

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie
(Direktorin: Prof. Dr. med. P. Ambrosch)
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel

**Repression der humanen Galaktocerebrosidase Genexpression in
Plattenepithelkarzinomzellen des Larynx**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
MATTHIAS SEIWERTS

aus Buchholz

Kiel, 2011

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Görögh
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Gläser
Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2011
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 21.03.2011

gez.

Prof. Dr. Dr. Cascorbi (Vorsitzender des Ausschusses
für Promotion)

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
2. Fragestellung	3
3. Material und Methoden	4
3.1 Zellkulturen	4
3.1.1 Etablierung und Kultivierung von Keratinozyten	4
3.1.2 Subkultivierung von Larynxkarzinomzelllinien	6
3.2 Isolierung der Gesamt-RNS	6
3.3 Photometrische Bestimmung der RNS-Konzentration	7
3.4 Reverse Transkription der mRNS-Proben in cDNS	7
3.5 Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR)	8
3.5.1 PCR mit radioaktiv markiertem Substrat	8
3.5.2 Aufbreitung der PCR-Produkte	9
3.5.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie	9
3.5.4 Vergleich des Bandenmusters der cDNS-Fragmente von Keratinozyten und Larynxkarzinomzelllinien	10
3.6 Reamplifikation differentiell exprimierter Genfragmente	10
3.6.1 Isolierung differentiell exprimierter Genfragmente	10
3.6.2 PCR-Protokoll zur Reamplifikation differentiell exprimierter Fragmente	11
3.6.3 Aufreinigung der PCR-Produkte	11
3.6.4 PAA-Gelelektrophorese und Silbernitratfärbung	12
3.7 Klonierung des differentiell exprimierten Fragmentes	12
3.7.1 Ligation und Transformation	13
3.7.2 Kultivierung der Bakterien und Selektion	13
3.7.3 Plasmidextraktion	14
3.7.4 Kontrolle der Klonierung durch Restriktionsanalyse	15
3.8 Hoch stringente PCR mit sequenzspezifischen Primern	15
3.9 Sequenzierung und Datenbankvergleich	16
3.10 DNS-RNS-Hybridisierung	16
3.10.1 Markierungsreaktion	16

3.10.2	Northern Blotting	17
3.10.3	Hybridisierungs-Reaktion	17
3.10.4	Detektion	17
3.10.5	Densitrometrische Auswertung	18
4.	Ergebnisse	19
4.1	Analyse des mRNS-Musters	19
4.1.1	Identifizierung und Isolierung eines differentiell exprimierten mRNS-Fragmentes	19
4.1.2	Reamplifikation des differentiell exprimierten Fragmentes	21
4.2	Sequenzanalyse und Datenbankvergleich	22
4.2.1	Klonierung des differentiell exprimierten Fragmentes	22
4.2.2	Bestimmung der Basensequenz und Genbankrecherche	23
4.3	Reproduzierbarkeit des differentiell exprimierten Fragmentes	24
4.3.1	Hoch stringente PCR mit sequenzspezifischen Primern	24
4.4	Nachweis und Quantifizierung der Repression der GALC-mRNS	26
4.4.1	Northern-Hybridisierung	26
5.	Diskussion	28
5.1	Charakterisierung der Genexpression mittels DDRT-PCR	28
5.2	Reproduzierbarkeit differentiell exprimierter Genfragmente	28
5.3	Bedeutung des Enzyms Galactocerebrosidase (GALC)	29
5.4	Bekannt pathophysiologische Zusammenhänge der GALC	29
5.5	Ursachen einer veränderten GALC-Genexpression	30
5.5.1	Struktur des Promotors und die Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der Genregulation	30
5.5.2	Mutagenese und DNS-Metylierung des GALC-Gens	31
5.6	Mögliche Implikationen des GALC-Katabolismus zum Tumorgeschehen	32
5.6.1	Das Substrat: Galaktosylceramid (GalCer)	32
5.6.2	Das katabole Produkt: Ceramide	34
5.6.3	Galactocerebrosid Synthase (GalCS)	36
5.6.4	Sphingolipid Aktivator Proteine (Saposine)	36
5.7	Beziehung des GALC Katabolismus zur Regulation der Ca ²⁺ -Homöostase	37

6. Zusammenfassung	39
7. Literaturverzeichnis	41
8. Lebenslauf	57
9. Publikationen	58

ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DDRT-PCR	Differential Display Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
DIG	Digoxigenin
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GALC	Galaktocerebrosidase
GalCer	Galaktosylceramid / Galaktocerebrosid
GaLCS	Galaktosylceramid Synthase
GLD	Globoidzellen-Leukodystrophie
GSL	Glykosphingolipide
KB	Kilobasen
MEM	Minimum Essential Medium
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat Buffered Saline
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
SDS	Sodiumdodecyl Sulphate
SSC	Sodiumsalt Citrate
SCC	Squamous cell carcinoma
TBE	Tris-Borsäure Ethylendiamin-Tetraessigsäure
TEMED	Tetramethyl-Ethylendiamin
UMSCC	University of Michigan Squamous Cell Carcinoma
UTSCC	University of Turku Squamous Cell Carcinoma
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galactopyranosid
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

1. Einleitung

Bösartige Karzinome des Kopf-Halsbereiches - in nahezu 90 % handelt es sich hier um Plattenepithelkarzinome (Batsakis 1979) - machen weltweit einen Anteil von etwa 6 % aller Krebserkrankungen aus (Parkin et al., 1988; Johnson 2001). Die Prognose der betroffenen Patienten wird vor allem von dem Tumorstadium bei Diagnosestellung bestimmt. Es versterben etwa 30 % dieser Patienten an ihrer Tumorerkrankung (Blitzer 1988). Tabak und Alkohol gelten als gesicherte ätiologische Faktoren (Franceschi et al., 1994; Spitz 1994). Des Weiteren wird für bestimmte Fälle auch eine virale Genese im Zusammenhang mit dem Humanen Papillomvirus diskutiert (Gissmann 1984; McKaig et al., 1998).

Die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich ist ein vielschichtiger Prozess. Die Zellen der gesunden Schleimhaut wandeln sich dabei in Tumorzellen mit allen Malignitätskriterien um. Diese Transformation geht mit umfangreichen genetischen Veränderungen einher (Williams 2000). Der Nachweis von Veränderungen im Genexpressionsstatus und den darauf folgenden Konsequenzen für den Zellstoffwechsel könnte wichtige Hinweise zur weiteren Charakterisierung und Verständnis von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich beitragen und somit den Zugang zu noch zuverlässigerer Diagnostik, Einschätzung der Prognose und der Entwicklung neuer Therapie- und Präventionsmethoden gewährleisten.

Das Verständnis bösartiger Erkrankungen hat in den letzten Jahren rapide zugenommen. Ein großer Teil hiervon wird in der heutigen Onkologie durch die Untersuchung des Krebsgeschehens auf molekularbiologischer Ebene geleistet. Eine besondere Rolle spielt dabei die umfangreiche Analyse der Genexpression. Die Auswahl der exprimierten Gene entscheidet über sämtliche Prozesse des Lebens (Liang et al., 2003). Sie ist verantwortlich für den gesamten Umfang des Zellstoffwechsels, der Zelldifferenzierung, der Zellkommunikation sowie Zellalterung und des programmierten Zelltodes. Für eine Vielzahl von Genen, verantwortlich für nukleäre und zytoplasmatische Stoffwechselprozesse, wurde bereits ihre wichtige Rolle bei der malignen Transformation bewiesen (Bron et al., 1995; Anwar et al., 1993; Sommers et al., 1990; Lane 1992). Darüber hinaus liegt bei maligne transformierten Zellen häufig ein veränderter Genexpressionsstatus oder eine Expression von veränderten Genen vor (Kalikin et al., 2000; Manda et al., 1999; Cole et al., 1998; Ozaki et al., 1998).

Die Analyse der Genexpression der Krebszellen findet mittels Isolierung und Bestimmung der direkten Gentranskripte im Zellstoffwechsel, der mRNA statt. Deren quantitative und qualitative Bestimmung im Vergleich mit den Transkripten gesunder Zellen ermöglicht direkte Rückschlüsse auf den Stoffwechsel der Krebszellen und die Identifikation tumorspezifischer Gene.

Die Identifikation der Transkripte erfolgte in der Vergangenheit vielfach durch subtraktive (Steege et al., 1988; Basset et al., 1990; Lee et al., 1991) oder differentielle (St. John et al., 1979; Zimmermann et al., 1980) Hybridisierungsmethoden. Jedoch sind diese kompliziert im Aufbau, nicht reproduzierbar und erfordern eine große Menge an RNA (Liang et al., 1993). 1992 wurde von Liang und Pardee (Liang et al., 1992) als auch von Welsh (Welsh et al., 1992) die Technik des Differential Display, auch *RNA based arbitrarily primed PCR* genannt, entwickelt, um die Identifikation von differentiell exprimierten Fragmenten zu verbessern und zu beschleunigen. Diese Technik wurde anschließend verfeinert dann als *differential display reverse transcription PCR* (DDRT-PCR) (Bauer et al., 1993) bezeichnet.

Mit Hilfe der DDRT-PCR wurde selektiv exprimierte mRNA in verschiedenen Organismen (Ralp et al., 1993; McClelland et al., 1993; Wong et al., 1994) und menschlichen Tumoren nachgewiesen (Liang et al., 1992; Liang et al., 1993; Bauer et al., 1993; Liang et al., 1994; Bauer et al., 1994; Rohde et al., 1997; Görögh et al., 1997). Die Verwendbarkeit der isolierten Fragmente zum Nachweis und zur Isolierung kompletter mRNA und cDNA bewirkte einen zunehmenden Einsatz dieser Methode in der schnellen Analyse von selektiv exprimierten Genen, die bei der Pathogenese von verschiedenen Krankheiten beteiligt sind.

Die ersten Berichte über Differential Display und Identifizierung differentiell exprimierter Gene in Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes sind von Werner, Görögh und Gottschlich (Werner et al., 1997; Görögh et al., 1997; und Gottschlich et al., 1997) in einer Untersuchungsreihe verfasst worden. Ausgehend von diesen Grundlagen wurde in dieser Arbeit mittels der mRNA DDRT-PCR die Veränderungen der Genexpression in etablierten Plattenepithelkarzinomzelllinien (SCC) des Larynx im Vergleich mit normalen Keratinozytenzelllinien untersucht. Beim Vergleich der Bandenmuster revers transkribierter mRNA wurde eine veränderte Expression eines Genfragmentes in den Plattenepithelkarzinomzellen nachgewiesen.

2. Fragestellung

Das Thema dieser Arbeit ist die Analyse der differentiellen mRNA Expression in Larynxkarzinomzelllinien im Vergleich zu ihrem gesunden Phänotyp mittels DDRT-PCR und die Charakterisierung nachgewiesener differentiell exprimierter Fragmente.

1. Besteht mittels der DDRT-PCR-Methode die Möglichkeit einer Charakterisierung des Expressionsverhaltens von Keratinozyten und Larynxkarzinomzellen im Vergleich?
2. Läßt sich ein differentiell exprimiertes Genfragment reproduzierbar nachweisen?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen der veränderten Expression des nachgewiesenen Fragmentes in Plattenepithelkarzinomzellen und generellen Signal- und Stoffwechselmechanismen in der Karzinogenese?

3. Material und Methoden

3.1 Zellkulturen

Sämtliche Zellkulturen dieser Untersuchung sind aus menschlichen Spendermaterial/Biopsaten etabliert worden. Die untersuchten Larynxkarzinomzelllinien stammten aus zwei etablierten Plattenepithelkarzinomzellreihen, UMSCC-10A (*University of Michigan Squamous Cell Carcinoma*) von Carey und Mitarbeitern (1994) und UTSCC-19A (*University of Turku Squamous Cell Carcinoma*) von Liisa und Mitarbeitern (1995). Beide Plattenepithelkarzinomzelllinien entstammen Primärtumoren, die zum Zeitpunkt der Materialentnahme für die Kultivierung weder radio- noch chemotherapeutisch vorbehandelt worden waren.

Die verwendeten Keratinozytenzelllinien wurden in der HNO-Klinik in Kiel aus gesundem Spendermaterial gewonnen und nach der Methode von Saffran und Mitarbeitern (1997) etabliert und fortlaufend nummeriert. Aus primären Keratinozytenkulturen und Subkulturen der Plattenepithelkarzinomzelllinien konnte die für die Untersuchung benötigte mRNA gewonnen werden.

3.1.1 Etablierung und Kultivierung von Keratinozyten

Die Gewebeproben zur Etablierung und Kultivierung der Keratinozyten wurden während Routineeingriffen im Bereich des Nasen-Rachenraumes, die in der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität Schleswig-Holstein durchgeführt wurden, entnommen. Die an den Keratinozytenkulturen vorgenommenen Untersuchungen fanden mit Einverständnis der Patienten statt, entsprechend einer von der Ethikkommission der Kieler Universität für Studien an entnommenen Schleimhaut- und Karzinomproben empfohlener mündlicher und schriftlicher Patientenaufklärung.

Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte unter keimreduzierten Bedingungen durch sorgfältige Spülung der Mundhöhle und Abtupfen des Gewebes mit Polyvidonlösung. Unmittelbar nach der Exzision wurde das Gewebe in steriles Transportmedium überführt, bestehend aus Minimal Essential Medium (MEM; Seromed Biochrom KG, Berlin) supplementiert mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS), 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin, 250 µg/ml Amphotericin B (alle Supplements von Seromed

Biochrom KG, Berlin) sowie 5 ng/ml Mykoplasma Removal Agent (MRA) (ICN Biomedicals, Meckenheim)

Die Schleimhautbiopsate wurden dann im Zellkulturlabor unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank (Laminar Air Flow Bench, BDK, Sonnenbühl) mehrfach in steriler Phosphate Buffered Saline (PBS) -Lösung (Seromed Biochrom KG, Berlin) gewaschen und in ca. 2-4 mm³ große Stücke zerteilt. Es folgte eine Inkubation der Biopsate in 2 ml PBS-Dispase-Lösung (3 U/ml) (Boehringer Mannheim, Mannheim) mit 25 U/ml Penicillin/Streptomycin bei 37°C für 90 Minuten. Nach deren Ablauf wurden die Gewebeproben erneut in steriler PBS-Lösung gewaschen und darauf die epidermalen Keratinozytenzellagen von den übrigen Dermisstrukturen getrennt.

Anschließend wurde diese epidermale Zellschicht zur Dissoziation der Zellen in einer 0,05 % Trypsin und 0,02 % Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA) enthaltenden Lösung ohne Magnesium und Kalziumionen (Seromed Biochrom KG, Berlin, Berlin) für 20 bis 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die regelmäßige Resuspensionierung mit einer Motorpipette (Pipetus-Motorpipette, Eberstadt) im Abstand von 5 min unterstützte mechanisch die Lösung des Zellverbandes.

Die entstandene Zellsuspension wurde darauf für 5 min bei 600/800 U/min zentrifugiert (Universal 2S-Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen), der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit PBS-Lösung resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml Keratinozytenmedium (Keratinocyte Growth Medium, PromoCell, Heidelberg) mit den Zusätzen 50 µg/ml Bovine Pituitary Extract (BPE), 0.1 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF), 20 U/ml Penicillin/Streptomycin, 20 ng/ml Mycoplasma Removal Agent (ICN Biomedicals, Eschwege), 2,5 µg/ml Amphotericin B (Seromed Biochrom KG, Berlin), 5.0 µg/ml Insulin und 500 µg/ml Hydrocortisol (alle PromoCell, Heidelberg) resuspendiert. Die Keratinozytensuspension wurde in sterile Kulturflaschen (Falcon, Hamburg) ausgesät und im Brutschrank (US-Autoflow, Nuair, Plymouth, USA) bei 37°C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die ersten sieben Tage wurden die Kulturen nicht bewegt, um ein adhärentes Wachstum zu unterstützen und eine mögliche Kontamination zu verhindern. Am 7. Tag wurden die Kulturen mit einem inversen Lichtmikroskop (Olympus T041, Olympus Optical, Hamburg) auf adhärentes Wachstum und Kontamination hin kontrolliert. Kontaminierte und nicht adhärent wachsende Kulturen wurden verworfen. Die adhärent wachsenden Kulturen wurden ab dem 7. Tag in 3 tägigen Rhythmus überprüft und ihr Medium gewechselt.

3.1.2 Subkultivierung von Larynxkarzinomzelllinien

In flüssigem Stickstoff gelagerte Subkulturen der UMSCC-10A und UTSCC-19A Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml Minimal Essential Medium (MEM) überführt. Die Zellen wurden zur Entfernung des Frostschutzzusatzes wie oben beschrieben abzentrifugiert, in frischem MEM resuspendiert und in sterile Kulturflaschen (Falcon, Hamburg) gegeben. Inkubation, Kontrolle und Mediumwechsel fanden unter denselben Bedingungen wie bei den Keratinozyten statt. Das Kulturmedium für die Karzinomzelllinien enthielt 9,72 g/l MEM-Trockensubstanz (Seromed Biochrom KG, Berlin), 25 mM Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure (Merck, Darmstadt), 0,75 g/l Natriumbicarbonat (Merck), 2,5 µg/ml Amphotericin B (Seromed Biochrom KG, Berlin), 10 % (v/v) fetales Kälberserum (Seromed Biochrom KG, Berlin) und 20 U/ml Penicillin / Streptomycin (Seromed Biochrom KG, Berlin). Der pH-Wert des Mediums wurde mit 1 N Natronlauge (Merck) auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde das Medium in einem Bottle-Filter-System (Costar, Cambridge, USA) steril filtriert. Die Kontrolle auf adhärentes Wachstum und Kontamination erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie bei den Keratinozytenkulturen.

3.2 Isolierung der Gesamt-RNS

Bei erreichter vollständiger Konfluenz der Zellkulturen wurde nach Abgießen des Nährmediums 8 ml einer 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA enthaltenden Lösung (Seromed Biochrom KG, Berlin) auf die Kulturen gegeben. Der Ablösungsvorgang der Zellen vom Kulturflaschenboden durch die proteolytische Wirkung des Trypsins wurde alle 2 Minuten unter dem inversen Lichtmikroskop kontrolliert. Nachdem sich 80-90 % der Zellen vom Boden gelöst hatten erfolgte ein Stopp der Proteolyse durch Zugabe von 5 ml serumhaltigen MEM. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Hamburg) gegeben und 5 min bei 700 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, die Zellen in 10 ml PBS (Seromed Biochrom KG, Berlin) resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Nach restlosem Abpipettieren der Überstandsflüssigkeit wurde das verbleibende Zellpellet auf Eis gekühlt. Die Isolierung der Gesamt-RNS aus den Keratinozyten und Tumorzellpellets erfolgte mit dem Rneasy Total RNA Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die Zellen wurden lysiert. Die RNS wurde bei Durchlaufen eines Filters an Silikatpartikel gebunden, der Filter mit mehreren

Pufferlösungen gewaschen und die RNS zum Schluß mit 50 µl RNase-freiem Wasser aus dem Filter herausgespült, auf Eis gelegt und nach erfolgter Konzentrationsbestimmung bei -80°C gelagert. Neben Isolierung von RNS aus Zellkulturen wurde auch die Extraktion von RNS aus zwei Tumorbiopsaten und aus zwei Biopsien gesunder oraler Mukosa durchgeführt. Bei den Tumorbiopsaten handelte es sich um ein mäßig differenziertes Plattenepithelkarzinom der Glottis und ein schwach verhornendes Plattenepithelkarzinom des Sinus piriformis. Die bei -80 °C gelagerten Tumor- und Schleimhautproben wurden unter ständiger Kühlung in flüssigem Stickstoff mechanisch zu einem feinen Pulver homogenisiert und anschließend einer RNS-Extraktion analog zu den obigen Schritten zugeführt.

3.3 Photometrische Bestimmung der RNS-Konzentration

Die Konzentrationen der RNS-Proben wurden durch den Absorptionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe eines Photometers (Uvikon 931, Kontron, Neufahrn) bestimmt. Es wurden hierzu Suprasil Präzisionsküvetten aus Quarzglas (Hellma, Mühlheim) mit einem Probenvolumen von 6 µl verwendet. Vor jedem Meßzyklus erfolgte eine Reinigung der Küvetten von Innen und Außen durch mehrmaliges Spülen mit 100 % Ethanol und Aqua bidest und Trocknen mit einer Druckluftpistole. Das Photometer wurde an jedem Messtag vor der ersten Messung mit 6 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) geeicht. Die Konzentrationsberechnung der RNS-Proben erfolgte aus der ermittelten Absorption nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Bei konstanter Wellenlänge, Schichtdicke und Eingangslichtintensität läßt dieses sich auf folgende Formel vereinfachen:

$$C = A \times f \text{ (C = Konzentration der Probe, A = Absorption, f = Umrechnungsfaktor)}$$

Der Umrechnungsfaktor für die RNS-Proben lag bei $f = 0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.4 Reverse Transkription der mRNS-Proben in cDNS

Die cDNS wurde aus der Gesamt-RNS mittels reverser Transkriptase und speziellen Oligonukleotid-Primern synthetisiert. Durch 12 verschiedene Oligonukleotide sollte die RNS-Population in 12 cDNS Gruppen unterteilt werden. Die Oligonukleotid-Primer (Bauer et al., 1993), hergestellt von MWG-Biotech, Ebersberg, enthielten die Sequenz T₁₁NM, wobei N für

Cytosin, Guanin oder Adenosin und M für eine beliebige DNS-Base stand. Der Oligo-T-Teil der Primer band an den Poly-A-Schwanz, welche charakteristisch für mRNA-Molekülen sind. Von der isolierter Gesamt-RNS wurden 0,8 µg zusammen mit 10 mmol eines Oligo-T-Primers in 40 µl RNase-freiem Wasser für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gelegt. 8 µl 0,1 M Dithiothreitol (Gibco, Ingolstadt), 16 µl eines fünffach konzentrierten rT-Reaktionspuffers (Gibco), 1,6 nmol Desoxynukleosid-Triphosphat-Gemisch (dNTPs), (MBI Fermentas, St. Leon-Roth), bestehend aus äquimolaren Konzentrationen dATP, dTTP, dCTP und dGTP, 40 U Ribonuklease Inhibitor (Gibco) und 1200 U reverser Transkriptase (Gibco) wurden hinzugefügt und der Reaktionsansatz mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Zur reversen Transkription und cDNS-Synthese wurde der Ansatz für 90 min bei 37°C inkubiert. Darauf wurde die entstandene Heteroduplex-cDNS zur Herstellung der Matrizen-cDNS für die Amplifikation 5 min bei 95°C denaturiert. Die cDNS-Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -28°C zwischengelagert.

3.5 Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR)

Die Amplifikation der cDNS-Fragmente fand nach dem Arbeitsprotokoll von Bauer und Mitarbeitern (1993) statt. Pro Versuchsansatz wurde die cDNS zweier Keratinozyten- und Larynxkarzinomzelllinien mit ihren Oligo-T-Primern aus der reversen Transkription als 5'-3'-Primer und einem von 26 willkürlichen Dekamer-Primern als 3'-5'-Primer einer PCR unterworfen. Durch die vielfache, jedoch sequenzspezifische Anlagerung der Dekamer-Primer an die cDNS entstanden für jeden Dekamer-Primer eine Vielzahl spezifischer, unterschiedlich langer Amplikons.

3.5.1 PCR mit radioaktiv markiertem Substrat

Es wurden jeweils vier Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl gleichzeitig bearbeitet. Die 20 µl Reaktionsvolumen enthielten 2 µl cDNS je einer der 4 Zelllinien (Keratinozytenkulturen 1 und 2, Larynxkarzinomzellkulturen UMSCC-10A und UTSCC-19A), 1 µM Oligo-T-Primer, 0,2 µM Dekamer-Primer, 1,5 mM MgCl₂ (Gibco), 2 µl 10x konzentrierter PCR-Reaktionspuffer (Gibco), 4 µM dNTP (MBI Fermentas), radioaktives ³³P-dATP mit einer Aktivität von 60 µCi (Amersham, Braunschweig) und 1,5 U Taq-Polymerase (Gibco). Als Verdunstungsschutz wurden die Reaktionsvolumina der PCR-Ansätze mit

Mineralöl (Nujol, Perkin Elmer, Norwalk, USA) überschichtet. Die Laufzeit der PCR betrug 40 Temperaturzyklen. Jeder Zyklus bestand aus einer Denaturierung der cDNS bei 94°C für 30 s, dann einer Anlagerungsphase der Primer bei 40°C für 2 min und einer Amplifikationsphase der spezifischen Fragmente bei 72°C für 15 s. Nach den 40 PCR-Zyklen fand eine abschließende Inkubation bei 72°C für 5 min statt. Die PCR-Produkte wurden anschließend bei 4°C gelagert.

3.5.2 Aufbreitung der PCR-Produkte

Nach erfolgter PCR wurde das Mineralöl abpipettiert und die restlichen 20 µl Reaktionsvolumen mit 11 µl eines Färbepuffers versetzt. Die Pufferlösung bestand aus 97 %igem Formid (Merck) mit 10 mM EDTA (Merck), 0,1 % Xylen Cyonol und 0,1 % (m/v) Bromphenol (Merck). Das Gemisch wurde zur Denaturierung der Enzyme für 2 min auf 95°C erhitzt und dann 5 min auf Eis gekühlt. Davon wurden 5 µl zur elektrophoretischen Auftrennung verwendet, der Rest bei -28°C verwahrt.

3.5.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie

Die Probenauftrennung erfolgte in einem, 0,8 mm dickem, 6 %-igem, nicht denaturierendem Polyacrylamid (PAA) Gel. Die Gellösung enthielt 1x Tris-Borid/EDTA-Puffer (TBE) (Sambrook, et al. 1989), 12,5 % (v/v) Rotiphorese NF Acrylamid/Bis Lösung (Roth, Karlsruhe), 0,42 g/ml Harnstoff (Merck) sowie 0,25 mg/ml Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Merck) und 0,0125 % (v/v) Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva, Heidelberg) als Katalysatoren der Polymerisationsreaktion. Das Gel wurde in zwei Schritten erstellt. Beim Gießen der Basis wurde die doppelte Menge an Katalysatoren verwendet. Nach 20 minütiger Polymerisation wurde die Trennschicht blasenfrei gegossen. Pro Applikationstasche wurden 5 µl von dem aufbereiteten, radioaktiv markierten PCR-Produkt aufgetragen. Die Keratinozyten und die Larynxkarzinomzelllinien einer Primerkombination wurden immer in der gleichen Reihenfolge, Kera 1, Kera 2, UMSCC10A und UTSCC19A appliziert. Als Elektrophoresepuffer diente ein 1x TBE-Puffer (Serva). Die Elektrophorese wurde in einem Two Step Direct Blotter (Hoefler, San Francisco, USA) bei einer konstanten Leistung von 40 Watt und einer anliegenden Spannung von 3200 Volt über 100 min durchgeführt. Nach abgeschlossener Elektrophorese erfolgte die Übertragung des Gels auf eine Nitrozellulose-

Transfermembran (Schleicher und Schuell, Dassel). Das Gel wurde mit einer Zellophanfolie abgedeckt und in einem Slab-Gel-Dryer (LKB, Bromma, Schweden) getrocknet. Das getrocknete Gel wurde auf einen Röntgenfilm (Kodak) gelegt und dieser 24 Stunden durch das Gel autoradiographisch belichtet.

3.5.4 Vergleich des Bandenmusters der cDNS-Fragmente von Keratinozyten und Larynxkarzinomzelllinien

Beim Vergleich der Autoradiogramme paarweise dargestellter Keratinozyten- und Larynxkarzinomzelllinien wurde nach Banden gesucht, die entweder nur in den Larynxkarzinom- oder in den Keratinozytenzelllinien nachweisbar waren, oder in einem von beiden Zelltypen wesentlich stärker exprimiert wurden. Diese wurden durch Punktieren des Films mit einer sterilen Kanüle auf dem unterliegenden Gel lokalisiert. Banden, die nur jeweils in einer Keratinozyten- oder Larynxkarzinomzelllinie auftauchten, wurden nicht als differentiell exprimiert bewertet.

3.6. Reamplifikation differentiell exprimierter Genfragmente

Differentiell exprimierte Fragmente wurden durch Vergleichen der Bandenmuster markiert, die cDNS aus dem Gel extrahiert und in einer zweiten PCR als Matrize verwendet. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Reamplifikation wurde dann eine PAA-Gelelektrophorese durchgeführt.

3.6.1 Isolierung differentiell exprimierter Genfragmente

Die entsprechenden Gelstücke mit den markierten Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Filterpapier aufliegendem PAA-Gel ausgeschnitten und in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt. Nach Hinzufügen von 100 µl autoklaviertem Aqua dest. wurden die Gelstücke für 10 min bei Zimmertemperatur und danach für 15 min im kochenden Wasserbad inkubiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 10 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (Merck) und 450 µl reines Ethanol (Merck) versetzt. Nach 60 min Inkubation bei -80°C

wurde das Gemisch für 10 min in einer Ultrazentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf) bei 4°C und 14000 U/min zur Sedimentierung der ausgefallenen DNS zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das DNS-Pellet mit 200 µl eiskaltem 85 % Ethanol gespült. Nach einminütiger Zentrifugation unter oben angegebenen Parametern wurde der Überstand abpipettiert und den Restalkohol ließ man verdampfen. Durch Zugabe von 12 µl autoklaviertem Aqua dest. (Quiagen, Hilden) wurde das DNS-Pellet gelöst und dann bei -28°C gelagert. Für die folgende PCR wurden 4 µl als Matrize eingesetzt.

3.6.2 PCR-Protokoll zur Reamplifikation differentiell exprimierter Fragmente

Das PCR-Protokoll für die Reamplifikation entsprach von den Temperatur-Zeitparametern dem im Kapitel 3.5.1 bereits beschriebenen. Der Reaktionsansatz bestand jeweils aus 4 µl der unter Kapitel 3.6.1 beschriebenen Matrizen DNS, 1 µM des in der ersten PCR verwendeten Oligo-T-Primers, 0,2 µM des verwendeten willkürlichen Dekamer-Primers, 1,5 mM MgCl₂ (Gibco), 20 µM dNTPs (Fermentas), 4 µl 10x PCR-Reaktionspuffer (Gibco) sowie 2,5 U Taq-DNS-Polymerase bei einem gesamten Reaktionsvolumen von 40 µl. Als Verdunstungsschutz wurde der Ansatz mit Mineralöl überschichtet. Durchgeführt wurde die Reaktion mit dem DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA).

3.6.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung des Reaktionsgemisches zur Isolierung der Amplifikationsprodukte erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen) nach dem Arbeitsprotokoll des Herstellers. Das Reaktionsgemisch wurde in ein Quickspin Colum überführt und zentrifugiert, wobei die DNS-Fragmente sich an Silikatpartikel des Quickspin Colum Filters banden. Durch mehrmaliges Auftragen von Pufferlösungen und anschließende Zentrifugation wurden die übrigen Reaktionskomponenten ausgewaschen. Es folgte die Eluierung der an den Filter gebundenen DNS mit 50 µl frisch autoklaviertem Aqua dest. 4 µl des Eluats wurden mit 3 µl Farbpuffer (Tris-EDTA-Puffer (Sambrook et al. 1989) mit 0,1 % (m/v) Bromphenolblau (Merck)) versetzt, um in der darauf folgenden PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt zu werden. Die restlichen 36 µl wurden bei -28°C gelagert.

3.6.4 PAA-Gelelektrophorese und Silbernitratfärbung

Die Probenauftrennung erfolgte in einem 1,5 mm dickem, 6 % (w/v) nicht denaturierendem Polyacrylamidgel bei einer anliegenden Spannung von 400 V. Das verwendete PAA-Gel enthielt 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS (Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, USA) Sambrook et al. 1989), 6 % (w/v) Polyacrylamid (Long Ranger Gel Solution, Boehringer Ingelheim) sowie 3,5 % (w/v) Glycerin. Nach Zugabe von 0,5 mg/ml APS (Merck) und 0,08 % (v/v) TEMED (Serva) wurde das Gel luftblasenfrei in einer Glaskassette auf eine acrylatbeschichtete Folie (Gel-Fix, Serva) gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurde es mit der Trägerfolie, getrennt durch eine dünne Kerosinschicht zur Verhinderung von Kriechströmen, auf die Kühlplatte des Flachbett-Elektrophoresegerätes (FBE-3000, Serva) gelegt. Als Elektrophoresepuffer diente MOPS-Pufferlösung. Bei einer angelegten Spannung von 400 V, Leistung von 15 Watt und Temperatur von 15°C erfolgte eine Präelektrophorese für 15 min und darauf nach Applikation der Proben die elektrophoretische Auftrennung für 140 min. Ein Gemisch von Molekulargewichtsmarker (DNA Molekularweight Marker V, Böhringer Mannheim) wurde zur Gewichtskontrolle der isolierten Fragmente mit aufgetragen. Die im Gel aufgetrennten DNS-Fragmente wurden nach abgeschlossener Elektrophorese mit Silbernitrat angefärbt (Meril et al., 1981; Bassam et al., 1981). Das Gel wurde zunächst in Aqua dest. gespült, dann in einer 10 % (v/v) Ethanol (Merck) und 0,5 % (v/v) Eisessig (Merck) enthaltenen Lösung fixiert, erneut in Aqua dest. gespült, für 15 min in einer 0,1 %igen Silbernitratlösung inkubiert, wieder in Aqua dest. gespült und darauf für 10-15 min in einer 1,5 % (w/v) Natriumhydroxid (Merck) und 0,5 % (v/v) Formaldehyd (Merck) enthaltenden Lösung entwickelt. Nach abschließender Spülung in Aqua dest. wurde das PAA-Gel luftdicht zur fotografischen Dokumentation in einer klaren Plastikhülle eingeschweißt und gelagert. Zur Kontrolle der Reamplifikationsergebnisse wurden die Gele auf einem Durchleuchter (Durchleuchter, Kaiser 5000s, Buchen) ausgewertet.

3.7 Klonierung des differentiell exprimierten Fragmentes

Isolierte, differentiell exprimierte Fragmente wurden mit einer vorbereiteten Ligationsmischung in einen pGEM-T-Vektor (pGEM-T, Promega, Heidelberg) eingefügt. Dieser rekombinante Vektor wurde dann in einer Transformationsreaktion in einen kompetenten Bakterienstamm

(JH-109 Competent Cells, Promega) integriert und danach aus dem Bakterienklon isoliert und komplett sequenziert.

3.7.1 Ligation und Transformation

Über einen optischen Vergleich zwischen den Banden der Molekulargewichtsmarker und den Banden der isolierten Fragmente auf dem Silbernitrat gefärbten PAA-Gel wurde die Konzentration der Reamplifikationsprodukte bestimmt. Für die Ligationsreaktion wurden 1 µl zehnfach konzentrierten Ligationspuffers (Promega, Madison, USA), 3 U T₄-DNS-Ligase (Gibco), 15 pmol pGEM-T-Vektor (pGEM-T, Promega), 60 pmol des zu vervielfältigen DNS-Fragmentes und frisch autoklaviertes Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt. Das Gemisch wurde bei 15°C, der optimalen Aktivitätstemperatur der Ligase, für 3 h inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

Für jede Ligationsreaktion wurden 50 µl tiefgefrorene Bakterienzellsuspensionen (JH-109 Competent Cells) 5 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des Ligationsproduktes erfolgte eine weitere Inkubation auf Eis für 30 min. Danach wurde der Transformationsansatz für 50 sek bei 42°C im Wasserbad hitzegeschockt und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Nun wurden 500 µl SOC-Medium (Sambrook et al. 1989), bestehend aus 20 mM Glucose, 10 mM NaCl mit den Zusätzen 20 g Bacto Tryptone (Difco, Detroit, USA) und 5 g Bacto-Yeast Extract (Difco), hinzugegeben und der Ansatz für 60 min bei 37°C inkubiert.

3.7.2 Kultivierung der Bakterien und Selektion

Nach Abschluss der Inkubation wurden jeweils 100 µl des Reaktionsvolumens unter sterilen Arbeitsbedingungen an einer Workbench (Laminar Air Flow Bench, BDK, Sonnenbühl) auf zwei Agarplatten ausgestrichen. Der Nährboden bestand aus 5 g/l Bacto Yeast Extract (Difco), 10 g/l Bacto Tryptone (Difco), 10 g/l Natriumchlorid (Merck), 100 µg/ml Ampicillin (Gibco) und 15 g/l Agar-Agar (Serva). Vor dem Auftragen der transformierten Bakterien wurden die Agarplatten für 30 min bei 37°C inkubiert und mit 100 µl 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-Galactopyranosid -Lösung (X-Gal (MBI-Fermentas)) beschichtet. Nach dem Antrocknen der X-Gal wurden je 100 µl der transformierten Bakterienzellsuspension auf den Platten ausgestrichen, 20 h bei 95 % Luftfeuchte, 5 % CO₂-Gehalt und 37°C inkubiert und zur Farbentwicklung 4 h bei 4°C gelagert. Das restliche Transformationsprodukt wurde bei

4°C zwischengelagert, um bei Misserfolg der ersten Kultivierung einen zweiten Versuch durchzuführen.

Der verwendete pGEM-T-Vektor enthielt ein Ampicillinresistenz-Gen und ein direkt die Ligationstelle überbrückendes Galaktosidase-Gen. Durch die mit Ampicillin versetzten Nährböden konnten sich nur Bakterienklone mit aufgenommenem Vektor vervielfältigen. Bakterienklone mit in den Vektor ligiertem DNS-Fragment konnten aufgrund des nun defekten Galaktosidase-Gens das auf den Nährboden aufgetragene X-Gal nicht mehr zu einem blauen Farbstoff umwandeln. Erfolgreich transformierte, weiße Klone wurden anschließend mit einer sterilen Metallöse gepickt und in 20 ml Bakterienmedium, bestehend aus Bacto Yeast Extract (Difco), Bacto Tryptone (Difco) und Natriumchlorid in gleicher Konzentration, wie in den Nährböden, sowie 30 µg/ml Ampicillin (Gibco) und 5 mM Glucose (Merck), überführt. Diese Kulturen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus der Bakterienkultur wurden 2 ml entnommen, mit 10 % Glycerin (Merck) versetzt und bei -80°C als Kontrollproben gelagert. Die verbleibenden 18 ml wurden 3 min bei 3000 U abzentrifugiert (Universal 2S Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) zur Plasmidextraktion überführt.

3.7.3 Plasmidextraktion

Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 8000 U/min wurde der Überstand abpipettiert und die Plasmide mit dem Plasmid Mini Kit (Qiagen) aus dem Bakterienpellet nach dem Arbeitsprotokoll des Herstellers extrahiert. Das Bakterienpellet wurde dabei in einem Puffer resuspendiert, die Zellstruktur der Bakterien lysiert und nach erfolgter Zentrifugation der Überstand mit den gelösten Plasmiden auf eine Filtersäule mit Anionenaustauscherharzen gegeben. Die Plasmide wurden am Filter gebunden, die restlichen Bestandteile mehrfach mit Pufferlösungen ausgewaschen und die Plasmide anschließend mit sterilem Aqua dest. aus dem Filter eluiert. Durch alkoholische Fällung und Zentrifugation ließ sich die Plasmid-DNS in Form eines Pellet gewinnen, welcher dann in 50 µl sterilem 1x Tris/EDTA-Puffer (Sambrook et al. 1989) gelöst wurde. Die photometrische Bestimmung der Konzentration der Plasmid-DNS erfolgte analog der Bestimmung der RNS-Konzentration, siehe Kapitel 3.3.

3.7.4 Kontrolle der Klonierung durch Restriktionsanalyse

Zur Kontrolle der Klonierung des differentiell exprimierten DNS-Fragmentes wurden Proben der isolierten, aufgereinigten Plasmide mit spezifischen Restriktionsenzymen gespalten und elektrophoretisch auf einem PAA-Gel, wie unter Kapitel 3.6.4 beschrieben, aufgetrennt. Durch Vergleich mit den PAA-Gelen nach der Reamplifikation der Fragmente ließen sich erfolgreiche Klonierungen identifizieren.

Der Plasmidring enthielt spezifische Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Sac II und Pst I (Appligene, Heidelberg) in der Nähe der multiplen Klonierungsstelle. Mit der Restriktionsreaktion wurde so ein DNS-Fragment gewonnen, das dem ligierten Fragment plus etwa 10 Plasmidbasenpaaren an jedem Ende entsprach. Das Reaktionsgemisch, aufgefüllt auf 20 µl mit frisch autoklaviertem Aqua dest., enthielt 0,9 µg Plasmid-DNS, je 2 U Sac II und Pst I, 2 µl 10x Reaktionspuffer C (Promega) und 0,1 µg Rinderserumalbumin (BSA, MBI Fermentas). Der Ansatz wurde für 3 h bei 37°C, der optimalen Aktivitätstemperatur der Restriktionsenzyme, inkubiert und zur Enzymdegradation für 2 min auf 65°C erwärmt. 4 µl des Reaktionsproduktes wurden mit 3 µl Farbpuffer (siehe Kapitel 3.6.3) versetzt und in einer PAA-Gelelektrophorese (siehe 3.6.4) aufgetrennt.

3.8 Hoch stringente PCR mit sequenzspezifischen Primern

Zur Bestätigung des Sequenzierungsergebnisses des differentiell exprimierten Fragmentes wurde mittels konstruierten, sequenzspezifischen Primern nach einer reversen Transkription isolierter mRNS, wie in Kapitel 3.4 dargestellt, eine hoch stringente PCR durchgeführt.

Die Reaktionsansätze enthielten in einem Volumen von 50 µl jeweils 5 µl 10x Reaktionspuffer (Gibco), 2,4 U Taq-Polymerase (Gibco), 0,2 mM dNTPs (MBI Fermentas), 1,5 mM MgCl₂ (Gibco) und 0,1 µmol des GALC-genspezifischen Upstream- (5'-TGG ATT GGT CCA TGT TGT G-3') und Downstream-Primern (5'- GAT TCG TAA ATG TAG ACA G-3'). Die PCR durchlief im Thermocycler 30 Zyklen mit 94 °C für 45 s, 55 °C für 30 s und 72 °C für 90 s und einer zusätzlichen Inkubation bei 72 °C für 5 min. Nach der PCR wurden die Amplifikationsprodukte von den ungebundenen dNTPs, MgCl₂ und Primern gereinigt und anschließend in 1 %-igem Agarosegel mit 0,01 % Ethidiumbromid analysiert.

3.9. Sequenzierung und Datenbankvergleich

Die komplette Plasmid-DNS (aus Kapitel 3.7.4) mit den erfolgreich ligierten DNS-Fragmenten wurde zur Vorbereitung für die automatische Sequenzierung 25 Temperatur-Zeit-Zyklen unterworfen, wobei Farbterminatoren zum Kettenabbruch an verschiedenen Stellen führten. Die Plasmid-DNS mit dem ligierten Fragment wurde in zwei Ansätzen mit dem plasmidspezifischen M13- upstream und dem M13-downstream-Primer amplifiziert. Das Reaktionsgemisch enthielt jeweils 10 pmol von den Primern (MWG Biotech Ebersberg), 5 % (v/v) Dimethylsulfoxid (Merck) und 4 µl Reaktionpremix (Applied Biosystems, Warrington, England) mit Taq-Polymerase und Substraten. Die Temperaturzyklen beinhalteten 30 s Inkubation bei 96°C zur DNS-Doppelstrangdenaturierung, 15 s Inkubation bei 60°C zur Primeranlagerung und 4 min bei 60°C zur DNS-Synthese. Die DNS wurde mit einer Ethanol-fällung, entsprechend dem Arbeitsprotokoll von Applied Biosystems, isoliert und in 25 µl TSR-Puffer (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) gelöst. Die automatische Sequenzierung erfolgte in einem Abi Prism™ 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer, Norwalk, USA). Sämtlich ermittelte Sequenzen der untersuchten cDNS-Fragmente wurden durch Genbankrecherche mit den BLAST-Programmen am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) verglichen.

3.10 DNS-RNS-Hybridisierung

Die Schritte der DNS-RNS-Hybridisierung wurden mit einem DIG High Prime Labeling and Detection Kit (Boehringer-Mannheim) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.10.1 Markierungsreaktion

Für die Northern Hybridisierung wurden eine Digoxigenin (DIG)–markierte Sonde mit dem DIG-DNA Labeling Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) mittels RT-PCR hergestellt. Der Nachweis der GALC-mRNS erfolgte mit einer 855 bp Hybridisierungssonde unter Verwendung des GALC-genspezifischen Upstream- (5'-GAC TCA CAC AGC TGA TGA ATG-3') und des Downstream-Primers (5'-GTA GTA TCA GAA ACT GGT GG-3') (Positionen: 1007-1027 und 1842-1861 im Exon 17 des GALC-Gens).

Zur Markierung wurden 1 µg cDNS der Sonde in 16 µl autoklaviertem Wasser gelöst und für 10 min in kochendem Wasser denaturiert und sofort danach auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4 µl DIG High Prime wurde die Probe für 2 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die Markierungsreaktion wurde nach 20 stündiger Inkubation bei 37 °C durch 10 minütiges Erhitzen auf 65 °C gestoppt.

3.10.2 Northern Blotting

Die elektrophoretische Auftrennung der RNS aus einer Keratinozyten- und einer Karzinomzellkultur, sowie aus 2 Biopsaten gesunder oraler Mukosa und 2 Karzinombiopsaten (siehe Kapitel 3.2) erfolgte in einem 1,2 %-igen Agarosegel mit 1 Volumenanteil 50-fach MOPS und 2 % (v/v) 0,22 M Formaldehyd. Zur Färbung der 28S und 18S rRNS-Fragmente wurde dem Gel 0,01 % (v/v) einer 1 % (w/v) -igen Ethidiumbromidlösung beigemischt.

Die aufgetrennten RNS-Fractionen wurden aus dem Gel mittels Kapillar-Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Böhringer-Mannheim) übertragen. Nicht gebundenen RNS und Pufferrückstände wurden mit einer 2x SSC-Lösung (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7) von der Nylonmembran gewaschen und die anhaftende RNS durch UV-Bestrahlung immobilisiert. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei 50 °C mit 20 - 30 ml DIG Easy Hyb-Lösung (Böhringer-Mannheim) prähybridisiert.

3.10.3 Hybridisierungs-Reaktion

Es wurden 50 ng/ml des in Kapitel 3.10.1 beschriebenen Markierungsgemisches für 10 min in kochendem Wasser denaturiert und dann sofort auf Eis gekühlt. Die denaturierte, markierte Probe wurde mit der auf 50 - 55 °C vorgewärmten DIG Easy Hyb Prähybridisierungslösung vermischt und auf die Nylonmembran aufgetragen. Die Hybridisierungsreaktion wurde für 12 - 16 h bei einer Temperatur von 50 °C durchgeführt.

3.10.4 Detektion

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zunächst für 2 x 15 min in einer Lösung bestehend aus 2fach SSC und 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) schüttelnd gewaschen.

Danach wurde sie für 2 x 15 min in 0,5fach SSC und 0,1 % SDS bei einer Temperatur von 68 °C abermals schüttelnd inkubiert. Der Blot wurde für 5 min in Waschpuffer mit 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl (pH 7,5) und 0,3 % Tween 20 (Calbiochem, Bad Soden) gewaschen und anschließend in 100 ml Blocking-Lösung [10fach Blocking Solution 1:10 in Maleinsäurepuffer mit 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl (pH 7,5)] inkubiert. Dann wurde er für 30 min in 20 ml Antikörperlösung (anti-DIG-AP conjugate 1:10000 in Blocking-Lösung) inkubiert, für 2 x 15 min in Waschpuffer gewaschen und für 5 min in einem Puffer bestehend aus 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂ (pH 9,5) equilibriert. Der Blot wurde für die Chemolumineszenz-Detektion mit CSPD-Lösung (Dinitrat 3- (4-Methoxy Spiro) 1,2 Dioxetane-3,2- (5-chloro) tricyclodecan-4-phenyl-phosphat (Böhringer-Mannheim)) nach dem Protokoll des Herstellers vorbereitet. Als quantitative Kontrolle der gleichen Beladung der Bahnen wurde eine zusätzliche GAPDH-Probe aufgetragen. Nach erfolgter Färbung wurde die Membran sofort mit einer Folie luftblasenfrei abgedeckt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die CSPD-Lösung wurde herausgedrückt, die Folien verschweißt, und die Membran für 15 min bei 37 °C erneut inkubiert. Zuletzt folgte zur Darstellung der Reaktionsergebnisse unter Verwendung des Blots eine 20 minütige autoradiographische Belichtung eines Röntgenfilms (XAR-5 Kodak, Rochester, New York, USA).

3.10.5 Densitrometrische Auswertung

Als Ergebnisse der Hybridisierung wurden die belichteten und entwickelten Röntgenfilme mit dem Scanner Archivierungsprogramm E.A.S.Y. Win 32 (Herolab, Belm) quantitativ ausgewertet. Die Stärke des Signals der GAPDH-mRNS wurde als Standardbezugsgröße genommen. Durch direkte Übertragung der Proportionalitätsverhältnisse zwischen dem GAPDH-Standard und dem zu charakterisierenden, differentiell exprimierten Fragment konnten Rückschlüsse auf dessen quantitative Expression gezogen werden.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse des mRNA-Musters

4.1.1 Identifizierung und Isolierung eines differentiell exprimierten mRNA-Fragmentes

Unter Verwendung von 60 μCi [^{33}P]-dATP pro cDNS-Synthese konnten pro Zellart vier PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt und autoradiographisch ausgewertet werden. Abhängig vom Kalibrierungsdatum und dem Zeitpunkt der Applikation des radioaktiven Phosphors betrug die mittlere spezifische Aktivität $15\text{-}20 \times 10^4$ Zerfälle pro Minute (cpm). Pro Sequenziergel wurden somit die radioaktiv markierten Amplikons von 16 PCR-Reaktionen elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographiert. Die Expositionsdauer der Röntgenfilme zur Abbildung des Bandenmusters der revers transkribierten mRNA-Fragmente betrug zwischen 12 und 24 h. Die Bandenmuster der beiden Keratinozytenzelllinien und der Larynxkarzinomzelllinien UTSCC-10A und UTSCC-19A enthielten jeweils zwischen 80 und 120 identifizierbare Fragmente. Die Höhe der Expression und das Verteilungsmuster der Banden stimmten bei gleicher Primerkombination zwischen den malignen und den benignen Zelllinien weitgehend überein. Die selektive Expression von Fragmenten in nur einer Zelllinie innerhalb der Zellart, stellte sich in Wiederholungsexperimenten als nicht reproduzierbar heraus und somit wurden diese Fragmente nicht als differentiell exprimiert eingestuft. Die Autoradiogramme wurden speziell auf Unterschiede im Expressionsmuster der cDNS untersucht, die in den beiden Zelllinien einer Zellart gleichzeitig und reproduzierbar vorkamen. Bei der Kombination des Dekamer-Upstream Primers 5'-TGG ATT GG TC-3' mit dem Oligo-T-Primer 5'-TTT TTT TTC G-3' zeigte sich im Vergleich der cDNS Muster ein Fragment mit deutlich geringerem Expressionsniveau in den SCC-Zellen, siehe Abb.1.

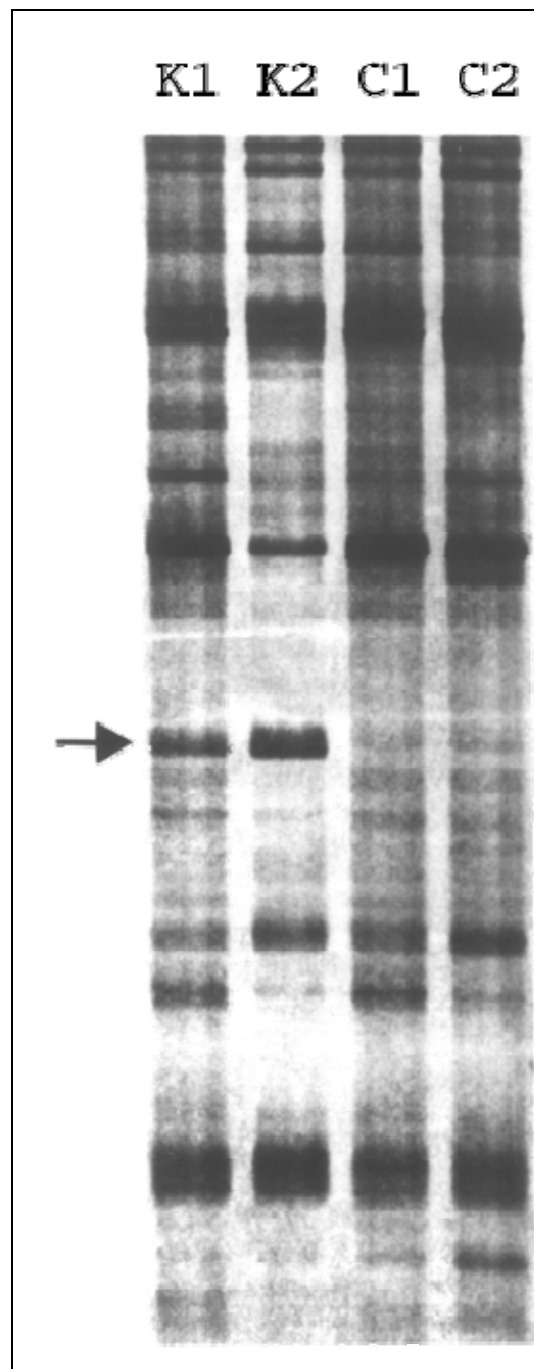


Abb. 1:
 Autoradiogramm von der Expression revers transkribierter mRNA Moleküle aus benignen Mundschleimhaut-Keratinocyten (K1/K2) und Larynxkarzinomzelllinien UTSCC-10A (C1) und UMSCC-19A (C2). Das mRNA- Expressionsmuster der beiden Zellarten ist größtenteils identisch. Ein deutlicher quantitativer Unterschied in der Expression eines Fragmentes der beiden untersuchten Zellarten ist mit dem Pfeil angezeigt. Spezifische Aktivität 150.000 cpm. Exponierungsdauer: 14 Stunden.

4.1.2 Reamplifikation des differentiell exprimierten Fragmentes

Nach der Lokalisation des differentiell exprimierten Fragmentes konnte es selektiv aus dem Gel isoliert und in Lösung gebracht werden. Das Fragment wurde unter Verwendung identischer Downstream- und Upstream-Primer-Kombination (siehe 4.1.1.) reamplifiziert. Zur Erfolgskontrolle dieser Reamplifikation und zur Bestimmung dessen Molekulargewichtes wurde es zusammen mit Referenz-DNS-Fragmenten bekannter Molekulargewichte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Diese Gelelektrophorese ist in Abb.2 dokumentiert. Aus ihr geht hervor, daß sich die Länge des Fragmentes auf ungefähr 150 bp beläuft. Für eine differenziertere Charakterisierung mußte das Fragment jedoch einer Sequenzanalyse unterzogen werden. Um eine für die Sequenzanalyse ausreichende Menge des Fragmentes zu erhalten, erfolgte die Klonierung dieses Fragmentes in pGEM-T-Vektor und Transformation in kompetente Bakterienzellen.

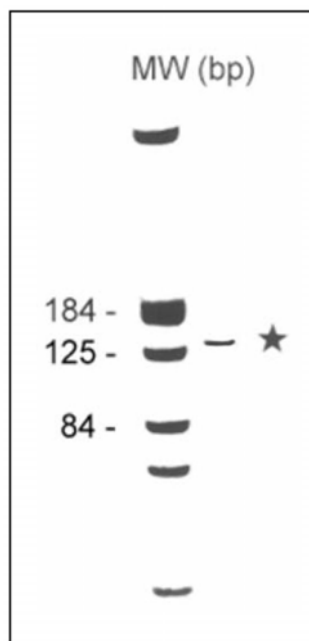


Abb.2:
Nachweis des differentiell exprimierten cDNS Fragmentes[★], nach Reamplifikation, im silbernitratgefärbten PAA-Gel. Die Primer erkannten komplementäre Sequenzen des differentiell exprimierten cDNS Moleküls, das amplifiziert und elektrophoretisch nachgewiesen werden konnte. MW: Molekularstandards

4.2 Sequenzanalyse und Datenbankvergleich

4.2.1 Klonierung des differentiell exprimierten Fragmentes

Die direkte Sequenzanalyse des differentiell exprimierten Fragmentes mittels vorgeschalteter PCR konnte aufgrund von Sequenzüberlagerung mit den Dye-Terminatoren nicht einwandfrei durchgeführt werden. Durch Ligation des Fragmentes in einen Vektor und Transformation in kompetente Bakterienzellen konnte dieses Problem umgangen werden. Bestätigt wurde die erfolgreiche Ligation und Transformation nach anschließender Plasmidextraktion und Restriktionsanalyse durch Elektrophorese (Abb.3).

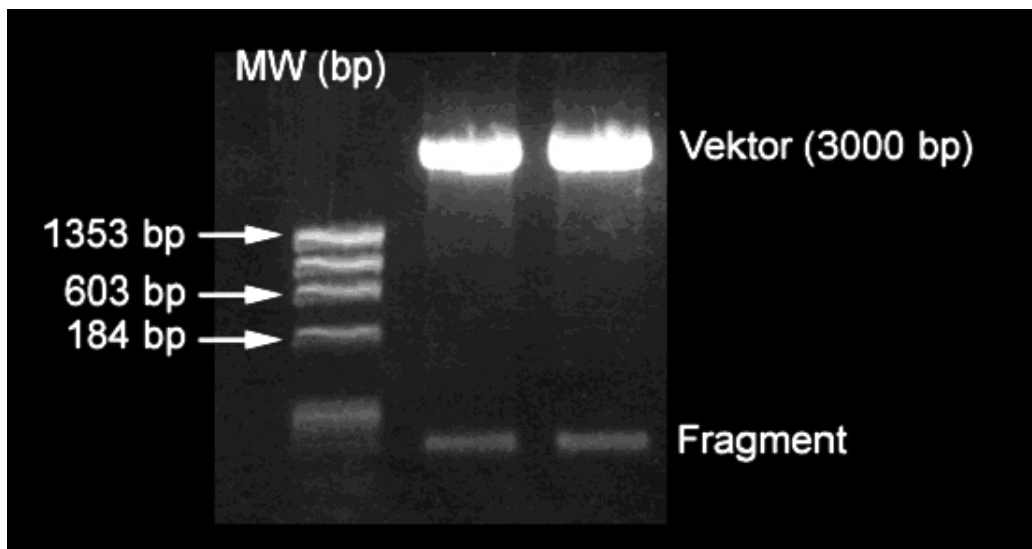


Abb.3:

Elektrophoretische Auftrennung des rekombinierten pGEM-Vektors nach Restriktion mit *PstI* und *SacII* im ethidiumbromidgefärbtem Agarosegel. Mit Hilfe der zwei Restriktionsendonukleasen wurde das differentiell exprimierte Fragment aus dem Klonierungsvektor (3 KB) herausgeschnitten. Links sind die Molekularstandards (MW) angegeben.

4.3.2 Bestimmung der Basensequenz und Genbankrecherche

Unter Verwendung der vektorspezifischen upstream und downstream M13-Oigonukleotid-Primer wurde nach erfolgreicher Spaltung der isolierten Plasmide eine Sequenzanalyse des differentiell exprimierten Fragmentes durchgeführt (Abb. 4A/B). Die genaue Länge des cDNS-Fragmentes betrug 148 bp. Zum Ausschluß von Basenfehlbestimmungen wurde dann die upstream (5'-3') und die downstream (3'-5') Sequenz der cDNS verglichen. Es folgte die Untersuchung auf eventuelle Homologien mit in der Human-GenBank-Databse gespeicherten Sequenzen. Beim Datenbankvergleich zeigte sich eine 99,3 %-ige Homologie des differentiell exprimierten Fragmentes mit den Basen 1749 bis 1897 des letzten Exons (Exon 17) des menschlichen GALC-Gens.

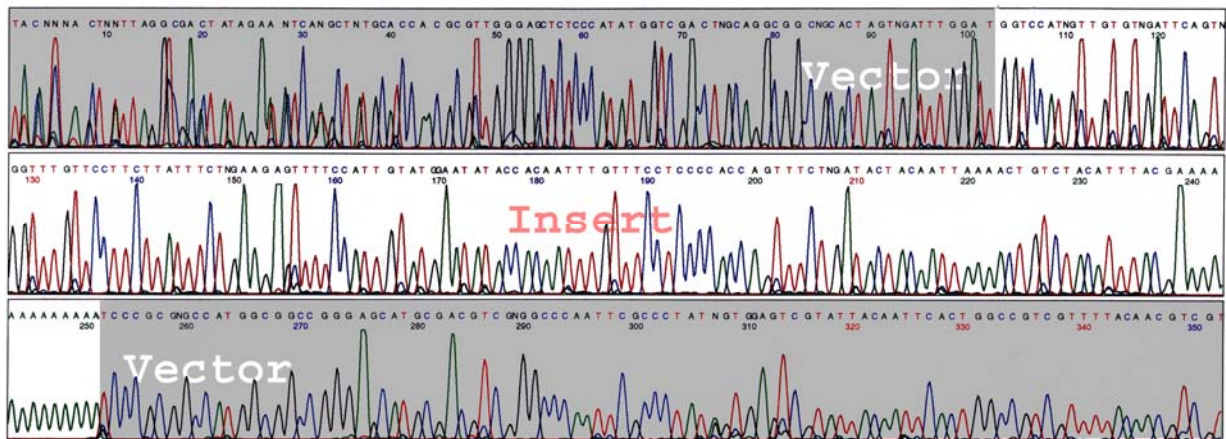


Abb. 4A

1	TGG ATT GGT CCA TGT TGT GTG ATT CAG TGG TTT GTT CCC T	40
1749	GAG ATT CGT CCA TGT TGT GTG ATT CAG TGG TTT GTT CCC T	1788
41	TCT TAT TTC TGA AGA GTT TTC CAT TGT ATG AAT ATA CCA C	80
1789	TCT TAT TTC TGA AGA GTT TTC CAT TGT ATG AAT ATA CCA C	1828
81	AAT TTG TTT CCT CCC CAC CAG TTT CTG ATA CTA CAA TTA A	120
1829	AAT TTG TTT CCT CCC CAC CAG TTT CTG ATA CTA CAA TTA A	1868
121	AAC TGT CTA CAT TTA <u>CGA AAA AAA AAA AA</u>	148
1869	AAC TGT CTA CAT TTA CGA ATC TTT GTG TA	1897

Abb. 4B

Abb.4:

Sequenzergebnis des in Plattenepithelkarzinomzellen stark herunterregulierten mRNS-Fragmentes nach dessen Klonierung in pGEM-T Vektor.

A) Die genaue Fragmentlänge konnte mit 148 bp festgelegt werden. Grau unterlegt sind die beiden Enden des Klonierensvektors. Dazwischen ist die Sequenz des differentiell exprimierten Fragmentes dargestellt. Jeder Peak repräsentiert eine Base, die nach ihrer Markierung mit Dye-Terminatoren vom Detektor erfaßt und quantifiziert wurde.

B) Reihenfolge der Basen der in „A“ gezeigten partiellen Gensequenz in 5' zu 3' Richtung mit der Big-Dye-Reaktion nach automatischer Sequenzierung. Die obere Reihe repräsentiert die Sequenz des gefundenen Genfragmentes, während die untere Reihe den komplementären Teil der Exon 17 Sequenz des GALC-Gens darstellt. Der verwendete Downstream- und Upstream-Primer ist jeweils unterstrichen. Punktuelle Basenveränderungen haben sich nur im Bereich der Primer ergeben und sind fett und kursiv hervorgehoben.

4.3 Reproduzierbarkeit des differentiell exprimierten Fragmentes

4.3.1 Hoch stringente PCR mit sequenzspezifischen Primern

Um die Richtigkeit des Aussagewertes des Differential Display Ergebnisses und der Reamplifikation zu überprüfen, wurde eine zweite hoch stringente PCR mit sequenzspezifischen Primern durchgeführt. Die „nested“ Primer lagerten sich jeweils dem ersten Primerpaar an. Die Sequenz des amplifizierten Fragmentes war übereinstimmend mit der, in der Abb. 4A gezeigten Sequenz.

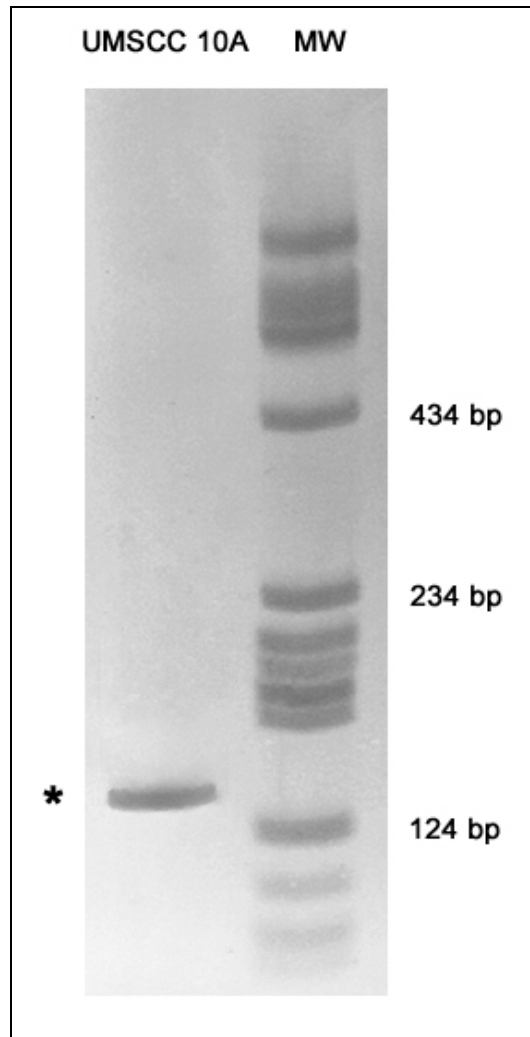


Abb.5:

Nachweis des differentiell exprimierten Fragmentes im Silbernitrat-gefärbten PAA-Gel unter Verwendung von Primern, die aus der Sequenz des 148 bp Fragmentes konstruiert wurden. (*) Reamplifiziertes differentiell exprimierte Fragment. (MW) Molekulargewichtsstandart

4.4 Nachweis und Quantifizierung der Repression der GALC-mRNS

4.4.1 Northern-Hybridisierung

Zur Verifizierung der RT-PCR Befunde wurde die GALC-mRNS Expression durch Northern-Hybridisierung untersucht.

Die Gesamtzell-RNS der Keratinozyten- und Larynxkarzinomzelllinien sowie von zwei SCC-Tumorbiopsien und entsprechend angrenzender gesunder Mundschleimhaut wurde wie in 3.2 beschrieben isoliert und der Northern-Hybridisierungs-Analyse zugeführt. Als Digoxenin markierte cDNS-Sonde diente das RT-PCR Produkt welches im Exon-17 eine 855 bp Region umspannt (3.10.1). Das Ergebnis der Northern-Hybridisierung in Abb.6 zeigte die starke Überexpression eines mRNS Moleküles von ca. 4 KB in der gesunden Keratinozytenzelllinien und den beiden Biopsien gesunder oraler Mucosa. Die Molekülgröße entspricht der geschätzten Größe der vollständigen GALC-mRNS (Luzi et al. 1995). In der Larynxkarzinomzelllinie und den beiden Karzinombiopsaten konnte nur ein schwaches Hybridisierungssignal detektiert werden.

Die Quantifizierung der GALC-mRNS Expression mittels Densitometrie ergab ein zwanzigfach schwächeres Hybridisierungssignal bei den SCC-Zelllinien und den SCC-Biopsien im Vergleich zu den Keratinozytenzelllinien und den Mucosa-Biopsien. Somit konnten die Befunde des Differential Display und der RT-PCR mittels Northern-Hybridisierung eindeutig verifiziert werden.

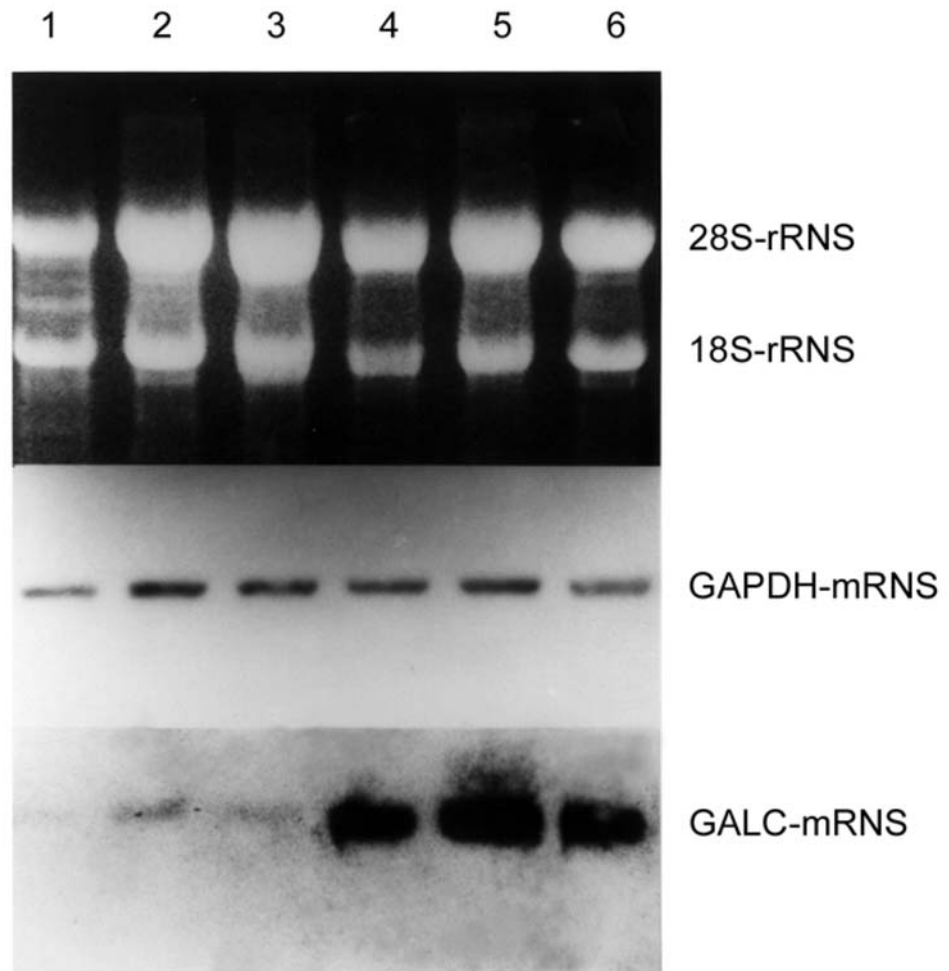


Abb.6:

Oberes Bild: Die beiden distinkten Banden repräsentieren die Nativität der 28S -und 18S-rRNA Einheiten. Dies gilt als Hinweis dafür, daß die Gesamt-RNA nicht degradiert ist.

Mittleres Bild: Die gleichmäßig ausgeprägten Banden der GAPDH-mRNA zeigen, daß in allen sechs untersuchten Proben die gleiche Menge RNA aufgetragen wurde.

Unteres Bild: Darstellung des Hybridisierungsergebnisses. Von links nach rechts:

1.) Larynxkarzinomzelllinie (UMSCC-10A), 2.) Biopsie eines mäßig differenzierten SCC der Glottis, 3.) Biopsie eines schwach verhornenden SCC des Sinus piriformis.4.) Biopsie gesunder oraler Mukosa, 5.) Keratinozytenzelllinie, 6.) Biopsie gesunder oraler Mukosa

5. Diskussion

5.1 Charakterisierung der Genexpression mittels DDRT-PCR

Die Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR) ist eine effektive Methode zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene in verschiedenen Zellen. Sie vereint mit der RT-PCR, der cDNA Sequenzierungs Gel-Elektrophorese und der cDNA-Klonierung drei einfache und hocheffiziente Methoden (Liang und Pardee 1992). Zellen höherer Organismen enthalten ungefähr 100000 Gene, von denen jedoch nur ca. 15000 exprimiert werden. Nach aktuellen mathematischen Modellen ermöglicht die DDRT-PCR mit den Kombinationsmöglichkeiten von 80-160 Dekamer-Upstream Primer und 3 Oligo-T-Downstream Primer in 93 % eine Detektion sämtlicher mRNS-Transkripte eukaryoter Zellen und somit die vergleichende und reproduzierbare Analyse des Genexpressionsprofil (Yang et al 2004). Gegenüber anderen Methoden, wie der Subtraktiven und Differentiellen Hybridisierung bietet die DDRT-PCR Technik mehrere Vorteile. Sie ist schnell und einfach mit geringen Mengen RNA durchführbar und weist dabei eine erhöhte Sensitivität und Reproduzierbarkeit auf. DNA Microarrays, welche auf der Methodik eines umgekehrten Northern Blot beruhen, können auf einem einzigen Chip bis zu 10000 DNA-Sonden enthalten, sind jedoch durch die vorgefertigten Sonden auf bekannte Gene beschränkt, während die gleichzeitig kostengünstigere DDRT-PCR zusätzlich die Identifizierung unbekannter Gene ermöglicht.

Die durchgeführten Genexpressionsanalysen von zwei Larynxkarzinomzelllinien (UTSCC-10A und UTSCC-19A) zu zwei Keratinozytenzelllinien zeigten im Autoradiogramm der PAA-Gelelektrophorese in Höhe der Expression und im Verteilungsmuster der 80 bis 120 Banden eine weitgehende Übereinstimmung innerhalb der Zelllinien und differentielle Banden zwischen den Zelllinien. Somit ermöglichte die hier verwendete DDRT-PCR eine vergleichende, reproduzierbare Charakterisierung der mRNS-Expressionprofile in Larynxkarzinomzellen und Keratinozyten.

5.2 Reproduzierbarkeit differentiell exprimierter Genfragmente

Das in dieser Arbeit weiterführend analysierte, differentiell exprimierte Fragment zeigte nach Isolierung, Reamplifikation und Klonierung eine 99,3 % Sequenzhomologie mit einem Abschnitt der Exon 17 des GALC-Genes. Die Validität der DDRT-PCR konnte mittels erfolgreichem Nachweis des differentiellen Fragmentes in isolierter mRNA aus der Larynxkarzinomzelllinie UMSCC-10A über High stringency nested-PCR mit

sequenzspezifischen Primern bewiesen werden. Darüber hinaus bestätigte eine anschließende Analyse der GALC-mRNS Expression durch Northern-Hybridisierung reproduzierbar mit einem zwanzigfach schwächeren Hybridisierungssignal eine Repression in der Larynxkarzinomzelllinie und zwei SCC-Biopsaten im Vergleich zu der Keratinozytenzelllinie und zwei Biopsaten gesunder oraler Mucosa.

5.3 Bedeutung des Enzyms Galactocerebrosidase (GALC)

Der Nachweis einer verminderten GALC-Expression in malignen Tumorentitäten ist bislang nicht bekannt. Das von diesem Gen codierte Enzym konnte bisher weder mit der Genese noch mit der Progression von Tumorerkrankungen in direkte Verbindung gebracht werden. Nach Sequenzierung und eingehenden Genbankrecherchen hat sich gezeigt, daß es sich bei dem isolierten Fragment um den Teil eines funktionell wichtigen Genes handelt, das durch seine Rolle im Energiestoffwechsel der Zelle beim Krebsgeschehen von Bedeutung sein könnte. Es ist das Stoffwechsellenzym Galactocerebrosidase (GALC, E.C.3.2.1.46) kodierende Gen. Das GALC-Gen mit einer Länge von 60 kb ist auf Chromosom 14 lokalisiert und seine Struktur und Organisation wurde erstmalig 1995 von Luzi und Mitarbeitern beschrieben (Luzi et al., 1995). In weiteren Studien zeigte sich, daß das GALC-Gen im Vergleich mit anderen lysosomalen Enzymen besondere Charakteristika aufweist und somit eher den wachstumsgesteuerten Genen zugehörig ist, deren Transkription durch Zellwachstum stimuliert werden kann (Azizkhan et al., 1993). Von der GALC (Aliases: E.C.3.2.1.46, GALCERase, Galactosylceramidase, Galactocerebrosidase, Galactosylceramide beta-galactosidase, Galactocerebroside beta-galactosidase) sind zwei Formen bekannt, die durch alternatives Splicing entstehen (Rebhan et al., 2000). GALC gehört zur Familie der Glykosyl-Hydroxylasen, es katalysiert die lysosomale Hydrolyse von Galaktolipiden und Galaktosylceramiden (GalCer) (Luzi et al., 1995), so genannten Glykosphingolipiden (GSL). Dabei findet eine hydrolytische Spaltung der Galaktose-Ester-Bindungen statt (Rebhan et al., 2000).

5.4 Bekannte pathophysiologische Zusammenhänge der GALC

Veränderungen der GALC-Aktivität können bekanntermaßen mit einigen Krankheiten in kausalen Zusammenhang gesetzt werden. So ist zum Beispiel, wie verschiedene Studien zeigen, ein Mangel an GALC die Ursache der Globoidzellen-Leukodystrophie (GLD), Synonyme Krabbe-Syndrom oder Galactocerebroside-Lipidose (Chen, Y.Q., Wenger, D.A.,

1993; Chen et al., 1993; Luzi, P., Rafi, M.A., 1995; Sakai et al., 1994). Die GLD ist eine degenerative, autosomal rezessiv vererbte Krankheit des zentralen und peripheren Nervensystems. Sie gehört zur Gruppe der Sphingolipidosen (Brady 1983) und ist charakterisiert durch eine fortschreitende Demyelinisierung der Markscheiden (Barone et al., 1996). Aufgrund des Mangels an GALC kommt es zu einer Akkumulation von zytotoxischen Galaktosylsphingosinen (sog. Psychosinen) im Gehirn, die wahrscheinlich den Untergang der myelinproduzierenden Zellen und die Bildung der charakteristischen Globoidzellen bewirken (Luzi et al., 1997). Zugleich läßt sich jedoch keine abnormale Akkumulation von GalCer feststellen. Das zweite Schlüsselenzym des Metabolismus dieser einfachen, neutralen Glykoshingolipide ist die Galaktosylceramid Synthase (GalCS), die den letzten Schritt der Galaktosylceramid-Synthese katalysiert (Fitzgerald et al., 1970). Den verschiedenen Formen der GLD liegen wahrscheinlich sowohl unterschiedliche Mutationen des GALC-Gens als auch andere genetische Faktoren zu Grunde (De Gasperi et al., 1996; Furuya et al., 1997; Sakai et al., 1994).

5.5 Ursachen einer veränderten GALC-Genexpression

5.5.1 Struktur des Promotors und die Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der Genregulation

Das GALC-Gen wurde ursprünglich den sogenannten „*housekeeping*“-Genen, wie das Aktinrezeptor-, das Insulinrezeptor- oder GAPDH-Gen zugeordnet. Die „*housekeeping*“-Gene beschreiben eine große Gruppe von Genen, welche zur Aufrechterhaltung der zellulären Funktion in allen Gewebetypen konstitutiv exprimiert werden (Watson et al., 1965). Ihre Funktionen werden als essentiell für den vollständigen Ablauf des Zellzyklus betrachtet und ihre Aktivierung reicht von der fetalen Phase bis in die Adoleszenz (Warrington et al., 2000). Neuere Studien legen nahe, dass jeder Gewebetyp ein spezifisches Expressionsprofil dieser Gene aufweist (Zhang et al., 2004). Das GALC-Gen zeichnet sich unter anderem dadurch aus, dass es in seiner 5' flankierenden Region, welche für die Regulation des Gens verantwortlich ist, weder die für lysosomale Gene typische GC-box consensus Sequenzen, noch TATA- oder CAAT-Boxen aufweist (Sakai et al., 1998). Stattdessen sind in dem Promotorbereich besondere Erkennungssequenzen lokalisiert, die als Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wie SP1, AP2 oder YY1 dienen (Sakai et al., 1998). Verschiedene Studien zeigen eine Korrelation von gesteigerter Expression von SP1 mit der Expression von Genen, die an Wachstum und Metastasierung von Tumoren beteiligt sind (Safe et al., 2005). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Magen- und Pankreastumoren (Wang et al.,

2003; Shi et al., 2001), sowie DNS-abhängige Proteinkinasen in Colocarzinomen (Hosoi et al., 2004) können hier als Beispiele genannt werden. Die Bindung von SP1 im Promoterbereich führt typischerweise zu einer Expressionssteigerung des codierten Genbereiches (Li et al., 2004). In Anbetracht der nachgewiesenen Repression des GALC-Gens erscheint somit die Beteiligung von SP1 als Transkriptionsfaktor unwahrscheinlich. Dem Transkriptionsfaktor YY1 wird eine grundlegende Rolle in Prozessen der Embryogenese, der Differenzierung und des Zellwachstums zugewiesen, welche je nach Kontext sowohl über Aktivierung als auch Repression der Genexpression vermittelt werden (Gordon et al., 2006). Verschiedene Studien unterstützen die Hypothese, daß eine gesteigerte Expression von YY1 mit unkontrolliertem Zellwachstum, Resistenz gegen Apoptoseinduktion und gesteigerter Metastasierungsfähigkeit im Zusammenhang steht (Gordon et al. 2006). In Analogie zu der für YY1 beschriebenen Rolle als Inhibitor der p53-Genexpression (Leask et al., 1991; Sui et al., 2004; Yakovleva et al., 2004) können AP2 und YY1 als supprimierende Transkriptionsfaktoren für das GALC-Gen diskutiert werden.

5.5.2 Mutagenese und DNS-Metylierung des GALC-Gens

Als weitere Ursache für die veränderte GALC-Genexpression kommen Mutationen oder Deletionen im Promotorbereich in Frage. Die für eine Mutation besonders empfindlichen Bereiche sind die sog. GC-reichen Konsensus-Sequenzen. Wie vorausgehend beschrieben fehlen diese für *housekeeping*-Gene typischen Regionen dem GALC-Gen Promotor völlig, somit kann eine entsprechende Mutation mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Zur Bestätigung dieser Annahme amplifizierten Görögh und Mitarbeiter (Görögh et al., 1999) die Promotorregion des GALC-Gens aus Larynxkarzinomzellen und Keratinozyten. Durch vergleichende Sequenzierung ließen sich weder Mutationen, Deletionen noch Insertion von Basen im entsprechenden Promotorbereich finden.

Im Gegensatz dazu konnten Mutationen des codierenden Genbereiches als Ursache für die supprimierte GALC-Transkription in Larynxkarzinomzelllinien bisher nicht ausgeschlossen werden. Solche Mutationen sind beispielsweise für die Globoidzellen-Leukodystrophie (GLD), einer degenerativen Erkrankung des ZNS, in den ersten 10 Exons des GALC-Gen beschrieben worden (De Gasperi et al., 1996). Jedoch liegen bisher keine Hinweise vor, dass solche Mutationen des GALC-Gens auch in neoplastischen Zelllinien auftreten.

Ein hoher Methylierungsgrad der DNS bewirkt eine Repression der Genexpression. Eine geringere Methylierung aktiv transkribierter Gene hingegen verursacht eine Veränderung der DNS-Struktur, so dass diese entweder für aktivierende Proteine leichter zugänglich wird oder dass Repressorproteine von dem Gen dissoziieren (Badal et al., 2004; Huttley 2004; Weissbach et al., 1989; Antequera et al., 1990). Um den Methylierungsgrad der DNS festzustellen, setzt man Restriktionsenzyme ein, in deren Erkennungssequenz ein CG-Basenpaar vorkommt. Die Methylierung der DNS als verantwortliches Ereignis für die veränderte Promotoraktivität im GALC-Gen konnte in den Studien von Görögh und Mitarbeitern (Görögh et al., 1999) jedoch ebenfalls ausgeschlossen werden, da die in den Transfektionsversuchen verwendeten Promotoren mittels PCR unter Methylase-freien Bedingungen amplifiziert werden konnten.

5.6 Mögliche Implikationen des GALC-Katabolismus zum Tumorgeschehen

Eine Schlüsselstellung der vom GALC-Enzym umgesetzten Substrate und Produkte an malignen Transformations-, sowie Wachstums- und Regulationsvorgängen ist bekannt. Deshalb sollen die Reaktionskomponenten hier genauer betrachtet werden. Dies sind das Galaktosylceramid als Substrat, das Ceramid als kataboles Produkt, sowie die Galaktocerebrosid Synthase als Enzym der Synthese und die Saposine als aktivierende Enzyme.

5.6.1 Das Substrat: Galaktosylceramid (GalCer)

GalCer ist ein amphiphiles Glykolipid aus der Gruppe der Glykosphingolipide (GSL), welche zusammen mit den Glykoproteinen (GP) als Bestandteil der Plasmamembran die Kohlenhydratschicht der Zelloberfläche, die Glykocalix bilden. Die hydrophobe Komponente des GalCer, das Ceramid, besteht aus dem langkettigen Alkohol Sphingosin, dessen Aminogruppe mit einer langkettigen Fettsäure acyliert ist. Der polare Anteil wird durch Serin und Galaktose gebildet. Die De-novo-Synthese der GSL erfolgt an intrazellulären Membranen des endoplasmatischen Reticulums und des Golgi-Aparates und über Exocytose erreichen sie die Plasmamembran. Nach Endozytose erfolgt in den Lysosomen die Auftrennung der Plasmamembran in Ihre Bestandteile. Der GSL-Einstrom und die maximale Abbaukapazität (V_{max}) in den Lysosomen sind wesentliche Parameter, die für den Verlauf menschlicher Erbkrankheiten mit Defekten im Sphingolipid-Abbau bestimmend sind. Zusätzlich können

GSL auch aus den im Cytosol befindlichen Bausteinen des lysosomalen Abbaus über einen Recycling-Prozess gebildet werden (siehe Abb. 7).

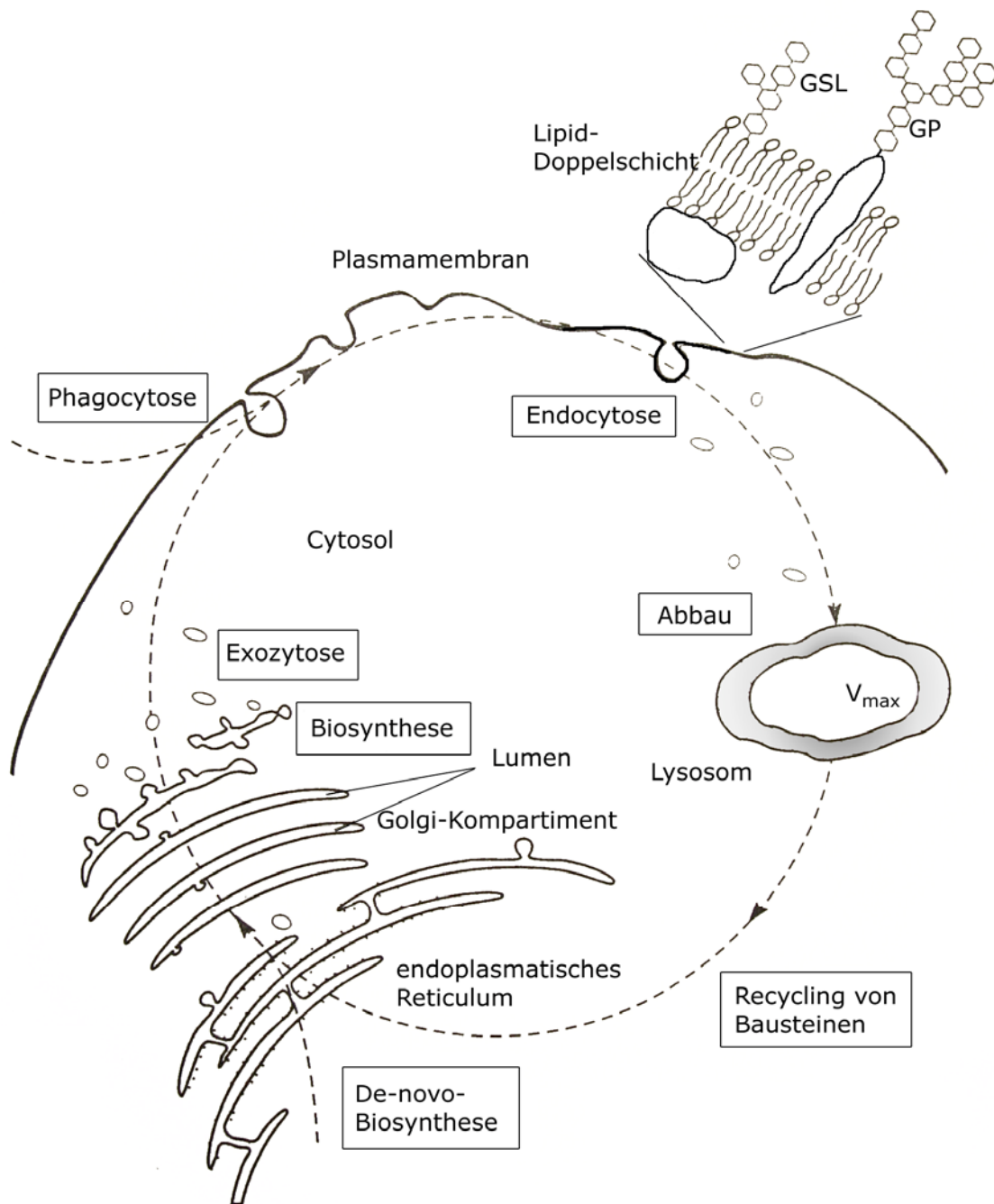


Abb.7:

Stoffwechselfluss der Glykosphingolipide nach Kolter et al. (1999).

Die GSL spielen eine wichtige Rolle bei interzellulären Zellkommunikationsvorgängen und Interaktionen zwischen Zelle und Extrazellulärmatrix, wie Adhäsion (Varki, 1993), Differenzierung, Wachstum, Apoptosis und Antigen-Oberflächen-Erkennung (Hakomori et

al., 1981; Marcus et al., 1984; Hakomori et al., 1984; Hakomori et al., 1992). Darüber hinaus können sie als Bindungsstellen für Toxine, Viren (Markwell et al., 1981) und Bakterien (Karlsson, 1989) fungieren.

GSL sind schon in mehrfacher Hinsicht auf ihre Rolle bei malignen Prozessen untersucht worden (Hakomori et al., 1996; Fish et al. 1996; Hakomori et al., 1994; Tai et al., 1992). Bei maligne transformierten Zellen ändern sich das Membranprofil und die Organisation ihrer Glykosphingolipide. Es kommt zur Akkumulationen von Synthesestufen und zu veränderten Interaktionen der transformierten Zellen mit dem Immunsystem. Manche dieser Synthesestufen wirken immunogen (Hakomori et al., 1995). Die abweichende Expression von Glykosphingolipiden ist ein generelles Merkmal in allen Arten von malignen Tumoren. (Hakomori et al., 1996). Sie führt zur Bildung von tumor-assoziierten Antigenen, so genannten TACAs (tumor-associated carbohydrate antigens) (Hakomori 1984; Hakomori 2001). Diese sind die Basis einer Veränderung des Adhäsionsverhaltens der Zellen zugunsten ihrer Metastasierungsfähigkeit und Invasivität. Die veränderte Expression bewirkt zusätzlich eine Modulation transmembranöser Signalvorgänge sowie den Verlust der Wachstumskontrolle (Hakomori 1992, Kobata et al., 2005). Obwohl sich diese Vorgänge in allen Tumorentitäten beobachten lassen, konnten bisher die Ursachen einer abweichenden Expression von GSL und die biochemischen Mechanismen, welche eine Metastasierung und Invasivität von Tumoren fördern oder hemmen nicht hinreichend geklärt werden (Kolter 1999; Hakomori 2001). Eine verminderte Expression des GALC-Gens könnte diese hohe Glycosphingolipid-Konzentration bei Karzinomzellen erklären.

5.6.2 Das katabole Produkt: Ceramide

Ceramide sind zusammen mit D-Galaktose die katabolen Produkte der lysosomalen GSL-Hydrolyse durch GALC. Ein weiterer kataboler Entstehungsweg ist Ihre Abspaltung aus Sphingomyelin durch das Enzym Sphingomyelinase. Ihre Synthese erfolgt zum einen de-novo und zum anderen aus Cerebrosiden durch Cerebrosidase. Als Hauptquellen der Ceramidebildung werden die Sphingomyelinasen und die De-novo-Synthese angesehen. Einen Überblick des Ceramide-Stoffwechsels gibt Abbildung 8.

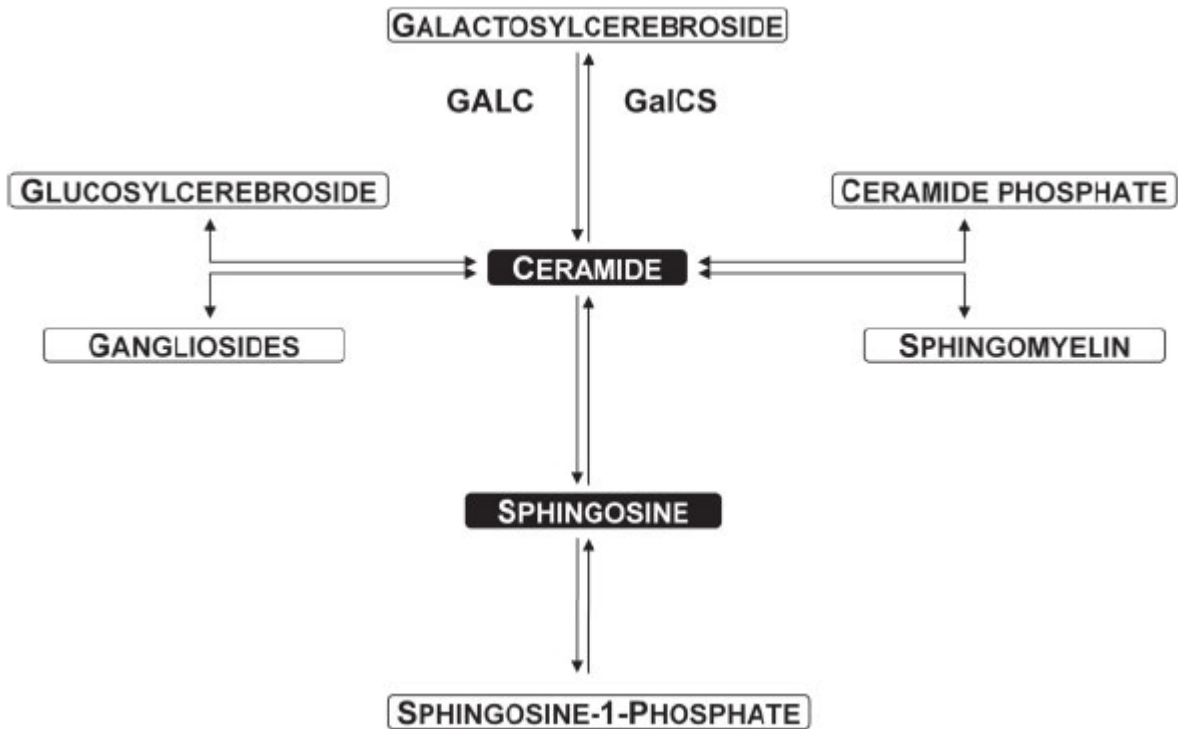


Abb.8:

Synthesewege und Stoffwechselfvorgänge unter Beteiligung von Ceramiden

Eine Stimulation der Ceramidbildung ließ sich *in-vitro* durch exogene Aktivatoren, wie TNF-alpha, Endotoxin, Interferon-gamma, Interleukin 1, Serumentzug, Mediumwechsel, Chemotherapeutika, Ionisierende Strahlung und Hitze nachweisen (Saba et al., 1996). Nach erfolgter Stimulation gibt es eine akute Phase der Ceramid-Akkumulation über Sphingomyelinasen mit dem Synthesort an der inneren und äußeren Seite der Zellmembran (Linadric et al., 1994; Liu et al., 1995; Hannun et al., 2001) und eine lang andauernde Phase, deren Synthesort ungeklärt ist. Eine Umwandlung der Ceramide in weniger toxische Substanzen findet entweder über Glykolysierung zu GalCer oder anderen Gangliosiden, Alkylierung oder Abbau zu Sphingosin mit nachfolgender Phosphorylierung zu dem anti-apoptotischen Sphingosin-1-Phosphat statt (Reynolds et al., 2004). Der Einfluss der Ceramide als wichtiger intrazellulärer Mediator wirkt sich fördernd auf Prozesse wie Wachstumshemmung, Differenzierung, Apoptosis und Zellalterung aus (Wolff et al., 1994). Dabei dienen sie eher als Integrator vieler Stimuli, der das Gesamtmaß an Stress reflektiert, dem die Zelle ausgesetzt worden ist (Hannun et al., 1996). Es sind jedoch auch schon direkte Signalwege der Apoptose, wie die T-Zell-Rezeptor vermittelte Ceramidbildung durch

Aktivierung von Sphingomyelinasen gezeigt worden (Tonetti et al., 1999). Neue Arbeiten betrachten Ceramide mittlerweile als einen zentralen, sekundären Messenger der Apoptose (Gomez-Munoz 2006). Chi und Mitarbeiter zeigten bei Larynxkarzinomen in einer retrospektiven Studie von Gewebeproben an 178 Patienten einen deutlich abnehmenden Ceramidegehalt von gesunder laryngealer Schleimhaut über Leukoplakien bis zu dem Karzinomgewebe (Chi et al., 2004). Weil sie auf diese bedeutsamen physiologischen Vorgänge Einfluß nehmen, ist die Beteiligung der Ceramide am Erhalt der zellulären Homöostase und damit besonders am Schutz der Zellen vor maligner Transformation denkbar.

5.6.3 Galaktocerebrosid Synthase (GalCS)

Das Enzym Galaktocerebrosid Synthase (GalCS, galaktosylcerebroside synthase, 5'-diphosphat-galaktoseceramid-galaktosyltransferase, 2-hydroxyacylsphingosin 1- β -galaktosyltransferase, EC 2.4.1.45) katalysiert die Synthese von GalCer aus Ceramid und UDP- β -Galaktose (Kudo et al., 1995; Yonemasu et al., 1998).

Nicht nur ein reduzierter Abbau durch Suppression der GALC, sondern eine gesteigerte Synthese über eine Induktion der GalCS könnte für eine abweichende GSL-Expression bei Tumorzellen möglich sein. Eine erhöhte Aktivität der GalCS gekoppelt mit einer gesteigerten Ceramid-Verwertung ist bisher *in-vitro* an Tumorzelllinien nach Behandlung mit Chemotherapeutika (Doxorubicin, Etoposid) nachgewiesen worden (Liu et al., 1999; Gouaze et al., 2004). Untersuchungen von Kok und Mitarbeitern zeigten an einer chemotherapeutikaresistenten Colonkarzinomzelllinie bei gleichzeitiger Expression eines speziellen Proteins einen erhöhten Gehalt an Glukosylceramid und GalCer bei erniedrigtem Gehalt an Ceramid (Kok et al., 2000). In weiterführenden Studien konnte hier jedoch keine vermehrte Expression oder Enzymaktivität der GalCS nachgewiesen werden (Klappe et al., 2004).

5.6.4 Sphingolipid Aktivator Proteine (Saposine)

Viele Enzyme, die für den Abbau von Sphingolipiden verantwortlich sind, benötigen die Anwesenheit der Saposine. Nur zwei Gene codieren für die bisher bekannten fünf Saposine. Das erste ist auf Chromosom 5 lokalisiert und trägt die genetische Information für das GM₂-Aktivator-Protein und das zweite ist auf Chromosom 10 lokalisiert und codiert für die anderen

vier Saposine (A, B, C und D). Sie werden aus einem gemeinsamen Precursor-Polypeptid (Prosaposin) synthetisiert, aus dem durch proteolytische Spaltung in den Lysosomen vier unabhängige aber strukturell ähnliche Proteine entstehen (Sandhoff, K., Harzer, K., et al., 1995). Zwei unterschiedliche Wirkungsmechanismen dieser Aktivatoren sind bekannt. Saposin B wirkt über eine Lockerung des Ceramide-Anteiles der membranständigen GSL und erleichtert so den GSL-Hydrolasen den Zugang zu den Glykosylgruppen (Sandhoff et al., 2001). Andere Aktivatoren wie z.B. Saposin C bilden mit den GSL-Hydrolasen einen Enzym-Aktivator-Komplex mit gesteigerter Effektivität in der Hydrolyse der Sphingolipide (Harzer et al., 1997; Sandhoff et al., 2001). Bei der GALC sind Saposin A und C für die Aktivierung und Effektivitätssteigerung verantwortlich (Hazer et al., 1997). Einzelne Studien zeigen für Prosaposin und Saposin C bei Prostata-Krebs ein gesteigertes Vorkommen und Expression, sowie fördernde Effekte hinsichtlich Wachstum, Migration, Invasivität, Aktivierung von Signal-Kaskaden und Hemmung der Apoptose (Lee et al., 2004; Koochekpour et al., 2005). Für Larynxkarzinome liegen zur Zeit allerdings noch keine Daten zum Transkriptionsstatus oder der Enzymaktivität von Saposinen vor, welche eine posttranslationale Suppression der GALC mit verminderter Aktivität ausschließen oder befürworten könnten.

5.7 Beziehung des GALC Katabolismus zur Regulation der Ca^{2+} -Homöostase

Es ist bekannt, daß der Umsatz der Lipide, speziell auch der Sphingosine im Stoffwechsel von Zellen ganz allgemein eine Rolle spielt. Berridge und Mitarbeiter (Berridge et al., 1995); Michel et al., 1997) erkannten, daß externe Signale den Lipidumsatz stimulieren und dieser eng mit der Freisetzung von Kalzium in der Zelle verknüpft ist. Da Zellen ihren Gehalt an Lipiden, wie Sphingosin (Merril et al., 1991; Wilson et al., 1986) und Cerebrosiden regulieren können, kann gefolgert werden, daß eine Veränderung im Lipid-Umsatz von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Kalzium-Homöostase sein könnte. Bei akuten und chronischen Krankheiten, wie Schock, Herzinfarkt und Apoplexie, sowie Krebs, Alzheimerscher Erkrankung und anderen Störungen des Nervensystems wurden eindeutige Zusammenhänge zur Veränderungen im Kalziumstoffwechsel gefunden. Die Deregulierung des Kalziums spielt eine zentrale Rolle als Vermittler und Signalereignis bei der Karzinogenese und dem Programmierten Zelltod (Apoptose) (Trump et al., 1995). Über ihre Beteiligung an der Regulation der Kalzium-Homöostase, läßt sich demnach zwischen dem Enzym-GALC und dem Tumorwachstum eine Verbindung herstellen. Diese Annahme findet weiterhin Unterstützung durch folgende Studienergebnisse. Bei exprimierten GalCer in der

Zellmembran von kultivierten Oligodendrozyten, als auch Gliomazelllinien, ließ sich, ausgelöst durch GalCer-Antikörper, eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels feststellen. Man vermutet sowohl eine Beeinflussung spannungsabhängiger als auch spannungsunabhängiger transmembranöser Kalziumkanäle, sowie intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher über unterschiedliche second messenger Signalwege (Joshi et al 1992; Dyer et al., 1990; Joshi et al., 1997).

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Dissertation war Teilaspekte der Zusammenhänge der Karzinogenese und den Stoffwechsel maligne transformierter Zellen am Beispiel von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes dazustellen. Aus diesem Grunde wurde mittels der Differential Display Methode das aktive mRNA Expressionsprofil von etablierten Plattenepithelkarzinomzelllinien des Larynx und benignen Keratinozytenzelllinien zur vergleichenden Genanalyse untersucht.

Die isolierte mRNA wurde revers transkribiert, die entstandene cDNA Population in einer DDRT-PCR Reaktion radioaktiv markiert und mit einer Primerkombination von einem der 26 dekamer Upstream-Primer und einem der 12 Oligo-T Downstream-Primer amplifiziert. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplikons zeigte im Mittel 80-120 differenzierbare cDNA-Fragmente pro Primerkombination und Zelllinie.

Bei der vergleichenden Auswertung der Bandenmuster der autoradiographisch nachgewiesenen cDNA Fragmente ließ sich neben der weitgehenden Übereinstimmung zwischen den Zelllinien ein Fragment identifizieren, dessen Expression in den Plattenepithelkarzinomzelllinien deutlich reduziert war. Nach erfolgter Isolierung, Reamplifikation, Klonierung und Sequenzierung konnte das 148 bp große Fragment bei 99,3 %-iger Homologie einem kodierenden Abschnitt des GALC-Gens zugeordnet werden.

Die Konstanz der differentiellen Expression der GALC-mRNA in Plattenepithelkarzinomen des Larynx ließ sich mittels vergleichender Northern-Hybridisierung in Zelllinien und Biopsaten bestätigen.

In dieser Arbeit zeigt sich erstmalig eine mögliche Beteiligung der GALC in der Karzinogenese von Larynxkarzinomen auf Transkriptionsebene. Eine Verschiebung des Stoffwechselgleichgewichtes zwischen GalCer und Ceramiden durch reduzierte GALC-Expression könnte über eine Akkumulation von Synthesestufen und abweichende Expression von GSL sowie eine gesteigerte Umsatz von Ceramiden zur Inhibition der Apoptose, Verlust einer adhäsionsvermittelten Wachstumskontrolle und gesteigerter Motilität führen.

Am wahrscheinlichsten für eine unterschiedliche GALC-Genexpression in den SCC Zellen im Vergleich mit den Keratinozyten erscheint eine Repression über Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel YY1 und AP2. Weitergehende Analysen der Kontrolle der Genexpression und der beteiligten Stoffwechselwege wären notwendig um diese Vermutungen zu bestätigen.

7. Literaturverzeichnis

Amselgruber, W.M., Sinowatz, F., Kollé, S., Lincoln, D.T., and Kayser, K. (1995): Expression of galactosyltransferase in prostatic tumors. *Nutrition*, 11: 638-642.

Antequera, F., Boyes, J., Bird, A. (1990): High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell*, 62: 503-514.

Anwar, K., Nakakuki, K., Nakai, K., Inuzuka, M. (1993): Ras gene mutations and HPV infection are common in human laryngeal carcinoma. *Im. J. Cancer*, 53: 22-28.

Azizkhan, J.C., Jensen, D.E., Pierce, A.J., Wada, M. (1993): Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 3(4):229-54.

Barone, R., Bruhl, K., Stoeter, P., Fiumara, A., Pavone, L., Beck, M. (1996): Clinical and neuroradiological findings in classic infantile and late-onset globoid-cell leukodystrophy (Krabbe Disease). *Am J Med Genet* 64, 209-217.

Bassam, B.J., Bentley, S. (1995): Electrophoresis of polyester-backed polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 19: 568-70, 572-3.

Basset, P., Beloc, J.P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J.M., Podhajcer, O.L., Chenard, M.P., Rio, M.C., Chambon, P. (1990): A novel metalloproteinase gene specially expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*, 348(6303): 699-704.

Badal, S., Badal, V., Calleja-Macias, I.E., Kalantari, M., Chuang, L.S., Li, B.F., Bernard, H.U. (2004): The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology* 324:483–92.

Batsakis, J.G. (1979): Tumors of the Head and Neck-clinical and pathological consideration, 2nd ed., Williams and Wilkins, Baltimore, S. 144-176.

Bauer, D., Müller, H., Reich, J., Riedel, H., Ahrenskiel, V., Warthoe, P. (1993): Identification of differential expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.*, 21: 4272-80.

Bauer, D., Warthoe, P., Rode, M., Strauss, M. (1994): Detection and differential display of expressed genes by DDRT-PCR. *PCR Methods Appl.*, 4: 97-108.

Berra, B., Colombo, I., Monteggia, E., Montorfano, G., Moretti, S., Rapelli, S., Sottocornola, E. (1997): Glycosphingolipid expression in solid tumours and transformed cell lines. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 34: 170-177.

Blitzer, P.H. (1988): Epidemiology of the head and neck cancer. *Semin. Oncol.* 15, 2-9.

Berridge, M.J. (1986): Cell signalling through phospholipid metabolism. *J. Cell Sci. Suppl.*, 4: 137-53.

Boubelic, M., Floryk, D., Bohata, J., Draberova, L., Macak, J., Smid, F., Draber, P. (1998): Glycosphingolipids-mediated cell aggregation. *Glycobiology*, 8: 139-146.

Bradford, M. M.(1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

Brady, R.O. (1983): *The Metabolic Basis of inherited Disease*, Stansbury J.B., Wyngaarden, J.B, Frederikson D.S., Goldstein J.L., Brown M.S., Eds. (Mac Graw-Hill, New York).

Bron, L., Monnier, P. (1995): Molecular alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Otolaryngol.*, 20: 291-8.

Carey, T.E. (1994): Head and neck tumor cell lines. In: R.J. Hay J.G. Park and A. Gazdar (eds.), *Atlas of human tumor cell lines*, pp. 79-117. San Diego, Academic Pres.

Chen, Y.Q., Wenger, D.A. (1993): Galactocerebrosidase from human urine: purification and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1: 53-56.

Chen, Y.Q., Rafi, M.A., de Gala, G., Wenger, D. A. (1993): Cloning and expression of cDNA encoding human galactocerebrosidase, the enzyme deficient in globoid cell leukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, 11: 1841-1845.

Cho, S.K., Yeh, J., Cho, M., Cummings, R.D. (1996): Transcriptional regulation of alpha 1,3-galactosyltransferase in embryonal carcinoma cells by retinoic acid. Masking of Lewis X antigens by alpha-galactosylation. *J. Biol. Chem.*, 271: 3238-3246.

Cole, K.A., Chuaqui, R.F., Katz, K., Pack, S., Zhuang, Z., Cole, C.E., Lyne, J.C., Linehan W.M., Liotta, L.A., Emmert-Buck, M.R. (1998): cDNA sequencing and analysis of POV1 (PB39): a novel gene up-regulated in prostate cancer. *Genomics*: 51(2):282-7.

De Gasperi, R., Sosa, M. A. G., Sartorato, E. L., Battistini, S., MacFarlane, H., Gusella, J. F., Krivit, W., Kolodny, E. H. (1996): Molecular heterogeneity of late-onset forms of globoid-cell leukodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 1233-1242.

Dyer CA, et al. (1991): Galactocerebroside and sulfatide independently mediate Ca²⁺ responses in oligodendrocytes. *J Neurosci Res.* 30(4): 699-711.

Fantini, J., Garmy, N., Mahfoud, R., and Yahi, N. (2002): Lipid rafts : structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Rev. Mol. Med.* 1-22.

Fitzgerald, D.K., Brodbeck, U., Kiyosawa, I., Mawal, R., Colvin, B., and Ebner, K.E. (1970): Alpha-lactalbumin and the lactose synthetase reaction. *J. Biol. Chem.*, 8: 2103-2108.

Franceschi, S., Bidoli, E., Negri, E., Barbone, F., La Vecchia, C. (1994): Alcohol and cancer of the upper aerodigestive tract in men and women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 3, 299-304.

Furuya, H., Kukita, Y., Nagano, S., Sakai, Y., Yamashita, Y., Fukuyama, H., Inatomi, Y., Saito, Y., Koike, R., Tsuji, S., Fukumaki, Y., Hayashi, K., Kobayashi, T. (1997): Adult onset globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease): analysis of galactosylceramidase cDNA from four Japanese patients. *Hum. Genet.* 100(3-4): 450-6.

- Gissmann, L. (1988): Linking HPV to cancer. *Clin. Obstet. Gynecol.* 32, 141-147.
- Gomez-Munoz A. (2006): Ceramide 1-phosphate / ceramide, a switch between life and death. *Biochim Biophys Acta.* May 19.
- Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H., Bonavida, B. (2006): Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene*, 25(8):1125-42.
- Gorelik, E., Duty, L., Anaraki, F., Galili, U. (1995): Alterations of cell surface carbohydrates and inhibition of metastatic property of murine melanomas by alpha 1,3 galactosyltransferase gene transfection. *Cancer Res.*, 55: 4168-4173.
- Görögh, T., Lippert, B.M., Gottschlich, S., Niemann, A.M., Weller, M., Seiwerts, M., Weber, E., Werner, J.A. (1997): Inhibited expression of fibronectin in laryngeal squamous cell carcinomas. *Eur. J. Cancer* 33: 186.
- Görögh, T., Rudert, H., Lippert, B.M., Gottschlich, S., Maune, S., Heidorn, K., Maass, J., Hoffmann, M., Meyer, J.E., Rathcke, I.O., Folz, B.J., Hortobagyi, T., Werner, J.A. (1999): Transcriptional repression of the human galactocerebrosidase gene in squamous cell carcinomas of the larynx. *Int J Cancer.* 83(6): 750-4.
- Gottschlich S., Görögh, T., Lippert, B.M., Song, X., Wilms, T., Folz, B.J., Order, B., Werner, J.A. (1997): Differential expression of mRNA in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Eur. J. Cancer* 33: 185.
- Gouaze, V., Yu, J.Y., Bleicher, R.J., Han, T.Y., Liu, Y.Y., Wang, H., Gottesman, M.M., Bitterman, A., Giuliano, A.E., Cabot, M.C. (2004): Overexpression of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 3(5):633-9.
- Guimaraes, M.J, Lee, F., Zlotnik, A., McClanahan, T. (1995): Differential Display by PCR: novel findings and applications. *Nucl. Acids Res.* 23(10): 1832-1833.

Hakomori, S. (1981): Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. In: C. Richardson. (ed), Annual Review of Biochemistry, pp. 764-773. Palo Alto: Annual Reviews Inc.

Hakomori, S. (1984): Tumor-associated carbohydrate antigens. In: E. Paul. (ed), Annual Review of Immunology, pp. 103-126. Palo Alto: Annual Review Inc.

Hakomori, S. (1992): Functional role of glycosphingolipids in tumor progression. *Tohoku J. Exp. Med.*, 168: 211-222

Hakomori, S. (1994): Role of gangliosides in tumor progression. *Prog. Brain Res.*, 101: 241-50.

Hakomori, S. (1996): Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res.* 56(23):5309-18.

Hakomori S. (2001): Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol.* 491:369-402.

Hakomori, S., Zhang, Y. (1997): Glycosphingolipid antigens and cancer therapy. *Chem Biol* 4: 97-104.

Hannun, Y.A. (1996): Functions of Ceramide in Coordinating Cellular Responses to Stress. *Science* 274: 1855-1859.

Hannun, Y.A., Luberto, C., Argraves, K.M. (2001): Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry* 40: 4893–4903.

Harzer, K., Paton, B.C., Christomanou, H., Chatelut, M., Levade, T., Hiraiwa, M., O'Brien, J.S. (1997): Saposins (sap) A and C activate the degradation of galactosylceramide in living cells. *FEBS Lett* 417:270–4.

Hosoi, Y., Watanabe, T., Nakagawa, K., Matsumoto, Y., Enomoto, A., Morita, A., Nagawa, H., Suzuki, N. (2004): Up-regulation of DNA-dependent protein kinase activity and Sp1 in colorectal cancer. *Int J Oncol.*; 25(2): 461-8.

Huttley, G. (2004): Modeling the impact of DNA methylation on the evolution of BRCA1 in mammals. *Mol Biol Evol*, 21:1760–8.

Johnson, N. (2001): Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ.* 65(4):328-39.

Joshi, P.G., Mishra, S. (1998): A novel type of Ca²⁺ channel in U-87 MG cells activated by anti-galactocerebroside. *Life Sci.* 62(5): 469-77.

Joshi, P.G., Mishra, S. (1992): Galactocerebroside mediates Ca²⁺ signalling in cultured glioma cells *Brain Res.* 597 (1): 108-113.

Karlsson, K.A. (1989): Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 309-350.

Kalikin, L.M., Sims, L.H., Petty, E.M. (2000): Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics*, 63(2): 165-72.

Kapitonov, D., Yu, R.K. (1997): Cloning, characterization, and expression of human ceramide galactosyltransferase cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232(2): 449-53.

Klappe, K., Hinrichs, J.W., Kroesen, B.J., Sietsma, H., Kok, J.W. (2004): MRP1 and glucosylceramide are coordinately over expressed and enriched in rafts during multidrug resistance acquisition in colon cancer cells. *Int J Cancer* 110:511–22.

Kobata, A., Amano, J. (2005): Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours. *Immunol Cell Biol.* 83(4):429-39.

Kok, J., Veldman, R.J., Klappe, K., Koning, H., Filipeanu, C.M., Muller, M. (2000): Differential expression of sphingolipids in MRP1 overexpressing HT29 cells. *Int J Cancer* 87:172–8.

Kolter, T., Sandhoff, K. (1999): Sphingolipide – ihre Stoffwechselwege und die Pathobiochemie neurodegenerativer Erkrankungen. *Angew. Chem.* 111: 1632-1670

Kolter, T., Sandhoff, K. (2005): PRINCIPLES OF LYSOSOMAL MEMBRANE DIGESTION: Stimulation of Sphingolipid Degradation by Sphingolipid Activator Proteins and Anionic Lysosomal Lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:81-103.

Koochekpour, S., Zhuang, Y.J., Beroukhim, R., Hsieh, C.L., Hofer, M.D., Zhau, H.E., Hiraiwa, M., Pattan, D.Y., Ware, J.L., Luftig, R.B., Sandhoff, K., Sawyers, C.L., Pienta, K.J., Rubin, M.A., Vessella, R.L., Sellers, W.R., Sartor, O. (2005): Amplification and overexpression of prosaposin in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 44(4):351-64.

Kudo, T., Narimatsu, H. (1995): The beta 1,4-galactosyltransferase gene is post-transcriptionally regulated during differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells. *Glycobiology,* 5: 397-403.

Kukita, Y., Furuya, H., Kobayashi, T., Sakai, N. and Hayashi, K. (1998): Characterization of GALC gene in three Japanese patients with adult-onset Krabbe disease. *Genetic Testing,* 1: 217-223.

Lane, D.P. (1992): Cancer, p53 guardian of the genome. *Nature,* 358:15-16.

Leask, A., Byrne, C., Fuchs, E. (1991): Transcription factor AP2 and its role in epidermal-specific gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:7948–52.

Lee SW, Tomasetto C, Sager R. (1991): Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(7):2825-9.

- Lee, T.J., Sartor, O., Luftig, R.B., Koochekpour, S. (2004): Saposin C promotes survival and prevents apoptosis via PI3K/Akt-dependent pathway in prostate cancer cells. *Mol Cancer*. 17;3:31.
- Liang, P., Averboukh, L., Keyomarsi, K., Sager, R., Pardee, A.B. (1992): Differential display and cloning mRNAs from breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Research*, 52: 6966-8.
- Liang, P., Averbroukh, L., Pardee, A.B. (1993): Distribution and cloning of eucaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimisation. *Nucleic Acids Res*, 21: 3269-75.
- Liang, P., Pardee, A.B. (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257: 967-71.
- Liang, P., Pardee, A.B. (2003): Analysing differential gene expression in cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(11):869-76.
- Liisa, E., Joensuu, H., Kulmala, J., Klemi, P., Grenman, R. (1995): Squamous cell carcinoma is highly sensitive to taxol, a possible new radiation sensitizer. *Acta Otolaryngol.*, 115: 340-44.
- Li, L., He, S., Sun, J.M., Davie, J.R. (2004): Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol*. 82:460–71.
- Linadric, C.M, Hannun, Y.A (1994): Identification of a distinct pool of sphingomyelin involved in the sphingomyelin cycle. *J Biol Chem*. 269, 23530.
- Liu, P.S., Anderson, R.G.W. (1995): Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J. Biol. Chem*. 270, 27179-85.
- Liu, Y.Y., Han, T.Y., Giuliano, A.E., Cabot, M.C. (1999): Expression of glucosylceramide synthase, converting ceramide to glucosylceramide, confers adriamycin resistance in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 274(2):1140-6.

Lucci, A., Aho, W.I., Han, T.Y., Giuliano, A.E., Morton, D.L., Cabot, M.C. (1998): Glycosylceramide: a marker for multiple-drug resistant cancers. *Anticancer Res.*, 18: 475-480.

Luzi, P., Victoria, T., Rafi, M.A., Wenger, D.A. (1997): Analysis of the 5' Flanking Region of the Human Galactocerebrosidase (GALC) Gene. *Biochem Mol Med*, 62: 159-164.

Luzi, P., Rafi, M.A., Wenger, D.A. (1995): Structure and organization of the human galactocerebrosidase (GALC) gene. *Genomics*, 26: 407-409.

MacGowan, R., Campbell, R., Peterson, A., Sapienza, C. (1989): Cellular mosaicism in the methylation and expression of hemizygous loci in the mouse. *Gene and Devel.*, 3: 1669-1676.

Manda, R., Koho, T., Matsuno, Y., Takenoshita, S., Kuwano, H., Yokota, J. (1999): Identification of genes (SPON2 and C20orf2) differentially expressed between cancerous and noncancerous lung cells by mRNA differential display. *Genomics*, 61(1): 5-14.

Marcus, D.M. (1984): A Review of the immunogenic and immunomodulatory properties of glycosphingolipids. *Mol Immunol.*, 21: 1083-1091.

Markwell, M.A.K., Svennerholm, L., Paulson, J.C. (1981): Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus. *Proc. Natl. Acad Sci USA* , 78: 5406-5410.

Matsuda, J., Vanier, M.T., Saito, Y., Tohyama, J., Suzuki, K. (2001): A mutation in the saposin A domain of the sphingolipid activator protein (prosaposin) gene causes a late-onset, slowly progressive form of globoid cell leukodystrophy in the mouse. *Hum Mol Genet* 10:1191-9.

Mattie, M., Gary, B., Spiegel, S. (1994): Sphingosine-1-phosphat, a putentative second messenger, mobilizes Calcium from internal stores via an Inositol-Triphosphate-independent pathway. *J Biol Chem*, 269(5): 3181-3188.

McClelland, M., Chada, K., Welsh, J., Ralph, D. (1993): Arbitrary primed PCR fingerprinting applied to mapping differentially expressed genes. In: Pena, S.D., Chakrobarty, R., Epplen, J.T., Jeffereys, A.J., eds: DNA fingerprinting: State of the science symposium. Basel. Birkenhauser, 103-15.

McKaig, R. G., Baric, R. S., Olshan, A. F. (1998): Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head and Neck*, 20: 250-265.

Merril, C.R., Goldmann, D., Sedman, S.A., Ebert, M.H. (1981): Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variations in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211, 1437-1438.

Merrill, A. H. Jr. (1991): Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. *J Bioenerg Biomembr.* 1991 Feb;23(1):83-104.

Miller, R.A., Galecki, A., Shmookler-Reis, R.J. (2001): Interpretation, design, and analysis of gene array expression experiments. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 56(2):B52-7.

Ozaki, K., Nagata, M., Suzuki, M., Fujiwara, T., Ueda, K., Miyoshi, Y., Takahashi, E., Nakamura, Y. (1998): Isolation and characterization of a novel human lung-specific gene homologous to lysosomal membrane glycoproteins 1 and 2: significantly increased expression in cancers of various tissues. *Cancer Res.* 58(16):3499-503.

Parkin, D.M., Laara, E., Muir, C.S. (1988): Estimates of worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int. J. Cancer* 41, 184-197.

Ralp, D., McClelland, M., , Welsh, J. (1993): RNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR identifies regulated RNAs in mink lung (My1Lu) cells growth arrested by transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 10710-14.

Rebhan, M., Chalifa-Caspi, V., Prilusky, J., Lancet, D. (2000): GeneCards: encyclopedia for genes, proteins and diseases. Weizmann Institute of Science, Bioinformatics Unit and Genome Center (Rehovot, Israel), 1997. GeneCard for (GALC). (25 Feb 2000) World Wide Web URL: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GALC>).

Reynolds, C., Maurer, B.J., Kolesnick, R.N. (2004): Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett* 206:169–80.

Rohde, M., Hummel, R., Pallisgaard, N., Podstufka, T., Riedel, H., Leffers, H., Strauss, M. (1997): Identification and cloning of differentially expressed genes by DDRT-PCR. *Methods Mol Biol.* 67:419-30.

Russell, W.C., Newman, C., Williamson, D.H. (1975): A simple technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasma and viruses. *Nature (Lond.)*, 253: 461-462.

Saba, J.D, Obeid, L.M., Hannun, Y.A. (1996): Ceramide: an intracellular mediator of apoptosis and growth suppression. *Philos. Trans. R. Soc. London. B. Biol. Sci.*, 351(1336): 233-40.

Safe, S., Abdelrahim, M. (2005): Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer.* 41(16):2438-48.

Saffran, S., Görögh, T., Lippert, B.M., and Werner, J.A. (1997): Cultivation of human keratinocytes of the upper aerodigestive tract. *Laryngo. Rhino. Otol.*, 76: 101-105.

Sakai, N., Fukushima, H., Inui, K., Fu, L., Nishigaki, T., Yanagira, I., Tatsumi, N., Ozono, K., and Okada, S. (1998): Human galactocerebrosidase gene: promoter analysis of the 5'-flanking region and structural organization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1395: 62-67.

Sakai, N., Inui, K., Fujii, N., Fukushima, H., Nishimoto, J., Yanagihara, I., Isegawa, Y., Iwamatsu, A., and Okada, S. (1994): Krabbe disease. Isolation and characterization of a full-length cDNA for human galactocerebrosidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2: 485-491.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory, New York.

Sandhoff, K., Kolter, T. (1995): Lysosomaler Sphingolipid Abbau. *Naturwissenschaften* 82: 403-413.

Sandhoff, K., Kolter, T., Harzer, K. (2001): *Sphingolipid activator proteins*, 8th ed. New York: McGraw-Hill.

Sandhoff, K., Harzer, K., Fürst, W. (1995): *Sphingolipid Activator Proteins in The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol. II (C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle eds.), pp. 2427-2441, McGraw-Hill, Inc., New York.

Schnaar, R.L. (1991): Glycosphingolipids in cell surface recognition. *Glycobiology*, 1(5): 477-485.

Seko, A., Ohkura, T., Kitamura, H., Yonezawa, S., Sato, E., and Yamashita, K. (1996): Quantitative differences in GlcNAc:beta1-->3 and GlcNAc:beta1-->4 galactosyltransferase activities between human colonic adenocarcinomas and normal colonic mucosa. *Cancer Res.*, 56: 3468-3473.

Shi, Q., Le, X., Abbruzzese, J.L., Peng, Z., Qian, C.N., Tang, H., Xiong, Q., Wang, B., Li, X. C., Xie, K. (2001): Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.*; 61(10): 4143-54.

Shimodaira, K., Nakayama, J., Nakamura, N., Hasebe, O., Katsuyama, T., and Fukuda, M. (1997): Carcinoma associated expression of core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase gene in human colorectal cancer: role of O-glycans in tumor progression. *Cancer Res.*, 57: 5201-6.

Short, A.D., Bian, J.H., Gosh, T.K., Waldron, R.T., Rybak, S.L., Gill, D.L. (1993): Intracellular Ca²⁺ pool content is linked to control of cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 4986-90.

Sommers, K.D., Cartwright, S.L., Schlechter, G.L. (1990): Amplification of the int-2 gene in human head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene*, 61:365-8.

Spiegel, S., Foster, D., Kolesnick, R. (1996): Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8: 159-67.

Spitz, M.R. (1994): Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin. Oncol.* 21, 281-288.

Steeg, P.S., Bvillacqua, G., Kopper, L., Thorgeirsson, U.P., Talmadge, J.E., Liotta, L.A., Sobel, M.E. (1988): Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J. Natl. cancer Inst.* 80(3): 200-4.

St. John, T.P., Davis, R.W., (1979): Isolation of galactose-inducible DANN sequences from *Saccharomyces cerevisiae* by differential plaque filter hybridisation. *Cell*, 16(2): 443-52 .

Sui, G., Affar el, B., Shi, Y., Brignone, C., Wall, N.R., Yin, P., Donohoe, M., Luke, M.P., Calvo, D., Grossman, S.R., Shi, Y. (2004): Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell* 117:859–72.

Suzuki, K., Suzuki, Y., Suzuki, K. (1995): Galactoosylceramide lipidosis: Globiod cell leukodystrophy (Krabbe disease). In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Eds.). New York McGraw-Hill, pp 2671-92.

Suzuki, K., Suzuki, Y. (1989): In *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D., Eds) pp. 1699-1720. McGraw-Hill, NY.

Taga, S., Mangeney, M., Tursz, T., and Wiels, J. (1995): Differential regulation of glycosphingolipid biosynthesis in phenotypically distinct Burkitt's lymphoma cell lines. *Int. J. Cancer*, 61: 261-7.

Tai, T., Kawashima, I. (1992): Gangliosides and cancer-associated antigens. *Tapakushitsu Kakusan Koso*, 37(11 Suppl): 1863-7.

Tonnetti, L., Veri, M.C., Bonvini, E., D'Adamio, L. (1999): A role for neutral sphingomyelinase-mediated ceramide production in T cell receptor-induced apoptosis and mitogen-activated protein kinase-mediated signal transduction. *J Exp Med*;189:1581–9.

Trump, B.F., Berezsky, I.K. (1995): Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J*, 9(2): 219-28.

Trump, B.F., Berezsky, I.K. (1996): The role of altered (Ca^{2+})_i regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis. *Biochim Biophys Acta*, 1313(3): 173-8.

Varki, A. (1993): Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3: 97-130.

Wang, L., Wei, D., Huang, S., Peng, Z., Le, X., Wu, T.T., Yao, J., Ajani, J., Xie, K. (2003): Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer. *Clin Cancer Res.*; 9(17): 6371-80.

Warrington, J.A., Nair, A., Mahadevappa, M., Tsyganskaya, M. (2000): Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics*, 27; 2(3):143-7.

Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A., Weiner, A.M. (1965): *Molecular biology of the gene*, vol. 1. p 704. Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif.

Weissbach, A., Ward, C., Bolden, A. (1989): Eucaryotic DNA methylation and gene expression. *Current. Top. Cell. Regul*, 30: 1-21.

Welsh, J., Charda, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralp, D., McClelland, M. (1992): Arbitrary primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res*, 20: 4965-70.

Wenger, D.A., Rafi, M.A., Luzi, P. (1997): Molecular genetics of Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy): diagnostic and clinical implications. *Hum Mutat*, 10(4):268-79.

Wenger DA. (1997): Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy) In: *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease* (Rosenberg, R.N., Prusiner, S.B., DiMauro, S., Barchi, L., Kunkel, L.M., Eds.). Boston: Butterworth-Heinemann, pp 421-431.

Werner, J.A., Görögh, T., Lippert, B.M., Gottschlich, S., Heidorn, K., Folz, B.J., Rudert, H. (1997): Expression of a novel mRNA in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Pathol.* 50(2): 82-6.

Williams, HK. (2000): Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol Pathol.* 53(4):165-72.

Wilson, E., Olcott, M.C., Bell, R.M., Merrill, A.H., Lambeth, J.D. (1986): Inhibition of the oxidative burst in human neutrophils by sphingoid long-chain bases. Role of protein kinase C in activation of the burst. *J. Biol. Chem.* 261: 12616-23.

Wolff, R.A., Dobrowsky, R.T., Bielawska, A., Obeid, L.M., Hannun, Y.A. (1994): Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *Biol Chem.*, 269(30): 19605-9.

Wong, K.K., McClelland, M. (1994): Stress-inducible gene of *Salmonella thymurium* identified by arbitrarily primed PCR of RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 639-43.

Wu, S., Xie, G., Bai, R., Wang, Y., Zhu, P. (1998): Semi-quantitative study of calcitonin gene methylation in myelodysplastic syndrome. *Chin Med J (Engl)* 111:690-3.

Yakovleva, T., Kolesnikova, L., Vukojevic, V., Gileva, I., Tan-No, K., Austen, M., Luscher, B., Ekstrom, T.J., Terenius, L., Bakalkin, G. (2004): YY1 binding to a subset of p53 DNA-target sites regulates p53-dependent transcription. *Biochem Biophys Res Commun.* 318:615-24.

Yang, S., Liang, P. (2004): Global analysis of gene expression by differential display - a mathematical model. *Mol. Biotechnol.* 27, 197-208.

Yonemasu, T., Nakahira, K., Okumura, S., Kagawa, T., Espinosa de los Monteros, A., de Vellis, J., Ikenaka, K. (1998): Proximal promoter region is sufficient to regulate tissue-specific expression of UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase gene. *J Neurosci Res* 52:757–65.

Zang, H., Desai, N.N., Olivera, A., Seki, T., Brooker, G., Spiegel, S. (1991): Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol.* 114: 155-67.

Zhang, L., Li, W.H. (2004): Mammalian housekeeping genes evolve more slowly than tissue-specific genes. *Mol Biol Evol.* 21(2):236-9.

Zhang, Z.F., Morgenstern, H., Spitz, M.R., Tashkin, D.P., Yu, G.P., Hsu, T.C., Schantz, S.P. (2000): Environmental tobacco smoking, mutagen sensitivity, and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9(10):1043-9.

Zeller, C.B., Marchase, R.B. (1992): Gangliosides as modulators of cell function. *Am. J. Physiol.*, 262: 1341-55.

Zimmermann, N., Geyer, G. (1980): Failure to find evidence for postmeiotic X-chromosomal coding for glucose-6-phosphate dehydrogenase in mouse sperm cells by cytophotometric analysis. *Basic Appl Histochem.*, 24(3): 167-70.

8. Lebenslauf

Zur Person: Matthias Seiwerts, geboren am 13. Dezember 1971 in Buchholz in der Nordheide, ledig

Schulbildung

08/78 - 06/82 Grundschule Heideschule Buchholz
08/82 - 06/91 Albert - Einstein - Gymnasium Buchholz

Zivildienst

07/91 - 09/92 Kreiskrankenhaus Buchholz

Studium

10/92 – 11/99 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Ärztliche Prüfungen

17. 08. 94 Physikum
29. 08. 95 1. Staatsexamen
20. 03. 98 2. Staatsexamen
23. 11. 99 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

04/98 - 08/98 Prof. Dr. med. M. Heller, Klinik für Radiologische Diagnostik der CAU Kiel

08/98 - 09/98 Consultant MD R. S. Furgesson, Pediatric Surgical Unit, Starship Childrens Health Hospital , University of Auckland, New Zealand

10/98 – 11/98 Consultant MD K. J. Graham, Cardiac, Vascular and Cardiothoracic Surgery, Green Lane Hospital, University of Auckland, New Zealand

04. 99 – 08. 99 Prof. Dr. med. M. Kneba, Abteilung für Hämatonkologie, II. Medizin, Städtische Krankenhaus, Kiel

24. 11. 99 Erlaubnis für die Tätigkeit als Arzt im Praktikum

Berufstätigkeit

11/00 – heute Prof. Dr. med. T. Kahn, Klinik und Poliklinik für Diagnostische und interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum AÖR, Leipzig

9. Publikationen

Seiwerts M., Bäumken J., Schulz HJ., Görögh T., Heissenberg M., Werner JA. Gene Expression Patterns of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and their Tissue Inhibitors (TIMPS). International Symposium of Oncology in Otho Rhino Laryngology, Posnan, Poland, 27 – 29 Juni 1997.

Görögh T., Lippert BM., Gottschlich S., Niemann AM., Weller M. Seiwerts M., Weber E. Werner JA. Inhibited expression of fibronectin in laryngeal squamous cell carcinoma cell lines. *Europ J Cancer* 1997, 3.

Schreiter D., Reske AW., Stichert B., Seiwerts M., Bohm SH., Kloepfel R., Josten C. Alveolar recruitment in combination with sufficient positive end-expiratory pressure increases oxygenation and lung aeration in patients with severe chest trauma. *Crit Care Med.* 2004 Apr;32(4):968-75.

Condurache A., Essah E., Reske AW., Seiwerts M., Busse H., Aach T., Hofmann U. Robust Rib Cage Segmentation in CT Image series Using Active Contour Models In: *Biomedical Engineering (BMT 2005)*.

Reske AW., Bak Z., Samuelsson A., Morales O., Seiwerts M., Sjöberg F. Computed tomography--a possible aid in the diagnosis of smoke inhalation injury? *Acta Anaesthesiol Scand.* 2005 Feb;49(2):257-60.

Reske AW., Seiwerts M., Reske A., Gottschaldt U., Schreiter D. Early recovery from post-traumatic acute respiratory distress syndrome. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2006 Nov;26(6):376-9.

Busse H., Thomas M., Seiwerts M., Moche M., Busse MW., von Salis-Soglio G., Kahn T. In vivo glenohumeral analysis using 3D MRI models and a flexible software tool: feasibility and precision. *J Magn Reson Imaging.* 2008 Jan;27(1):162-70.

Reske AW., Busse H., Amato MB., Jaekel M., Kahn T., Schwarzkopf P., Schreiter D., Gottschaldt U., Seiwerts M. Image reconstruction affects computer tomographic assessment of lung hyperinflation. *Intensive Care Med.* 2008 Nov;34(11):2044-53.

Reske AW., Seiwerts M. [Qualitative and quantitative CT analysis of acute pulmonary failure]. Radiologe. 2009 Aug;49(8):687-97.

Erklärung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.