteinkonzentrationsanalyse zwischen PCI 13 und HOK.....	55
Diagramm 4: Analyse eines Chip-Assays unbehandelter PCI 13-Zellen anhand RT-qPCR mit UPL-Sonden.....	57
Diagramm 5: Analyse eines Chip-Assays unbehandelter PCI 13-Zellen anhand RT-qPCR mit Sybr Green	58
Diagramm 6: RT-qPCR-Analyse eines Chip-Assays mit BIO vorbehandelter PCI 13-Zellen	59
Diagramm 7: RT-qPCR-Analyse eines Chip-Assays mit FH535 vorbehandelter PCI 13-Zellen.....	60
Diagramm 8: RT-qPCR-Analyse eines Chip-Assays mit unbehandelten HOK-Zellen	61

9. Anhang

9.1 Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller	Ort/Land	Art
586 Basic AFC	Heraeus	Hanau, D	Gefriertruhe bis -80° C
Agagel Midi Wide	Biometra	Göttingen, d	Gelkammer
Axiovert 25	Carl Zeiss	Jena, D	Mikroskop
Centrifuge 5415 R	Eppendorf	Hamburg, D	Zentrifuge
CKX 41	Olympus	Tokyo, J	Mikroskop
Hera Cell	Heraeus	Hanau, D	CO2-Inkubator
Hera Safe	Heraeus	Hanau, D	Sterilbank
Hypercassette	Amersham Biosciences	Little Chalfont, UK	Westernblotfilmkassette
Intas Geldokumentationssystem	Intas	Göttingen, D	Gelauswertungssystem
LC Carousel Centrifuge 2.0	Roche	Mannheim, D	Zentrifuge
Light Cycler 2.0	Roche	Mannheim, D	Q-PCR Maschine
Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad	München, D	Blotting System
Mini Spin	Eppendorf	Hamburg, D	Zentrifuge
Multifuge 3 S-R	Heraeus	Hanau, D	Zentrifuge
Mx3005 P	Stratagene	Oberhaching, D	Q-PCR Maschine
Magnetic Separation Rack	Merck	Darmstadt, D	Magnetische Trennvorrichtung
Peltier Thermal Cycler PTC-200	Bio-Rad	Hercules, CA, USA	PCR-Gerät
Picodrop Microlitre V. 2.08	Picodrop	Saffron Walden, UK	Spektrophotometriesystem
Pipetman	Gilson	Middelton, WI, USA	Pipetten versch. Größen
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, D	Akkubetriebene Pipetierhilfe
Privileg 8022 L	Electrolux	Nürnberg, D	Microwelle
Privileg Super Energie Spar	Electrolux	Nürnberg, D	Kühl-/Gefrierkombination bis -20° C
RCT basic	IKA-Werke	Staufen, D	Magnetrührsystem

Rotationsmischer	Kisker Biotech	Steinfurt, D	Rotationsmischer
Rotina 35 R	Hettich	Tuttlingen, D	Zentrifuge
Sono Plus	Bandelin	Berlin, D	Ultraschallzertrümmergerät
Standard Power Pack P 25	Biometra	Göttingen, D	Spannungsquelle Gelelektrophorese
TE 2101	Sartorius	Göttingen, D	Feinwaage
TECAN	Genios	Männedorf, CH	Photometer
Thermomixer Comfort 5355	Eppendorf	Hamburg, D	Thermomixer
Vortex-Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, NY, USA	Vortexgerät

9.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller	Ort/Land	Art
BD Falcon 15 ml High Clarity Polypropylene Conical Tube	Becton Dickinson Labware	Bedford, MA, USA	15 ml Röhrchen
BD Falcon Cell Scraper	Becton Dickinson Labware	Bedford, MA, USA	Zellschaber
Blue Max 50ml Polypropylene Conical Tube	Becton Dickinson Labware	Bedford, MA, USA	50 ml Röhrchen
Corning Flask	Corning Inc.	Corning, NY, USA	75 cm ² Zellkulturflasche
Costar Stripette	Corning Inc.	Corning, NY, USA	Pipetten versch. Größen
Diamond Tips	Gilson	Middletown, WI, USA	Pipetierspitzen versch. Größen
DNA Purification Columns	New England Biolabs	Frankfurt a. M., D	DNA Aufreinigungssäulen
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg, D	Cups versch. Größen
MICROTEST Zellkulturplatte	Becton Dickinson Labware	Bedford, MA, USA	96 Well Zellkulturplatte
P10 UVpette	Biozym Scientific	Oldendorf, D	UV Pipettenspitzen für Picodrop
Quali-PCR-Platten	Kisker Biotech	Steinfurt, D	96 Well Q-PCR Platte
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare	Little Chalfont, UK	Westernblotfilm

9.3 Chemikalien und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller	Ort/Land
10.000x Sybr Green I	Sigma Aldrich Chemie	München, D
100 mM dNTP Mix	Amersham Biosciences	Little Chalfont, UK
10x Reaction Buffer Y	Peqlab Biotechnologie	Erlangen, D
16% (w/v) Formaldehyd Solution	Thermo Fisher Scientific	Rockford, IL, USA
2-Propanol	Sigma	St. Louis, MO, USA
5x GoTaq Green Reaction Buffer	Promega	Madison, WI, USA
6x Loading Dye Solution	Fermentas	St. Leon-Rot, D
Ammonium Persulfate (APS)	Serva	Heidelberg, D
Anti- β -Catenin	BD Biosciences	Bedford, MA, USA
BCA Solution	Merck	Darmstadt, D
BIO ((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxim)	Sigma Aldrich Chemie	München, D
Cupric Sulfate 4%	Merck	Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie	München, D
dNTP Set 10 mM	Fermentas	St. Leon-Rot, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Pan Biotech	Aidenbach, D
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories	Pasching, AUT
Ethidiumbromid 10mg/ml	Sigma Aldrich Chemie	München, D
Fetal Bovine Serum	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
FH535 (N-(2-Methyl-4-nitro)-2,4-dichlorosulfonamid)	Merck	Darmstadt, D
GoTaq DNA Polymerase	Promega	Madison, WI, USA
Hot Taq DNA Polymerase	Peqlab Biotechnologie	Erlangen, D
L-Glutamin	Biochrom	Berlin, D
LEF1 (C12A5) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Oral Keratinocyte Growth Supplement	ScienCell	Carlsbad, CA, USA
Oral Keratinocyte Medium	ScienCell	Carlsbad, CA, USA
Pen/Strep Solution	PromoCell	Heidelberg, D
Penicillin/Streptomycin Solution	ScienCell	Carlsbad, CA, USA
Phenylmethanesulfonylfluorid Solution (PMSF)	Sigma Aldrich Chemie	München, D
Poly-L-Lysin 1 mg/ml	ScienCell	Carlsbad, CA, USA
Poly-L-Lysin 10 mg/ml	ScienCell	Carlsbad, CA, USA
Quick-Load 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs	Frankfurt a.M., D
RIPA Buffer Set	Roche	Mannheim, D
RNase free DNase Set	Qiagen	Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, D
Roti Load 1 (4x)	Carl-Roth GmbH	Karlsruhe, D

Roti®-Lumin	Carl-Roth GmbH	Karlsruhe, D
Rotiphorese 50x TAE Buffer	Carl-Roth GmbH	Karlsruhe, D
Rotiphorese Gel 40	Carl-Roth GmbH	Karlsruhe, D
SeaKem LE Agarose	Biozym Scientific	Oldendorf, D
See Blue Plus 2 Prestained Standard	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)	New England Biolabs	Frankfurt a.M., D
SLUG Rb p Ab (ab27568-100)	Abcam	Cambridge, UK
Sodium Dodecyl Sulfate Solution (SDS)	Sigma	St. Louis, MO, USA
Stabilized Goat Anti-Mouse IgG (32430)	Thermo Scientific	Rockford, IL, USA
Stabilized Goat Anti-Rabbit IgG (32460)	Thermo Scientific	Rockford, IL, USA
Stratagene β -Mercaptoethanol	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
TaqMan-Mastermix	Roche	Mannheim, D
TCF1 (C63D9) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
TCF3 (D15G11) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
TCF4 (C48H11) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma	St. Louis, MO, USA
TNS	ScienCell	Carlsbad, CA, USA
Transscriptor first stand cDNA-synthesis kit	Roche	Mannheim, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck	Darmstadt, D
Trypsin-EDTA (0,05%/0,02%)	Biochrom	Berlin, D
Tween 20	Sigma	St. Louis, MO, USA
Water (Molecular Biology Reagent, DNase/RNase free)	Sigma Aldrich Chemie	München, D
β -Actin Antibody (ab8227) polyklonal (Kaninchen)	Abcam	Cambridge, UK

9.4 Primerbindungsstellen

```

GGCAGGGAACCTAAGGGCGTTTCACCCCACTTCCTAAACTAAATTGAAAGGAAAACCCTA
ACTTTCCACACCTGAGTAACAAAAGGACCAGAAGCTGCTCCCTTTGCAAACCCTCACCTT
TTCTGCGTGGCAGATGGGAAACTGGCTGTCAGCAACCAATGAGACTGATTGCGGGTGGAG
TCTTTGCATAGAAGTGCAACTTTGTAACTTCACCTTAGCCTCTGATTGGTTGCTTTTTTAA
ACAGAAGTGTGCAAAAAGTGTGATTGCACAGAAGTGTGACCTTTGTAACTCCACTTCAG
CCTCTGATTGGTTGACGAAAGCAACCAATCAGACTAATTGTGCGTCACCACTTCATTTAC
ATGAGAAACCTCCAGGGGGTATTTGGACCTCAGAAGATTCTGCATCCGGAACCTTGAGCC
ACCGCTGGGGCCGCTTCCATACTGTGGAGTGTACTTTCATTCTCAATAAATCCCTGCTTT
CTTCTTTTCTTGCTTTGCTGGGCGTTTGGTCCAATTGTTTGTTCAAAATGCCAAGAACCT
GGACGACTTGCAGTCAAGACCCCTCTAATGGTAACAACAACACCGTGACAGAGCTTTTACT
AAAGGGCTGAATTAAGATTACACTATAAAAGGGGAACACTGTAAAGCTGTCAGCTAAAC
TAGTCTTTTCTCCACAGTTCGTGAGGAAGGAACCTAATTTATACATTCAACAAATTTATG
CCAGCTGTTCTCTGATGTGCCAAGGCAGATAAAATCTATCCATGGAGGTTTCATTTTACAG
TGAGAGGGGAGATATACAAGAAATAAGTAAACACCTACATTGCCAACATAATTAGAGATGG
AGGAGGAAAATAACAGGGTGGAACCTCTGACAGCTCTCCTGGGAAGGTCTCTGTGGAAGT
GATGTATTTGAGCTGAGACCTGAAGGAAGGGAAGGAGTTGGCCGAAAAGGTAGAATAGAA
TTGCAGAAAAGAGATCAAGGGGAGCTCTTCCCAGGGGTCCCCTGCCCTCATATTGCCTGTC
TTCACTGGTGTACCTAATCTCCTACTGCTCATAACCTGGCTACCTATCTTTCACTATCT
TTCAGGACAACCTCAGCCCTATGCATAGGGATGGGTTCCCCCCAAGCAGGGACTGCTTCAG
AGTCCAGGCAACATCTAGTTACATCCCTGGATGATGGGTCTTGTTTGAGTGAATTGTTTT
CACCACCAGACTGTGAAGGCTTCCCATTACAGGACCTGGTGTTCATCCCCATTGTCTGGG
AACTCTACCCTGTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCT
CGCTCTGTTGCTCAAGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCTCGGATCCCAGGTTCAAGTGATT
CTCCTGCCTCAGCTTCCCGAGTTTCTGGGACTACAGGCGCACGCCACCACGCCCAGCTAA
TTTTTTTTTTGTATTTTGTAGAGACAGGGTTTACCACGTTGGCCAGGATGGTCTCGAT
CTCTTGACCTCGTGATACACCCGCCCTCGGCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCATAAG
CCACCGCGCCCCGGTCCCCTGTTTCTTTAATTACTGTTACTGAAAGGCATAGCCTTTGAAT
GAGTTATTAATCCAAAATCTTTTGTTTTCCATTCTTGCTCTAGTCACAGCTTATTTTCC
AGACCATACTGTTCTAAGCCTCAATTACATTAAGGCCAGGAGGCCACCGAAGAACTCCAC
ATGCCACTGCACTGGCGGGTGGAGCAAGTCAAGCAGGGCAGCTCATGAACGCCCGGGAGT
CCAGGAGGCCCCGGGTGGGGACGCCTGGATGACGTCACCTCGAGGTGGGCAGGCCCCGCGC
GGGCGTGACGTCACGCGGGCGGTCCCGTCAGCCGTGAGGTCACCTGGTGGGCGCGGCCAG
GCCGAATCCCCAGTGTCGTCACGGGAGGGGGCGGGCCAGAGCGTGTCAGTGCAGCCGAA
TCAAAACAAGCCGGAGACCC

```

Abb. 13: Primerbindungsstellen am HECA-Promotor

Dargestellt ist die Basensequenz der HECA-Promotorregion 5'-upstream des Startcodons des HECA-Gens (ca. 2500 bp). Die farbig-markierten Bereiche zeigen die jeweiligen Bindungsstellen der verwendeten Primer **HECA 1**, **HECA 2** und **HECA 3**

9.5 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Nach-/ Vorname: Watzinger, Ulrich
 Geburtsdatum: 12. März 1983
 Geburtsort: Aichach
 Wohnort: Am Backofenwall 13, 86153 Augsburg
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig
 Eltern: Dr. med. Paul Watzinger, Ärztlicher Direktor des
 Kreiskrankenhauses Aichach
 Isolde Watzinger (geb. Merk), medizinisch-technische
 Assistentin

Schul-/ Ausbildung:

Sept. 1989-Juli 1993: Besuch der Grundschule Derching
 Sept. 1993-Juni 2002: Besuch des Gymnasiums bei St. Anna, Augsburg
 Juni 2002: Abiturprüfung
 Okt. 2002-Juli 2003: Zivildienst beim BRK Rettungsdienst Aichach
 Sept. 2003-Juli 2005: Ausbildung zum Bankkaufmann bei der Bayerischen Hypo- und
 Vereinsbank AG (Unicredit Group)
 Okt. 2005-Nov. 2010: Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg
 Sept. 2006: Naturwissenschaftliche Vorprüfung
 April 2008: Zahnärztliche Vorprüfung
 Nov. 2010: Zahnärztliche Prüfung
 Seit Mai 2011: Tätigkeit in freier zahnärztlicher Praxis als
 Vorbereitungsassistent

9.6 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert und Herrn Dr. Albert Dowejko für die freundliche Überlassung des Themas, den Zeitaufwand und die engagierte Betreuung der Arbeit.

Gleichermaßen möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Richard Bauer, Frau Karin Bauer und Frau MTA Brigitte Hauer für die tatkräftige Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Nicht zu Letzt danke ich meinen Eltern für alles, was sie mir ermöglicht haben.