

Identifizierung und Charakterisierung Tumor-assoziiierter Proteasen in der Epithelialen Karzinogenese

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln



vorgelegt von
Regina Susanne Müller
aus Köln

Köln, 2004

Berichtersteller:

Priv.-Doz. Dr. R. Nischt

Prof. Dr. J. Brüning

Tag der mündlichen Prüfung:

09. Februar 2005

meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung
„Signaltransduktion und Wachstumskontrolle“
des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg
unter der Anleitung von Prof. Dr. P. Angel angefertigt.

Zusammenfassung

Bei der malignen Transformation von epidermalen Zellen handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, bei dem es zunächst zur Ausbildung von benignen Hauttumoren (Papillomen) und in Einzelfällen zur Entstehung von malignen Plattenepithelkarzinomen kommt. Eine wichtige Grundlage für die Etablierung zuverlässiger, diagnostischer Marker sowie neuartiger Therapieansätze stellt die Identifizierung von Genen dar, die an der Initiation und der Progression epidermaler Tumore beteiligt sind. Um Gene zu isolieren, die in den verschiedenen Stadien der Tumorgenese der Haut eine differentielle Expression zeigen, wurde, basierend auf dem Mausmodell der chemisch induzierten Hautkarzinogenese, eine *Microarray*-Studie durchgeführt. Die erhaltenen Expressionsdaten wurden mit semiquantitativer RT-PCR und *in situ*-Hybridisierung auf murinen und humanen Hauttumorschnitten verifiziert. Die Analyse ergab eine Vielzahl von differentiell exprimierten Genen, die bislang nicht mit dem Prozess der Hautkarzinogenese in Verbindung gebracht worden waren, wie z.B. *rik1200016C12*, das humane Ortholog zu *KLK9* (Kallikrein 9). Das gleiche Expressionsmuster wurde für die Serinprotease *bssp* beobachtet, die deutliche Homologien zu dem humanen *KLK6* (Kallikrein 6) aufweist. Beide Kallikrein-Familienmitglieder zeigten eine deutlich erhöhte Expression in Plattenepithelkarzinomen der Maus und des Menschen. Für *KLK6* konnte zudem eine Induktion in einer Vielzahl weiterer epithelialer Tumore, z.B. des Ovars, des Gastrointestinaltraktes und der Vulva, sowie eine Repression von *KLK6* in Mamma- und Nierenzellkarzinomen nachgewiesen werden. Um die bislang weitgehend unbekannt Funktion der Kallikrein-Proteasen in der epithelialen Tumorgenese näher zu charakterisieren, wurden BSSP-überexprimierende Keratinozytenlinien generiert. Die Expression von BSSP in den Keratinozyten führte zu einer veränderten Zellmorphologie, zu einer erhöhten Zelldichte sowie zu einer verstärkten Motilität. Als eine mögliche Ursache wurde eine reduzierte Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beobachtet, die mit einer Umverteilung des E-Cadherin-Proteins von der Zellmembran in das Zytoplasma korrelierte. Die Expression von BSSP im Prozess der Wundheilung lieferte weitere Hinweise dafür, dass BSSP in Migration und Zellwachstum involviert ist. Die begonnene Generierung einer transgenen BSSP-Mausmutante wird in Zukunft, die Untersuchung der Funktion der Kallikreine im Rahmen der Tumorprogression und der Wundheilung *in vivo* ermöglichen.

Abstract

Malignant transformation of epidermal cells is a multistage process leading to benign skin tumours (papillomas) some of which finally convert to malignant squamous cell carcinomas. The identification of genes critically involved in the initiation and progression of epidermal tumour cells will provide reliable diagnostic markers and will help to develop novel targets for cancer intervention. To address this issue, we performed cDNA microarray analysis and obtained a comprehensive list of genes that show a differential expression pattern during various stages of mouse skin carcinogenesis. Expression data were verified by semiquantitative RT-PCR and *in situ* hybridisation on mouse and human skin tumour sections. Using this approach a large set of differentially expressed genes were identified that have not yet been implicated in epidermal tumourigenesis so far, such as *rik1200016C12*, the human *KLK9* (kallikrein 9) orthologue. A very similar pattern of gene expression was observed for another serine protease *bssp* which exhibits significant homology to *KLK6* (kallikrein 6). Both kallikrein family members, *rik1200016C12* and *bssp*, revealed enhanced expression in murine and human squamous cell carcinomas. Moreover, *KLK6* was induced in a variety of other tumours e.g. ovary, intestine, vulva and was repressed in tumours of breast and kidney. To elucidate the function of kallikrein proteases in epithelial tumourigenesis BSSP overexpressing keratinocytes were generated. Overexpression of BSSP led to altered cell morphology, increased cell density and enhanced motility. This was accompanied by reduced cell-cell contacts correlating with a redistribution of E-Cadherin from the cell membrane to the cytoplasm. Furthermore, BSSP expression during the process of cutaneous wound healing suggests that BSSP is involved in cell migration and growth. The generation of transgenic BSSP mouse mutants will allow further characterisation of the *in vivo* function of kallikrein family members during tumour promotion and wound healing.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Tumorgenese der Haut.....	1
1.1.1	Klinische Aspekte der Hautkarzinogenese.....	1
1.1.2	Mausmodelle zur Untersuchung der Hautkarzinogenese.....	3
1.1.3	Molekulare Mechanismen der Hautkarzinogenese.....	5
1.1.4	Funktion von AP-1 in der Hautkarzinogenese.....	7
1.1.5	Wundheilung als analoger Prozess zur Hautkarzinogenese.....	8
1.2	Die Rolle von Proteasen in der Karzinogenese.....	10
1.3	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Chemikalien.....	16
2.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.3	Enzyme.....	20
2.1.4	Radiochemikalien.....	20
2.1.5	<i>Kits</i>	20
2.1.6	Antikörper.....	21
2.1.7	Oligonukleotide.....	21
2.1.8	Sonden für <i>in situ</i> -Hybridisierungen und Expressionsanalysen.....	23
2.1.9	Vektoren.....	24
2.1.10	Bakterienmedien.....	24
2.1.11	Bakterienstämme.....	24
2.1.12	Zellkultur.....	24
2.1.13	Eukaryontische Zelllinien.....	25
2.1.14	Murines Tumormaterial.....	25
2.1.15	Humanes Tumormaterial.....	25
2.1.16	Material für Wundheilungsstudien.....	26
2.1.17	Puffer und Lösungen.....	26
2.1.18	Molekulargewichtsmarker.....	26
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Molekularbiologische DNA Methoden.....	27
2.2.1.1	Isolierung genomischer DNA.....	27
2.2.1.2	Plasmidpräparation im kleinen Massstab.....	27
2.2.1.3	Plasmidpräparation im grossen Massstab.....	27
2.2.1.4	Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen.....	27
2.2.1.5	Dephosphorylierung von DNA.....	28
2.2.1.6	Ligation von DNA.....	28
2.2.1.7	Herstellung von chemisch kompetenten <i>E.coli</i> Bakterien.....	28
2.2.1.8	Transformation von chemisch kompetenten <i>E.coli</i> Bakterien.....	28
2.2.1.9	Elektrophorese von DNA.....	29
2.2.1.10	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	29
2.2.1.11	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA.....	29
2.2.1.12	Ethanolpräzipitation von DNA.....	29
2.2.1.13	Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösung.....	29
2.2.1.14	Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30

2.2.1.15	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	30
2.2.1.16	Hybridisierung des <i>BD Clontech™ Cancer Profiling Arrays II</i>	30
2.2.1.17	Sequenzierung von DNA	31
2.2.2	Molekularbiologische RNA-Methoden	31
2.2.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA	31
2.2.2.2	Synthese von cDNA	31
2.2.2.3	Elektrophorese von RNA	32
2.2.2.4	Transfer von RNA auf Nylonmembranen (<i>Northern blot</i>)	32
2.2.2.5	Hybridisierung von RNA	33
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	33
2.2.3.1	Herstellung von Gesamt-Proteinextrakten	33
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	33
2.2.3.3	Aufreinigung von Proteinen durch <i>Talon beads</i>	34
2.2.3.4	Polyacrylamidgelelektrophorese	34
2.2.3.5	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (<i>Western blot</i>) ..	35
2.2.3.6	Gelatine-Zymographie	35
2.2.4	Histologische Methoden	36
2.2.4.1	Fixierung von Gewebe und Einbettung in Paraffin	36
2.2.4.2	Anfertigung von Paraffingewebeschnitten	36
2.2.4.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	36
2.2.4.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung auf Gewebeschnitten (ISH)	37
2.2.4.5	Immunhistochemie (IHC)	39
2.2.4.6	Indirekte Immunfluoreszenz	40
2.2.4.7	Phalloidin-Färbung	41
2.2.5	Zellkulturmethoden	41
2.2.5.1	Kulturbedingungen	41
2.2.5.2	Passagieren von Zellen	42
2.2.5.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	42
2.2.5.4	Mykoplasmen-Test	43
2.2.5.5	Transfektion eukaryontischer Zellen	43
2.2.5.6	Erstellen von Wachstumskurven	44
2.2.5.7	<i>In vitro</i> -Migrationsstudien	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Identifizierung Tumor-assoziiertes Gene in der Hautkarzinogenese	45
3.2	Expressionsstudien zu Tumor-assoziierten Proteasen	52
3.2.1	Expression von Proteasen in humanen Hauttumoren	52
3.2.2	Expression von <i>bssp/KLK6</i> in murinen und humanen Hauttumoren	53
3.2.3	Expression von <i>KLK6</i> in epithelialen Tumoren	56
3.3	Funktionelle Charakterisierung der Serinprotease BSSP/hK6	58
3.3.1	Stabile Expression von transgenem BSSP in Keratinozyten	58
3.3.2	Einfluss von BSSP auf die Morphologie von Keratinozyten	61
3.3.3	Veränderungen der Zell-Zell-Adhäsion in BSSP-überexprimierenden Keratinozyten	62
3.3.4	Beeinflussung des Wachstumsverhaltens von Keratinozyten durch BSSP ...	64
3.3.5	Einfluss von BSSP auf die Migration von Keratinozyten	65
3.3.6	Expression von BSSP in der Wundheilung der Haut	68

4	Diskussion	70
4.1	Identifizierung neuer Tumor-assoziiertes Gene	70
4.2	KLK6/hK6, das humane funktionelle Homolog zu bssp/BSSP?.....	74
4.3	BSSP/hK6, ein neuer Marker für epitheliale Tumore?.....	79
4.4	Funktion von BSSP/hK6 in pathophysiologischen Prozessen der Haut.....	82
4.4.1	Funktionelle Charakterisierung von BSSP durch <i>in vitro</i> Analysen	83
4.4.2	Die Rolle von BSSP/hK6 in der epithelialen Karzinogenese und der Wundheilung	84
	Ausblick	88
	Literaturnachweis	89
A.1	Anhang	110
A.1	Tabelle 7.....	110
A.1	Tabelle 8.....	111
A.1	Tabelle 9.....	112
A.2	Abkürzungen.....	113
A.3	Danksagung.....	116
A.4	Lebenslauf.....	117
A.5	Erklärung.....	118

1 Einleitung

Als grösstes Organ bedeckt die Haut die gesamte Oberfläche des Körpers. Zu ihren Aufgaben gehören der Schutz vor mechanischen, chemischen und osmotischen Einflüssen, ihre Barrierefunktion gegenüber eindringenden Mikroorganismen sowie die Regulation der Körpertemperatur und des Wasserhaushaltes. Ausserdem besitzt sie die Fähigkeit zur Resorption und Exkretion und dient als Sinnesorgan der Kontaktaufnahme mit der Umwelt.

Die Haut besteht aus der Epidermis, die sich vorwiegend aus Keratinozyten zusammensetzt, und der Dermis, die von in Kollagen eingebetteten Fibroblasten gebildet wird. Zwischen der Dermis und der Epidermis liegt die Basalmembran, eine hauptsächlich von Keratinozyten sezernierte Schicht extrazellulärer Matrix. Als mehrschichtiges Epithel enthält die Epidermis sowohl undifferenzierte basale Keratinozyten, die proliferatives Potential besitzen und für die stetige Erneuerung des Epithels sorgen, und differenzierende Keratinozyten, die für die Ausbildung des zum Teil verhornten (keratinisierten) Plattenepithels verantwortlich sind (Fuchs, 1990b; Fuchs, 1990a). Da die Haut einer Vielzahl von schädigenden Umwelteinflüssen, wie z.B. UV-Strahlung und chemischen, mutagenen Substanzen ausgesetzt ist, müssen Proliferation und Differenzierung genauestens reguliert und koordiniert werden, wobei insbesondere die Interaktion zwischen Dermis und Epidermis eine entscheidende Rolle spielt (Szabowski et al., 2000; Angel and Szabowski, 2002). Gerät das empfindliche System ausser Kontrolle, kann dies zur Entstehung von Hauttumoren führen.

1.1 Tumorgenese der Haut

1.1.1 Klinische Aspekte der Hautkarzinogenese

Jährlich erkranken in Deutschland rund 100.000 Menschen an Hautkrebs, wovon 3.000 sterben (Quelle: Deutsche Krebshilfe e.V., 2002). Epidemiologische Studien beweisen, dass die Zahl an Neuerkrankungen stetig ansteigt, da die Lebensgewohnheiten der Menschen und die Bedingungen der Umwelt einem kontinuierlichen Veränderungsprozess unterliegen.

Man unterscheidet bei Hauttumoren drei unterschiedliche Formen: das maligne Melanom, das BZK (Basalzellkarzinom) und das PEK (Plattenepithelkarzinom). Während das maligne Melanom aufgrund häufiger Metastasenbildung als ein besonders lebensbedrohlicher Hautkrebstyp gilt, scheinen Erkrankungen der beiden anderen Krebsformen, sogenannter NMSC (*non melanoma skin cancer*), zunächst oft weniger dramatisch. Jedoch treten sie mit einer deutlich höheren Inzidenz auf. 80% der NMSC stellen die BZK dar, die durch relativ langsames Wachstum charakterisiert sind und in nur 0,0028-0,55% aller Fälle Metastasen ausbilden (Snow et al., 1994). Werden BZK nicht in der Frühphase erkannt und behandelt, wachsen sie so aggressiv, dass sie kosmetisch ungünstige Operationen nach sich ziehen. Daher gilt es, den Tumor so rasch wie möglich zu diagnostizieren und durch einen dermato-chirurgischen Eingriff zu entfernen. Demgegenüber metastasiert das schnell wachsende PEK abhängig von seiner Lokalisation mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 10-15% (Marks, 1996). Folglich ist für einen Patienten, der an einem PEK leidet, eine frühzeitige, exakte Diagnose überlebenswichtig, damit zu einem möglichst frühen Zeitpunkt eine geeignete Therapie eingeleitet werden kann. Die Erkennung von bereits präkanzerogenen Läsionen der Haut, sogenannten solaren/aktinischen Keratosen oder *Morbus Bowden*, die oftmals in ein PEK übergehen, wäre ebenfalls für den Patienten von Vorteil (Marks et al., 1988). In diesem Zusammenhang ist auch die histologische Abgrenzung zum benignen Keratoakanthom wichtig, das häufig durch eine spontane Regression gekennzeichnet ist und als epitheliale Pseudokanzerose bezeichnet wird.

Die Diagnose Hautkrebs wird derzeit aufgrund klinischer Kriterien durch auflicht-mikroskopische Untersuchungen (Dermatoskopie) gestellt und anhand einer Exzisionsbiopsie histologisch gesichert. Entscheidend für die Prognose eines an Krebs erkrankten Patienten ist, ob der Primärtumor lokal begrenzt vorliegt oder ob er sich bereits über die Blutbahn in andere Körperregionen ausgebreitet hat (Fidler and Johnson, 2001). Deshalb wird mit sonographischen Methoden die Grössen- und Tiefenausdehnung des Hauttumors bestimmt und bei entsprechendem Verdacht auf Metastasierung weiterführende organspezifische Diagnostik durchgeführt, z.B. Lymphknotenultraschall, Röntgen-Thorax oder Computertomographie. Basierend auf den diagnostischen Resultaten werden Karzinome der Haut nach den Richtlinien der UICC (*International Union against Cancer*) in verschiedene Tumorstadien eingeteilt. Diese sogenannte TNM-Klassifizierung richtet sich nach 1. der Tumorgrösse und dem Ausmass, mit dem sich der Primärtumor in der Haut und in das umliegende Gewebe ausbreitet (T), 2. dem Status befallener Lymphknoten (N) und 3. den Metastasen in anderen Organen (M). In der klinischen Praxis ist die Diagnostik, die ausschliesslich auf der histologischen Begutachtung des Tumors begründet ist, mit einigen Problemen verbunden. In Einzelfällen ist das Risiko einer unvollständigen oder sogar fehlerhaften Diagnose nicht auszuschliessen. Zudem können späte Stadien mit vorhandenen Metastasen erst dann diagnostiziert werden, wenn diese bereits vorliegen. Für

den Patienten hat dies möglicherweise fatale Folgen. Um die Heilungschancen zu erhöhen, wäre ein spezifischer Tumormarker mit hoher Aussagekraft über Prognose und mögliche Metastasenbildung für den Patienten bereits in frühen Stadien der Entstehung eines Hauttumors wünschenswert. Bislang hat sich jedoch in der klinischen Praxis noch kein Marker für die standardisierte Überprüfung der Hauttumor-Patienten bewährt. Lediglich für die Nachsorge und zur Kontrolle des Therapieerfolges bei Melanomen kann die Bestimmung der Serum-Proteinmarker S-100 und MIA als ergänzender Parameter herangezogen werden (Djukanovic et al., 2000). Im Falle der NMSC hat sich allerdings bisher kein Tumormarker als geeignet erwiesen.

1.1.2 Mausmodelle zur Untersuchung der Hautkarzinogenese

Eine wichtige Grundlage für die Entwicklung von geeigneten Tumormarkern ist die Identifizierung von Genen, die im Verlauf der Karzinogenese differentiell exprimiert werden. Eine funktionelle Charakterisierung dieser Tumor-assoziierten Gene bietet die Möglichkeit, die molekularen Mechanismen der Krebsentstehung und der Ausbildung von Metastasen besser zu verstehen. Dies kann zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien beitragen. Untersuchungen an Zellkultur- und Mausmodellen haben ergeben, dass die Entstehung epithelialer Tumore beim Menschen ein mehrstufiger Prozess ist, der sich in drei Phasen unterteilen lässt: Initiation, Promotion und Progression. Die einzelnen Schritte beruhen auf genetischen und epigenetischen Veränderungen, die eine charakteristische Expression von Genen zur Folge haben. Dadurch werden zelluläre Prozesse wie Zellzyklus, Apoptose, genomische Integrität, DNA-Reparatur, Migration und Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen dereguliert (Lengauer et al., 1998; Angel et al., 2001). In der frühen Phase der Krebsentstehung kommt es zu Mutationen, die das klonale Wachstum von Zellen fördern und zu prämaligen Läsionen wie Dysplasien und Hyperplasien führen. Entstehen zusätzliche genetische oder epigenetische Veränderungen in einer oder mehreren prämaligen Zellen, kann sich ein Primärtumor ausbilden, der zunächst durch lokales Wachstum charakterisiert ist. Genomische Instabilität, die im Verlauf der Progression auftritt, ermöglicht das invasive Verhalten maligner Tumorzellen und ist für die Metastasierung im Körper verantwortlich (Yokota, 2000).

Die Erkenntnisse auf dem Gebiet der Mehrstufenkarzinogenese wurden vor allem an Tiermodellen gewonnen. Für die Untersuchung der epithelialen Tumorgenese wurden vorwiegend zwei Mausmodelle eingesetzt. Eines davon ist das K5-SOS-Modell, bei dem eine aktivierte Form des humanen *sos* (*son of sevenless*)-Gens unter die Kontrolle des *k5* (*keratin 5*)-Promotors gebracht wird, was zur spezifischen Expression des *sos*-Transgens in den Basalzellen der Epidermis führt (Aronheim et al., 1994). Der Guaninnukleotid-freisetzende Faktor SOS fördert den Austausch von an Ras gebundenem GDP gegen GTP aus dem Zytosol, aktiviert dadurch Ras und damit schliesslich den Ras-ERK (*extracellular*

regulated kinase)-Signalweg. Konstitutiv aktives Ras in der Epidermis führt in Gegenwart von EGFR (*epidermal growth factor receptor*) zur Entstehung spontaner Papillome (Sibilia et al., 2000). Eine weiterführende Analyse späterer Tumorstadien ermöglicht dagegen das Mausmodell, bei dem Hauttumore chemisch induziert werden können (Marks and Furstenberger, 1990; DiGiovanni, 1992). Dabei werden im Rahmen der Initiation durch einmalige Behandlung mit einem DNA-schädigenden Mutagen, wie z.B. DMBA (7,12-Dimethylbenzanthracen), zunächst irreversible Mutationen in den Basalzellen der Epidermis induziert (Abb. 1.1). Im Stadium der Tumorpromotion werden durch mehrfache Behandlung mit Tumorpromotoren, wie z.B. TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat), die initiierten Zellen zur klonalen Expansion angeregt, wobei sich zunächst gutartige Tumore (benigne Papillome) bilden. Als Folge der TPA-Applikation kommt es ausserdem zu einer entzündlichen Reaktion und zur Hyperproliferation der Haut. Während sich die Mehrzahl der benignen Tumore mit der Zeit zurückbilden (Furstenberger and Kopp-Schneider, 1995), entwickeln sich etwa 5% davon weiter zu malignen Karzinomen (Marks and Furstenberger, 2000). Dieser Prozess erfolgt spontan, d.h. auch wenn eine weitere Behandlung mit dem Tumorpromotor ausbleibt.

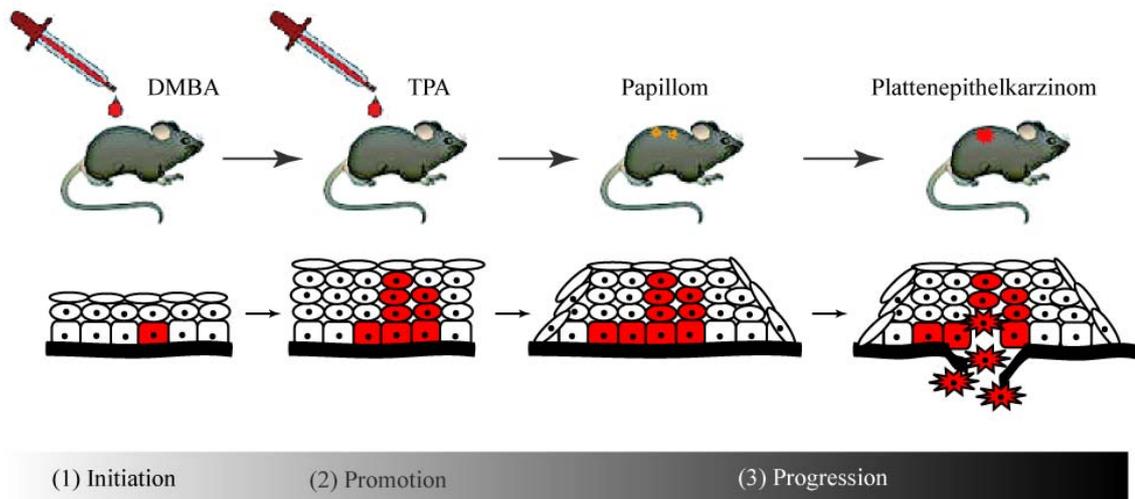


Abb. 1.1: Chemisch induzierte Mehrstufenkarzinogenese der Mauhaut.

- (1) **Initiation:** Die einmalige Behandlung mit DMBA führt zu irreversiblen DNA-Schäden.
- (2) **Promotion:** Durch mehrfache Applikation eines Tumorpromotors, z.B. des Phorbolesters TPA, kommt es über epigenetische Mechanismen zur reversiblen, klonalen Expansion der initiierten Zellen und zur Ausbildung von benignen Papillomen.
- (3) **Progression:** Durch die Akkumulation weiterer genetischer Veränderungen entstehen aus einigen Papillomen maligne Plattenepithelkarzinome.

Das Mehrstufenkarzinogenesemodell der Mauhaut ermöglicht die Analyse von genetischen Veränderungen in den einzelnen Stadien der Hautkarzinogenese, was beim Menschen nicht möglich wäre. Die veränderte Expression von Genen kann ausgehend von

der normalen Haut über das Stadium der hyperproliferativen Epidermis, dem benignen und letztendlich dem malignen Tumor verfolgt werden.

1.1.3 Molekulare Mechanismen der Hautkarzinogenese

Die Grundlage für die Entstehung eines Tumors sind genetische Mutationen, die bei der Initiation stattfinden und durch genotoxische Faktoren ausgelöst werden. Dadurch können Gene aktiviert werden, die die Proliferation von Zellen kontrollieren. Jedoch werden die dadurch bedingten phänotypischen Veränderungen erst nach der Aktivierung epigenetischer Mechanismen im Rahmen der Promotion sichtbar (Kap. 1.1.2). Für eine Reihe von Onkogenen und Tumor-Suppressor-Genen konnte gezeigt werden, dass sie entscheidend an der Tumorentstehung beteiligt sind. Bei der chemisch induzierten Karzinogenese der Mauhaut entsteht aus der mutagenen Substanz DMBA nach deren metabolischer Aktivierung im Körper Diolepoxid, das primär Addukte mit Adenosinnukleotiden bildet und zu A → T Transversionen führt (Cheng et al., 1988). Über 90% der Papillome weisen nach Applikation von DMBA eine A → T Transversion im Kodon 61 von *Ha-ras* auf. *Ha-ras* gehört zur Familie der *ras*-Gene (*Ki-ras*, *Ha-ras* und *N-ras*), die für GTP-bindende Proteine kodieren und als onkogene Varianten bekannt sind (Campbell and Der, 2004). Unterstützt wird die Bedeutung des *ras*-Onkogens bei der Hautkarzinogenese durch eine Reihe von *in vivo*-Untersuchungen: Primäre Keratinozyten, die mit *v-Ha-ras* transfiziert wurden, sind in der Lage, Papillome in Nacktmäusen zu induzieren (Roop et al., 1986) bzw. direkte Applikation von Retroviren, die das *v-Ha-ras*-Gen tragen, auf die Haut von Mäusen, führt nach TPA-Behandlung zur Ausbildung von Papillomen (Roop et al., 1986; Brown et al., 1986). Gleichermassen kann UV-Strahlung als Tumorinitiator oder -promotor wirken und in experimentellen Tiermodellen Hautkrebs auslösen (Brash et al., 1996). Dies wird durch den typischen „molekularen Fingerabdruck“ dieses Mutagens im Genom erkennbar, da T → C und TT → CC Mutationen auf UV-Strahlung zurückzuführen sind (Brash et al., 1991; Vogelstein and Kinzler, 1992). Solche und andere Punktmutationen werden auch im *N-ras*-Gen UV-induzierter muriner Hauttumoren gefunden (Pierceall et al., 1992). Für die humane Hautkarzinogenese ist die mutagene Wirkung der UV-Strahlung von besonderem Interesse, da PEK und BZK bevorzugt an sonnenexponierten Körperregionen auftreten. Es konnte gezeigt werden, dass in einigen humanen Tumoren eine Aktivierung der Onkogene *Ha-ras*, *Ki-ras* und *N-ras* vorliegt. Allerdings müssen weitere Gene an der Entstehung der Karzinome beteiligt sein (Lieu et al., 1991; Pierceall et al., 1991; Ananthaswamy et al., 1988; van der Schroeff et al., 1990).

In einem Drittel aller chemisch induzierten PEK der Maus und 90% aller humanen PEK werden Mutationen im Tumor-Suppressor-Gen *p53* festgestellt (Brash et al., 1991; Brash et al., 1996; Burns et al., 1991). Ein Grossteil der humanen Tumore weist dabei die für

UV-Strahlung charakteristischen T → C Transitions-Mutationen oder TT → CC Tandem-Mutationen auf (Brash et al., 1996; Brash, 1997). Da diese Veränderungen jedoch bereits in aktinischen Keratosen, den Vorstufen der PEK, sowie in der normalen Haut vorgefunden werden, kann man vermuten, dass es sich um ein frühes Ereignis im Verlauf der Hautkarzinogenese handelt (Jonason et al., 1996; Nelson et al., 1994; Taguchi et al., 1994; Ziegler et al., 1994). Interessanterweise können sowohl *p53*-Mutationen als auch die Entstehung von Hauttumoren durch die Verwendung eines Sonnenschutzes vor der UV-Exposition von Mäusen unterbunden werden (Ananthaswamy et al., 1997; Ananthaswamy et al., 1998). Da *p53*-defiziente Mäuse weniger auf UVB-induzierte Apoptose reagieren, nimmt *p53* möglicherweise seine Funktion als Tumor-Suppressor über die Eliminierung prä-tumorigener Keratinozyten wahr (Ziegler et al., 1994).

Im Stadium der Tumorpromotion aktiviert der Phorbolester TPA PKC (Protein-Cinase C), indem er die Wirkung von Diazylglyzerol, dem physiologischen Effektor des Enzyms, nachahmt und mit den identischen Bindungsstellen interagiert (Castagna et al., 1982; Nishizuka, 1995). Über PKC werden Gene induziert, denen eine wesentliche Bedeutung im Hinblick auf Zellwachstum, Differenzierung und Tumorentstehung nachgewiesen wurde (Berridge et al., 1985; Nishizuka, 1986; Nishizuka, 1989). Als Stimuli für die klonale Expansion während der Tumorpromotion können u.a. Wachstumsfaktoren wie TGF- α (*transforming growth factor- α*) dienen, dessen Expression in *Ha-ras*-transformierten Keratinozyten erhöht ist (Lee et al., 1992). Zudem spielt die EGFR vermittelte Signaltransduktion über einen parakrinen Mechanismus für die Bildung von benignen Papillomen aus Ras-initiierten Keratinozyten eine entscheidende Rolle (Denning et al., 1996; Threadgill et al., 1995).

Bei der Entstehung von malignen PEK aus benignen Papillomen, dem Vorgang der Tumorprogression, sind sowohl epigenetische Veränderungen, wie z.B. die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen durch Methylierung der Promotorregion (*silencing*), als auch genetische Veränderungen, wie z.B. chromosomale Dislokationen oder Aneuploidien, von essentieller Bedeutung. Besonders häufig werden Trisomien von Chromosom 6 und 7 beobachtet (Aldaz et al., 1989). Die Freisetzung invasiver Tumorzellen aus dem epithelialen Gewebeverband wird insbesondere durch die Inaktivierung des Tumor-Suppressor-Gens *E-Cadherin* unterstützt. E-Cadherin ist am Aufbau der Desmosomen und damit an der Aufrechterhaltung des Zell-Zell-Kontaktes beteiligt. Dessen Verlust gilt als eine der Hauptursachen für die EMT (epitheliale-mesenchymale Transition) (Kang and Massague, 2004). Bei der normalerweise in der Embryonalentwicklung beobachteten EMT handelt es sich um ein zentrales Ereignis in der Progression von Karzinomen, bei dem Epithelzellen ihre Polarität und ihre Kontakte zu Nachbarzellen verlieren sowie ihr Zytoskelett reorganisieren (Thiery, 2002). Gleichzeitig kommt es zur Expression

mesenchymaler Marker und zur Manifestation eines migratorischen Phänotyps (Kang and Massague, 2004). Der Verlust von E-Cadherin kann in der Mehrzahl humaner Tumore epithelialen Ursprungs nachgewiesen werden (Christofori and Semb, 1999). Die Inaktivierung ist dabei zumeist auf Mutationen im Gen oder auf die Stilllegung des Gens durch Methylierung der Promotorregion zurückzuführen. Ausserdem kann Dysadherin, ein kürzlich identifiziertes Tumor-assoziiertes Glykoprotein, E-Cadherin herunterregulieren und zur Metastasierung führen (Ino et al., 2002; Aoki et al., 2003; Shimamura et al., 2003). E-Cadherin interagiert mit β -Catenin, das über α -Catenin die Verbindung zum Zytoskelett und zum Wnt/Wingless-Signalweg herstellt. Durch den Verlust der E-Cadherin Funktion und die daraus resultierende Freisetzung von β -Catenin kann es zur Initiation der Transkription von Tumor-assoziierten Genen durch die LEF-1/TCF Transkriptionsfaktoren kommen (Hirohashi and Kanai, 2003).

1.1.4 Funktion von AP-1 in der Hautkarzinogenese

Eine zentrale Rolle sowohl bei der Tumorpromotion als auch bei der Tumorprogression spielt der Transkriptionsfaktor AP-1 (*activator protein-1*), bei dem es sich um einen heterodimeren Proteinkomplex aus Mitgliedern der Fos-, Jun- und ATF-Proteinfamilie handelt (Wagner, 2001; Angel and Karin, 1991). Die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 wird durch verschiedene MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Kaskaden, z.B. über p38, ERK oder JNK (*c-Jun NH₂-terminal kinase*), kontrolliert, indem sie die AP-1-Komponenten auf transkriptioneller und posttranslatonaler Ebene regulieren. Im Rahmen der Phorbolster-induzierten Tumorpromotion ist die PKC-vermittelte Expression der frühen Gene *c-fos* und *c-jun* hervorzuheben, die die Aktivierung von AP-1 bewirken. Über die spezifische Bindung an TRE (*TPA response element*)-Motive in der Promotorregion kann AP-1 die Expression von Genen wie *metallothionein IIa*, *stromelysin-1/mmp-3*, *IL-2* (*interleukin-2*) und *collagenase-1/mmp-1* induzieren (Angel et al., 1987; Kerr et al., 1992; Angel et al., 2001). Das Zellkulturmodell der JB6-Zellen unterstreicht die bedeutende Funktion von AP-1 in der Transformation von Keratinozyten. Während die genetische Variante (P+) der murinen epidermalen JB6-Zellen in Gegenwart von TPA, EGF (*epidermal growth factor*) und TNF- α (*tumour necrosis factor- α*) irreversibel transformiert, ist die Variante (P-) gegenüber Tumorpromotoren resistent (Colburn et al., 1979; Colburn et al., 1982). Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Sensitivität dieser Zellen liegt in der differentiellen Aktivierung verschiedener Signalwege wie z.B. von AP-1 und NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), die ausschliesslich in den (P+)-Zellen angeschaltet sind (Bernstein and Colburn, 1989; Bernstein et al., 1992). Experimente mit dominant-negativen c-Jun Mutanten (TAM67), die auf einer Deletion in der Transaktivierungsdomäne beruhen, oder mit AP-1 reprimierenden Retinoiden beweisen, dass AP-1 die Transformation der JB6-Zellen vermitteln kann (Li et al., 1996; Dhar et al., 2002). Zudem korreliert eine verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivierung von c-

Jun, Fra-1, Fra-2 und ATF-2 in Zelllinien von chemisch induzierten Tumoren mit dem Grad der Malignität dieser Zellen (Zoumpourlis et al., 2000). Für c-Jun liegen ausserdem *in vivo*-Beobachtungen mit der o.g. TAM67 *c-jun*-Mutante in der Epidermis von haarlosen SKH-1-Mäusen vor, die darauf hinweisen, dass c-Jun an der Entstehung von UVB-induzierten PEK beteiligt ist (Cooper et al., 2003). Ein molekularer Mechanismus, über den c-Jun im Verlauf der Tumorpromotion seine Funktion ausübt, wird an konditionalen *c-jun*-defizienten (*c-jun*^{-/-})-Mäusen deutlich. In Abwesenheit von c-Jun in der Epidermis entstehen in Verbindung mit dem *sos*-Transgen kleinere Papillome, da c-Jun über EGFR und HB-EGF (*heparin binding epidermal growth factor*) die Proliferation von Keratinozyten steuert (Zenz et al., 2003). Die AP-1 aktivierende Kinase JNK zeigt in *in vivo*-Untersuchungen mit *knock-out*-Mäusen isoformspezifische Unterschiede hinsichtlich der Ausbildung chemisch induzierter Hauttumore. Während in (*JNK2*^{-/-})-Mäusen weniger Papillome entstehen, sind (*JNK1*^{-/-})-Mäuse durch verstärktes Tumorstadium gekennzeichnet, so dass JNK1 mit der Tumorsuppression und JNK2 mit der Tumorprogression in Verbindung gebracht werden (Chen et al., 2001; She et al., 2002). Demgegenüber zeigt die Anwendung des chemisch induzierten Karzinogeneseprotokolls bei (*c-fos*^{-/-})-Mäusen, dass c-Fos für die maligne Transformation von benignen Keratinozyten verantwortlich ist (Saez et al., 1995). Zielgene von c-Fos, wie der angiogene Faktor *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*) oder die sezernierten Proteasen *collagenase-1/mmp-1* und *stromelysin-1/mmp-3*, sind an Prozessen beteiligt, die v.a. für die Metastasierung im späten Stadium der Tumorgenese unabdingbar sind und die invasiven Eigenschaften von Tumorzellen vermitteln (Yuspa, 1998).

1.1.5 Wundheilung als analoger Prozess zur Hautkarzinogenese

Die molekularen und zellulären Mechanismen im Verlauf der Hautkarzinogenese zeigen deutliche Parallelen zur Wundheilung der Haut, einem komplexen biologischen Reparaturvorgang, bei dem eine Reihe von Zelltypen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Proteasen und Bestandteile der ECM (extrazelluläre Matrix) zusammenwirken (Martin, 1997; Singer and Clark, 1999). Erfolgt eine Verletzung wird der Defekt zunächst mit einem schützenden Fibrinpfropf verschlossen, um die Blutung zu stillen. Die im Fibrinpfropf enthaltenen Thrombozyten sezernieren eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen und sorgen dadurch für die Einwanderung von inflammatorischen Zellen, Fibroblasten und Blutgefässen, die für die Bildung des Granulationsgewebes verantwortlich sind. Die Fibroblasten erzeugen eine aus Fibronectin und Kollagen I bestehende provisorische Matrix. Auf dieser migrieren, ausgehend von proliferativ aktiven Keratinozyten am Wundrand, Keratinozyten in das Wundbett ein und bauen dadurch ein neues Epithel auf (Reepithelialisierung). Im letzten Schritt kommt es zur Kontraktion der Kollagenfasern in der Wunde durch Myofibroblasten und zur Ausbildung des Narbengewebes.

Im Verlauf der Progression von PEK erwerben normale Keratinozyten maligne Eigenschaften, die sich phänotypisch in ihrem erhöhten proliferativen, migratorischen und invasiven Potential manifestieren (Kap. 1.1.3). Während es sich bei den neoplastischen Tumorzellen um eine permanente Aufrechterhaltung dieser Veränderungen handelt, ist das hyperproliferative, migratorische und invasive Verhalten der Keratinozyten bei der Wundheilung reversibel und endet nach Abschluss der Reepithelialisierung. Globale Expressionsanalysen bestätigen, dass eine Reihe von Genen, die in der Wundheilung induziert werden, auch bei der Entstehung maligner Plattenepithelkarzinome eine Rolle spielen (Pedersen et al., 2003). Die epidermale Hyperproliferation, die Entzündungsreaktion und die Freisetzung von Faktoren wie Zytokinen und Eicosanoiden, die durch Phorbolster bei der Tumorpromotion ausgelöst werden, zeigen sich gleichermassen bei dem Wundheilungsprozess der Haut (Marks and Furstenberger, 1995). Tatsächlich hat sich herausgestellt, dass durch mehrmaliges Verwunden der murinen Haut oder durch Injektion der beiden Wachstumsfaktoren TGF- α und TGF- β (*transforming growth factor- β*) im Anschluss an eine DMBA-Behandlung der Effekt der Tumorpromotion ausgelöst und die Behandlung mit Phorbolestern ersetzt werden kann (Furstenberger et al., 1989). Tumorpromotion kann damit durch die unangemessene Hyperaktivierung endogener Wundheilungsmechanismen ausgelöst werden. Zudem werden Gemeinsamkeiten beider Prozesse im Expressionsprofil von Genen deutlich, die mit dem proteolytischen Gewebeumbau (*tissue remodelling*) im Zusammenhang stehen. (Dano et al., 1999). Die epidermalen Keratinozyten produzieren sowohl in der Tumorgenese als auch in der Wundheilung uPA (*urokinase plasminogen activator*), uPAR (*urokinase plasminogen activator receptor*), Gelatinase B/MMP-9 und Collagenase-3/MMP-13 und die stromalen Fibroblasten Gelatinase A/MMP-2 und Stromelysin-3/MMP-11 (Johnsen et al., 1998).

Weitere Ähnlichkeiten zum Wundheilungsprozess werden in der Generierung des Tumorstromas durch die Tumorzellen deutlich. Zuerst baut der Tumor analog zum Fibrinpfropf eine Fibrinmatrix in seiner Umgebung auf. Voraussetzung dafür ist die Sekretion von VPF (*vascular permeability factor*) durch die Tumorzellen, das die Permeabilität von Blutgefässen lokal erhöht und auf diese Weise die benötigten Plasmaproteine wie Fibrinogen, die Vorstufe des Fibrins, Plasminogen, Fibronectin und die Faktoren der Blutgerinnungskaskade zur Verfügung stellt. Wie bei der Wundheilung stellt der Fibrinpfropf eine provisorische Matrix dar, in die inflammatorische Zellen, Fibroblasten und neue Blutgefässe einwandern. In beiden Vorgängen wird anschliessend der Fibrinpfropf aufgelöst und das Granulationsgewebe mit dichtem Kollagen gebildet. Das schliesslich ausgereifte Stroma aus Kollagen ermöglicht dem Tumor, der Immunantwort zu entgehen und sich ungehindert auszubreiten. Ein bedeutender Unterschied liegt in der Initiation der beiden Prozesse. Während die Verletzung bei der Wundheilung kurzfristig zur Fibrinablagerung führt, sorgt die Produktion von VPF durch

den Tumor für einen kontinuierlichen Nachschub an Plasmaproteinen zum Aufbau neuer provisorischer Matrix. Zu erwähnen ist auch das Fehlen von Thrombozyten, die in der Wundheilung eine Reihe von wichtigen Blutgerinnungsfaktoren und Wachstumsfaktoren liefern. Tumorzellen können diese Funktionen jedoch zum Teil übernehmen, indem sie z.B. TGFs sezernieren und dadurch Fibroblasten zur Proliferation und zur Migration anregen (Dvorak, 1986).

Die Gemeinsamkeiten machen deutlich, dass sich der Tumor einige wichtige Vorgänge der physiologischen Wundheilung zunutze macht, indem er körpereigene Abläufe zum Zwecke seiner eigenen Ausbreitung in Gang setzt. Da der Prozess jedoch nicht zeitlich limitiert ist, werden Tumore auch als „Wunden, die nicht heilen“ bezeichnet (Dvorak, 1986).

1.2 Die Rolle von Proteasen in der Karzinogenese

Proteasen sind sowohl an einer Reihe physiologischer Prozesse (z.B. Um- und Abbau von Gewebe, Blutgerinnung und Verdauung) als auch an pathophysiologischen Vorgängen (z.B. Wundheilung und Tumorgenese) beteiligt. Abhängig von ihrem katalytisch aktiven Zentrum werden Proteasen in fünf Hauptfamilien unterteilt: 1. Serinproteasen (z.B. uPA, Plasmin, Trypsin, Kallikreine), 2. Cysteinproteasen (z.B. Cathepsin B, Kaspasen), 3. Aspartylproteasen (z.B. Cathepsin D, Cathepsin E), 4. Metalloproteasen wie MMPs (Matrixmetalloproteasen, z.B. Gelatinasen, Collagenasen) oder ADAMs (a disintegrin and metalloprotease domain, z.B. TACE/ADAM17), 5. Threoninproteasen (z.B. das Proteasom). In den vergangenen 30 Jahren wurde die Funktion der Proteasen hauptsächlich auf die späten Stadien der Tumorgenese beschränkt und deren Rolle bei der Metastasierung von Tumoren ausführlich dokumentiert (Dano et al., 1999; Liotta and Stetler-Stevenson, 1991; Mignatti and Rifkin, 1993) (Abb. 1.2).

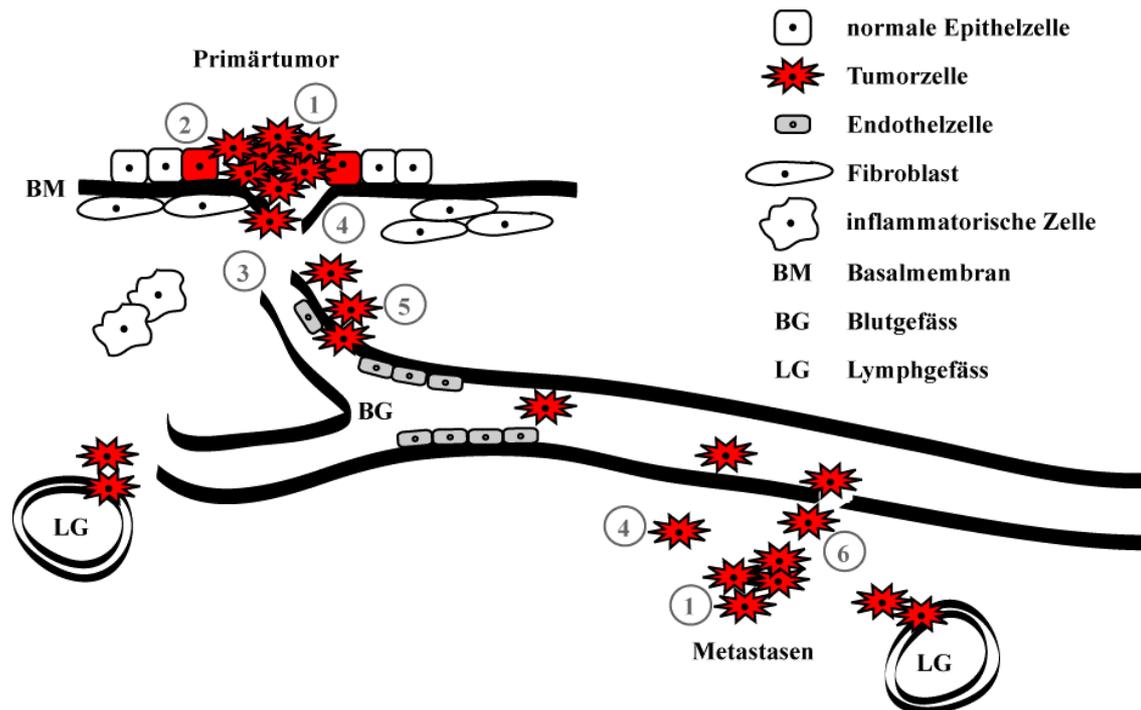


Abb. 1.2: Die Rolle von Proteasen in der Tumorgenese.

① Die Aktivierung von Onkogenen (z.B. *ras*), die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen (z.B. *p53*) sowie weitere epigenetische und genetische Veränderungen führen zur Entstehung eines epithelialen Primärtumors.

② Die Tumorzellen vollziehen den Schritt der EMT (epithelialen-mesenchymalen Transition).

③ Im Rahmen der Tumorangiogenese sorgen Endothelzellen für die Ausbildung neuer Blutgefäße (BG).

④ Nach der Auflösung der BM (Basalmembran) wandern die Tumorzellen in das mesenchymale Gewebe ein.

⑤ Die Tumorzellen dringen in das Blutgefäßssystem ein und werden über die Blutbahn im Körper verteilt.

⑥ Lokale Metastasen entstehen, wenn die Tumorzellen die Blutbahn verlassen.

Die Schritte ①-⑥ der Metastasierung werden durch Proteasen vermittelt, die über die Interaktion von Tumorzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, inflammatorischen Zellen und der extrazellulären Matrix reguliert werden.

(nach Koblinski et al., 2000).

Voraussetzung für die Invasion von Tumorzellen in das umliegende Gewebe ist eine verminderte Adhäsion der Zellen im Zellverband, die Migration und der Abbau der ECM. Es konnte gezeigt werden, dass Proteasen an allen drei Vorgängen entscheidend mitwirken. Die funktionelle Ausschaltung des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin (Kap. 1.1.3) kann nicht nur über Promotor-Silencing, Deletion oder andere Mutationen stattfinden, sondern auch über die Degradation durch proteolytische Enzyme (Compagni and Christofori, 2000). Die Überexpression der Metalloprotease Stromelysin-1/MMP-3 in Epithelzellen führt zur Spaltung von E-Cadherin und zum Zusammenbruch der Zell-Zell-Interaktionen. Interessanterweise führt der Verlust von E-Cadherin dabei wiederum zu einer transkriptionellen Aktivierung von *matrilysin-1/mmp-7* (Lochter et al., 1997).

Verschiedene Bestandteile der ECM können als Substrate für Proteasen fungieren und damit die physiologische Barriere für die Migration der Tumorzellen entfernen. Komponenten der ECM, die von Proteasen abgebaut werden können, sind Bestandteile der Basalmembran (z.B. Kollagen IV, Nidogen, Laminin), verschiedene Kollagene (z.B. Kollagen I), Proteoglykane (z.B. Aggrecan) u.v.m. (Noel et al., 1997; Kerkela and Saarialho-Kere, 2003). Neben der klassischen Annahme, dass die Proteolyse von ECM-Komponenten durch sezernierte oder membranassoziierte Proteasen ausschliesslich ausserhalb der Tumorzelle stattfindet, belegen neuere Studien den Abbau phagozytierter ECM durch im Zytoplasma (z.B. in Lysosomen) lokalisierte Enzyme (Koblinski et al., 2000).

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass bereits im Primärtumor Proteasen von Bedeutung sind (Compagni and Christofori, 2000; Stetler-Stevenson, 2001) (Abb. 1.2). Es konnte gezeigt werden, dass die Metalloprotease Matrilysin-1/MMP-7 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Neoplasien spielt und in frühen Stadien von humanen Kolonkarzinomen exprimiert ist (Fingleton et al., 1999). Das Mausmodell für familiäre adenomatöse Polyposis Coli basiert auf einer Mutation im Tumor-Suppressor-Gen *apc*, die zur spontanen Entwicklung von Darmpolypen führt. Wird diese sogenannte Min-Maus mit *matrilysin/mmp-7*-defizienten Mäusen verpaart, kommt es zu einer dramatischen Reduktion in Anzahl und Grösse der intestinalen Tumore (Wilson et al., 1997). Eine mögliche Erklärung dafür liefern Beobachtungen, dass Proteasen Wachstumsfaktoren wie bFGF (*basic fibroblast growth factor*), EGF, IGF (*insulin-like growth factor*), TGF- β und VEGF aus der ECM herauslösen und über deren Aktivierung letztendlich die Proliferation von Tumorzellen beeinflussen können (Taipale and Keski-Oja, 1997; Whitelock et al., 1996).

Auch die Tumorangiogenese, die Rekrutierung von Blutgefässen, die im Verlauf des Tumorwachstums beim Überschreiten eines grenzwertigen Volumens von 1 mm unentbehrlich ist, wird durch Proteasen unterstützt. Reduzierte Gelatinase A/MMP-2-Expression in Tumorzellen führt zu einer verringerten Angiogenese in dem Modellsystem der Chorioallantois-Membran des Hühnchens (Fang et al., 2000). Ausserdem sind Tumorangiogenese sowie Tumorwachstum in *gelatinase A/mmp-2*-defizienten Mäusen gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert (Itoh et al., 1998a). In prämaligen Läsionen der Haut erfolgt die Aktivierung von Gelatinase B/MMP-9 zeitgleich mit dem *angiogenen Switch* und *in vitro*-Untersuchungen dazu bestätigen, dass durch Chymase/MCP-4 aktivierte Gelatinase B/MMP-9 die Angiogenese in der hyperplastischen Haut induziert (Coussens et al., 1999). Auf der anderen Seite können Proteasen wie MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-12 auch Inhibitoren der Angiogenese wie Angiostatin, ein Spaltprodukt

des Plasminogens, und Endostatin, ein Spaltprodukt von Kollagen XVIII, generieren (Dong et al., 1997; Cornelius et al., 1998; Ferreras et al., 2000).

Bei der Betrachtung der Proteasen im Hinblick auf die Tumorgenese ist die aktive Rolle des Tumorstromas zu betonen, das sowohl die Expression als auch den Aktivierungsstatus von Proteasen beeinflussen kann (Ohtani, 1998; van den Hooff, 1988). Parakrine Faktoren wie TNF α , IL-1 (Interleukin-1), bFGF, EGF oder PDGF (*platelet derived growth factor*), die sowohl vom Tumor als auch vom Stroma sezerniert werden, können die Expression von uPA und MMPs regulieren (Noel et al., 1997; Uria et al., 1997; Bechtel et al., 1996; Esteve et al., 1998). EMMPRIN (*extracellular matrix metalloprotease inducer*), ein Glykoprotein auf der Oberfläche von Tumorzellen, stimuliert die Produktion verschiedener MMPs in benachbarten stromalen Zellen und vermag dadurch unter Umständen, Invasion, Tumorwachstum und Angiogenese zu beeinflussen (Guo et al., 2000).

Die Regulation der Aktivität von Proteasen erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Neben der transkriptionellen Regulation spielt die posttranslationale Aktivierung von proteolytischen Enzymen, die als Zymogen, d.h. in latenter, nicht-aktiver Pro-Form synthetisiert werden, eine wichtige Rolle. Die Aktivierung kann entweder durch Autokatalyse oder durch andere Proteasen vermittelt werden. Auf diese Weise entstehen komplexe Netzwerke und Kaskaden, an denen Proteasen verschiedener Familien mitwirken können. Beispielsweise kann die Aktivierung einiger MMPs wie Collagenase-1/MMP-1 und Stromelysin-1/MMP-3 sowohl über das uPA/Plasminogen-System als auch über Cathepsine stattfinden (Eeckhout and Vaes, 1977; Murphy et al., 1992). Bei einer Vielzahl von Proteasen erfolgt die Aktivierung in Form einer Kaskade, die bei der Induktion der Apoptose über Kaspasen und der Blutgerinnung über die Plasma-Kallikreine ihre physiologische Anwendung findet und in Tumor-assoziierten Prozessen für die Gruppe der Gewebe-Kallikreine postuliert wird (Yousef and Diamandis, 2002). Der Vorteil einer solchen Kaskade liegt darin, dass das von einem Molekül ausgehende Signal amplifiziert wird und mit der Aktivierung mehrerer Moleküle endet (Silverthorn, 2004). Zusätzlich ist eine Regulation an unterschiedlichen Punkten der Kaskade durch Inhibitoren möglich.

Die Mitglieder einzelner Proteasenfamilien können über selektive Inhibitoren in ihrer Aktivität blockiert werden. Serinprotease-Inhibitoren mit einem breiten Wirkungsspektrum, z.B. Aprotinin, unterbinden die katalytische Aktivität von Trypsin, Chymotrypsin, uPA und Kallikreinen (Grzesiak et al., 2000). Demgegenüber inaktivieren die äusserst spezifischen Inhibitoren aus der Familie der Serpine PAI-1 und PAI-2 (*plasminogen activator inhibitor-1* und *-2*) ausschliesslich die Plasminogen-Aktivatoren uPA und tPA (*tissue-type plasminogen activator*) bzw. α_2 -Antiplasmin ausschliesslich

Plasmin (Andreasen et al., 1997). Im Gegensatz dazu sind die Metalloprotease-Inhibitoren TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteases*) nicht nur an der Blockierung der enzymatischen Aktivität der MMPs und der ADAMs beteiligt, sondern auch an deren Aktivierung. TIMP-2 vermittelt auf der Zelloberfläche zusammen mit der membranständigen Metalloprotease MT1-MMP die Umwandlung von Pro-MMP-2 zu MMP-2 (Strongin et al., 1995; Kinoshita et al., 1998; Hernandez-Barrantes et al., 2000).

Bei der therapeutischen Intervention der Metastasenbildung kommen synthetischen MMP-Inhibitoren, sogenannten MPIs, eine besondere Bedeutung zu (Overall and Lopez-Otin, 2002; Egeblad and Werb, 2002). Während präklinische Studien mit MMP-Inhibitoren überaus vielversprechend schienen, können bislang nur minimale therapeutische Erfolge in klinischen Studien verzeichnet werden (Coussens et al., 2002). Es ist fraglich, ob eine Blockierung der MMPs für eine erfolgversprechende Behandlung fortgeschrittener Krebsformen ausreichend ist (Baker et al., 2002). Als besonders problematisch hat sich dabei die geringe Spezifität der Inhibitoren erwiesen, die mit einer Reihe von systemischen Nebenwirkungen für den Patienten verbunden ist. Hochselektive Inhibitoren für spezifische MMPs werden innerhalb lokal begrenzter Regionen benötigt, damit sowohl physiologische MMP-Funktionen als auch anti-tumorigene Wirkungen einzelner MMPs nicht beeinflusst werden. Tumor-supprimierende Funktionen von MMPs kann in *collagenase-3/mmp-8*-defizienten Mäusen beobachtet werden, die vermehrt Hauttumore ausbilden (Balbin et al., 2003). Weiterhin wurde auf mechanistischer Ebene die Freisetzung des Angiogenese-Inhibitors Angiostatin aus Plasminogen durch Matrilysin-1/MMP-7 und Gelatinase B/MMP-9 gezeigt (Patterson and Sang, 1997). Im Hinblick auf die Gruppe der Serinprotease-Inhibitoren wurden erste klinische Tests mit Aprotinin durchgeführt. Die post-operative Anwendung bei Patienten nach der Entfernung von Metastasen des Ösophaguskarzinoms und des PEK im Kopf- und Halsbereich ergab eine erhöhte Überlebensrate. Die pharmakologische Hemmung des uPA-Plasmin-Systems durch Aprotinin in der Tumorthherapie scheint somit, die Metastasenbildung erfolgreich zu reduzieren (Vaporciyan et al., 2004). Zunächst ist jedoch die Erhebung weiterer klinischer Daten erforderlich.

1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die Entschlüsselung molekularer Mechanismen der Tumorgenese und die Identifizierung der beteiligten Gene ist die Basis für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien und die Etablierung zuverlässiger Tumormarker, die wichtige Informationen über Diagnose und Prognose des Patienten liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurden Tumor-assoziierte Gene untersucht, die in den Prozess der epithelialen Karzinogenese involviert sind. Das ausgewählte Modellsystem der chemisch induzierte Karzinogenese der Mauhaut repräsentiert ein etabliertes System, um Einblicke in die mehrstufige, neoplastische Transformation epidermaler Zellen und die epitheliale Tumorentstehung zu gewinnen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit basieren auf einer *Microarray*-Analyse, bei der von definierten Tumorstadien aus dem experimentellen Mausmodell, repräsentiert durch TPA-behandelte Haut, Papillome und PEK, Expressionsprofile erstellt wurden. Nach der Validierung der identifizierten Gene sollte die differentielle Expression im humanen System überprüft werden. Eines der Tumor-assoziierten Gene, eine Serinprotease, wurde für detailliertere Untersuchungen ausgewählt. Bei deren Charakterisierung galt es, die folgenden Fragestellungen zu beantworten:

1. Wie sieht das Expressionsprofil der Protease in Hauttumoren und anderen epithelialen Tumoren aus?
2. An welchen Tumor-assoziierten Prozessen (Transformation, Migration und Invasion etc.) ist die Protease beteiligt?

Die Charakterisierung der Expression Tumor-assoziiierter Proteasen in epithelialen Tumoren und deren funktionelle Analyse eröffnen neue Möglichkeiten für die therapeutische Intervention Tumor-assoziiierter Prozesse wie invasives Wachstum, Metastasierung und Tumorangiogenese.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Fisher Scientific, England
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar für Bakteriologie	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche, Mannheim
Borsäure	Fluka Chemicals, Schweiz
Bisbenzimid H33342 Fluorochrom	Calbiochem, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Casaminosäuren	Becton Dickinson, Heidelberg
Chloroform	J.T.Baker, USA
Deoxycholsäure Na ⁺ -Salz	Fluka Chemicals, Schweiz
2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate	Promega, Mannheim
Dextransulfat	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haën, Seelze
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Entellan	Merck, Darmstadt
<i>Enhanced Chemoluminescence</i> Lsg.	Perkin Elmer LAS, Rodgau-Jügesheim
Entwickler-Lösung	Kodak, Stuttgart
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure	J.T.Baker, USA
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fixier-Lösung	Kodak, Stuttgart
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe

Formamid	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	AppliChem, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Harnstoff (Urea)	Fluka Chemicals, Schweiz
Hefeextrakt für Bakteriologie	GERBU Biotechnik, Gaiberg
HEPES	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Isopropanol (2-Propanol)	J.T.Baker, USA
Kaliumchlorid	Acros Organics, Belgien
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Mayer's Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel-de Haën, Seelze
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumkarbonat	AppliChem, Darmstadt
Natriumcitrat	Fluka Chemicals, Schweiz
Natriumchlorid	Fluka Chemicals, Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Natriumhydroxid	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Natrium-Kalium-Tartrat	Fluka Chemicals, Schweiz
Nonidet (NP-40)	Fluka Chemicals, Schweiz
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt
Phalloidin Alexa Fluor [®] 488	Molecular Probes, USA
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Photoemulsion	Kodak, Stuttgart
<i>Ponceau-S</i>	Sigma, Deisenhofen
Rinder Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Riedel-de Haën, Seelze
Szintillationsflüssigkeit	Beckman, München
<i>Talon Metal Affinity Resin/Talon beads</i>	BD Biosciences Clontech, Heidelberg

TEMED	Roth, Karlsruhe
TPA	Sigma, Deisenhofen
Triethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Tris-base	Roth, Karlsruhe
Tris-hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
tRNA	Sigma, Deisenhofen
Trypsin (IHC)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-Inhibitor (IHC)	Sigma, Deisenhofen
Trypton für Bakteriologie	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	Fluka Chemicals, Schweiz
Wasserstoffperoxid	AppliChem, Darmstadt
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Xylol	Fluka Chemicals, Schweiz

Weitere allgemein gebräuchliche Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

<i>Abi prism 310 Genetic Analyser</i>	Abi prism, Darmstadt
Bakterienplatten	Greiner, Frickenhausen
Bakterienschüttler	Infors AG, Schweiz
Begasungsbrutschrank (Zellkultur)	Heraeus, Hanau
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus, Hanau
<i>Corex</i> -Röhrchen	Schott, Mainz
Drehrad	cti, Idstein
Einbettungsmaschine <i>Tissue Tek TES</i>	Vogel, Giessen
Eismaschine	Scotsman, Ice Systems, USA
Elektrophoresekammer	BioRad, München
Elektroporationsgerät <i>Gene Pulser</i>	BioRad, München
<i>Elisa-Reader</i>	Titertek, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Greiner, Frickenhausen
<i>Falcon</i> -Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Feinwaage	Ohaus, Giessen
Fettstift	Kisker-Biotech, Mühlhausen
Filmkassetten	Rego, Augsburg
Geltrockner	cti, Idstein
Heizblock	Grant, UK

Horizontal-Elektrophoresekammer	Stratagene, Niederlande
Hybridisierungssofen	Bachhofer, Reutlingen
Kamera (Mikroskop DMIL)	Leica, Bensheim
Kryoröhrchen <i>Lip Seal</i> 2 ml	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman, München
Kühlzentrifuge 2K-15	Sigma, München
Küvetten	Hellma, Müllheim/Baden
Hell-Dunkelfeld-Mikroskop	Leica, Bensheim
Mikro-Dismembrator S	B. Braun Biotech Int., Melsungen
Mikrotom RM 2155	Leica, Bensheim
Mikrowellengerät	Bosch, Karlsruhe
<i>Northern blot</i> Membran	Perkin Elmer LAS, Rodgau-Jügesheim
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	American National Can, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
PCR-Gefäße	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
pH-Messgerät	Knick, Berlin
<i>Phosphoimager Fujifilm BAS-1500</i>	Fuji, Japan
Photometer <i>GeneQuant pro</i>	Pharmacia, Freiburg
<i>Pipetboy</i>	BrandTech, USA
Pipetten	Gilson, USA
Pipettenspitzen, gestopft	Axygen, USA
Plastik-Kassetten (Paraffineinbettung)	Polysciences, USA
Protein-Gelkammern	Sigma-Aldrich, München
RNA-Gelkammern	Kodak, Stuttgart
Röntgenfilme Fuji RX	Fuji, Düsseldorf
Röntgenfilm-Entwickler	Optimax Protec, Oberstenfeld
Sephadex-G50-Säule	Stratagene, Niederlande
Sicherheitswerkbank	The BAKER Company, USA
Spannungsgerät	BioRad, München
Szintillationszähler	Beckman, München
<i>Thermocycler PTC-200</i>	Biozym, Oldendorf
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Tomy Kogyo Co. Ltd, Japan
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Ultra-Turrax T25	Ika Labortechnik, Staufen
UV-Leuchttisch	Stratagene, Niederlande
UV-Stratalinker	Stratagene, Niederlande

Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserheizbäder	GFL, Burgwedel
<i>Western blot</i> -Apparatur	BioRad, München
<i>Western blot</i> -Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
<i>Whatman 3 MM</i> -Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Zellzählgerät <i>Coulter Counter</i>	Beckman, USA
Zellkulturartikel	Greiner, Frickenhausen
Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Zentrifuge J2-HS	Beckman, München
Zentrifuge Varifuge 3.OR	Hereaus, Hanau
Zentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Biofuge 13	Hereaus, Hanau

2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (+ Puffer)	Roche, Mannheim
AMV Reverse Transkriptase (+ Puffer)	Promega, Mannheim
DNase I (+ Puffer)	Promega, Mannheim
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsenzyme (+ Puffer)	New England Biolabs, USA
	Promega, Mannheim
	Roche, Mannheim
RNA-Polymerasen (T3, T7, Sp6)	Roche, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
Taq DNA-Polmerase (+ Puffer)	Sigma, Deisenhofen
T4 Ligase (+ Puffer)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.4 Radiochemikalien

[α - ³² P]-dCTP	Amersham, Freiburg
[α - ³⁵ S]-UTP	Amersham, Freiburg

2.1.5 Kits

DAB Substrat System	Vector Laboratories, Burlingame
Plasmid Aufreinigung- <i>Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick</i> Gelextraktions- <i>Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick</i> PCR Aufreinigungs- <i>Kit</i>	Qiagen, Hilden
Plasmid Aufreinigungs- <i>Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Rediprime Kit</i>	Amersham, Freiburg
RNA Aufreinigungs- <i>Kit</i>	Qiagen, Hilden

Vectastain ABC Kit

Vector Laboratories, Burlingame

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper

anti-Aktin (Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-E-Cadherin (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-hK6 (Maus)	Acris Antibodies, Hiddenhausen
anti-Myc (Maus)	Invitrogen, Karlsruhe
anti-MSP (Kaninchen)	freundlicherweise von M. Blaber, (Tallahassee, USA) zur Verfügung gestellt (Blaber et al., 2002)

Sekundärantikörper

anti-Kaninchen (Ziege), HRP	DAKO, Dänemark
anti-Kaninchen (Ziege), Cy3	Dianova, Hamburg
anti-Maus (Ziege), HRP	DAKO, Dänemark
anti-Ziege (Kaninchen), HRP	Sigma, Deisenhofen

2.1.7 Oligonukleotide

Tab. 1.: In der Tabelle sind die Vektor-spezifischen Oligonukleotide dargestellt, die für Sequenzierungsreaktionen verwendet wurden.

Oligonukleotid	Sequenz
<i>T7 forward</i>	5'– gta ata cga ctc act ata ggg c – 3'
<i>M13 reverse</i>	5'– gga aac agc tat gac cat g – 3'
<i>myc-tag reverse</i>	5'– cct ctt ctg aga tga gtt ttt gtt cg – 3'

Tab. 2.: Die Tabelle zeigt die Oligonukleotide, mit denen das offene Leseraster von *KLK6* in den Vektor pGEM[®]-T über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* kloniert wurde.

Die *EcoRI*- und *XhoI*-Schnittstellen für die Klonierung des kodierenden Bereiches der *KLK6*-cDNA sind fett hervorgehoben.

Oligonukleotid	Sequenz
<i>KLK6 EcoRI forward</i>	5'– agg aat tgc cgg cca tga aga agc – 3'
<i>KLK6 XhoI reverse</i>	5'– atg tca ggg ctc gag ctt ggc ctg – 3'

Tab. 3.: Die Tabelle zeigt die Oligonukleotide (PCR), die bei dieser Arbeit für die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt wurden.

(vgl. auch Hummerich et al., 2004; Manuskript eingereicht)

Oligonukleotid	Spezies	Sequenz
<i>adam8 forward</i>	murin	5'- atc gtg gca ggc atc gtc atc tac - 3'
<i>adam8 reverse</i>	murin	5'- ggg gga ggc ctc ttt ggt ttc - 3'
<i>adam8 forward</i>	human	5'- acc ccc agt gcc ccc agt caa ac - 3'
<i>adam8 reverse</i>	human	5'- ggc caa ggc ggg gag aag gaa t - 3'
<i>anax1 forward</i>	murin	5'- gtc ccg gga aga caa gca aa - 3'
<i>anax1 reverse</i>	murin	5'- ggc gct gag cat tgg tcc tct - 3'
<i>bssp forward</i>	murin	5'- ctg gcc ctg tgc ttg gtt ct - 3'
<i>bssp reverse</i>	murin	5'- gag cag tca ttc ttc aag gg - 3'
<i>crabp2 forward</i>	murin	5'- ggg gag gaa ttt gag gag cag ac - 3'
<i>crabp2 reverse</i>	murin	5'- ggc gta gag aag gca aag aac aa - 3'
<i>fh11 forward</i>	murin	5'- tca ccg ctg tgg agg acc agt att - 3'
<i>fh11 reverse</i>	murin	5'- gct gca act ctt aca ccg cag tca - 3'
<i>fosl1 forward</i>	murin	5'- ttg ctc ctc cgc tca ccg aag a - 3'
<i>fosl1 reverse</i>	murin	5'- agg cct gct gga tca atg gga gaa - 3'
<i>gsn forward</i>	murin	5'- cat cta caa ctg gca ggg tgc - 3'
<i>gsn reverse</i>	murin	5'- gct gtc tgc cca cca tca c - 3'
<i>h19 forward</i>	murin	5'- agg cga gga tga cag gtg tgg t - 3'
<i>h19 reverse</i>	murin	5'- gag gct tgg ctc cag gat gat g - 3'
<i>hKLK6 forward</i>	human	5'- agg aat tcc cgg cca tga aga agc - 3'
<i>hKLK6 reverse</i>	human	5'- atg tca ggg ctc gag ctt ggc ctg - 3'
<i>hKLK9 forward</i>	human	5'- ctt ggc agg cgt ggt gtc - 3'
<i>hKLK9 reverse</i>	human	5'- agg ggc gga gct att ttg tgt aag - 3'
<i>jup forward</i>	murin	5'- agc tcc acc tca cgc ctg ttt - 3'
<i>jup reverse</i>	murin	5'- cat agt ggg gac ggg gag aa - 3'
<i>lcn2 forward</i>	murin	5'- cca gga ctc aac tca gaa ctt - 3'
<i>lcn2 reverse</i>	murin	5'- agg ctc cag atg ctc ctt ggt - 3'
<i>ndr2 forward</i>	murin	5'- ccc tca agt gcc ctg tga - 3'
<i>ndr2 reverse</i>	murin	5'- aga ccg aga tag cgc agt cat - 3'
<i>nr6a1 forward</i>	murin	5'- ccg tcc atc ctc ctc cct tct - 3'
<i>nr6a1 reverse</i>	murin	5'- cct ttc cca cag ctt cca ttt ga - 3'
<i>nupr1 forward</i>	murin	5'- aga cta ggc ata atg gcc acc tt - 3'
<i>nupr1 reverse</i>	murin	5'- cct agg tcc tgc tta caa ctc cta at - 3'
<i>rik1200016C12 forward</i>	murin	5'- gct ctt gcc agg gtg act ttg - 3'
<i>rik1200016C12 reverse</i>	murin	5'- cgt cgc ggg gtg ctt tga c - 3'
<i>rik4930579A11 forward</i>	murin	5'- gga gat cta agc ggg act atg agg - 3'
<i>rik4930579A11 reverse</i>	murin	5'- gac agg ggg caa gca cga g - 3'
<i>gapdh forward</i>	murin/human	5'- acc aca gtc cat gcc atc act - 3'
<i>gapdh reverse</i>	murin/human	5'- tac agc aac agg gtg gtg ga - 3'
<i>lamin b1 forward</i>	human	5'- ctg gaa atg ttt gca tgg aag a - 3'
<i>lamin b1 reverse</i>	human	5'- gcc tcc cat tgg tgg atc c - 3'
<i>β-tubulin forward</i>	murin	5'- gga aca tag ccg taa act gc - 3'
<i>β-tubulin reverse</i>	murin	5'- tca ctg tgc ctg aac tta cc - 3'
<i>tnfrsf12a forward</i>	murin	5'- gcg ctg atc cag tga caa tg - 3'
<i>tnfrsf12a reverse</i>	murin	5'- gct gca gtt cct tag tca gt - 3'

2.1.8 Sonden für *in situ*-Hybridisierungen und Expressionsanalysen

ISH: *anxa1*, *lcn2*, *tnfrsf12a*, *rik4930579A11*, *rik2210418J09* (*murin*)

Für die Herstellung der Hybridisierungssonden wurden die Plasmide aus der *LION arrayTAG™ Clone Collection Mouse* (LION Biosciences, Heidelberg) im 5'- bzw. 3'-Bereich der Klonierungsstelle des Vektors pBSC-SK-(N)TER mit SacI bzw. XhoI zur Generierung der *sense*- bzw. *antisense*-Ribonukleotidsonde linearisiert und mit T7- bzw. T3-Polymerase *in vitro* transkribiert.

ISH: *anxa1*, *lcn2* (*human*)

Der *anxa1* cDNA-Klon IMAGp998N05672Q2 (RZPD, Berlin) und der *lcn2* cDNA-Klon HU3_p983E09130D (RZPD, Berlin) wurden mit den Restriktionsenzymen NotI bzw. EcoRI in der Klonierungsregion des Vektors pT7T3D-PacI linearisiert und die *sense*- bzw. *antisense*-Ribonukleotidsonde mit T7- bzw. T3-Polymerase hergestellt.

ISH: *s100a8*, *s100a9* (*human*)

Plasmide mit cDNA-Sequenzen von *s100a8* und *s100a9* im Vektor pGEM®-T wurden mit den Restriktionsenzymen NcoI bzw. PstI im Falle von *s100a8* und SphI bzw. PstI im Falle von *s100a9* linearisiert. Anschliessend wurde mit Sp6- bzw. T7-Polymerase die *sense*- bzw. *antisense*-Ribonukleotidsonde generiert.

ISH: *bssp*

Für die *bssp*-Hybridisierungssonde wurde ein mit den Restriktionsenzymen HindIII und PstI hergestelltes Fragment, das Exon 3 bis Exon 5 der cDNA enthält und eine Grösse von 235 bp besitzt, in den Vektor pBluescript II SK (+) subkloniert. Die Linearisierung mit HindIII bzw. PstI ergab durch *in vitro*-Transkription mit T3- bzw. T7-Polymerase die *antisense*- bzw. *sense*-Ribonukleotidsonde.

ISH: *KLK6*

Der gesamte Bereich des offenen Leserasters der *KLK6*-cDNA wurde in den Vektor pGEM®-T über EcoRI- und XhoI-Schnittstellen kloniert. Im Anschluss an die Linearisierung des Vektors mit XhoI bzw. EcoRI wurde mit T7- bzw. Sp6-Polymerase die jeweilige *sense*- bzw. *antisense*-Ribonukleotidsonde generiert.

Expressionsanalyse: *KLK6*

Für die Expressionsanalyse von *KLK6* mittels *Northern blot* sowie für die Hybridisierung des *BD Clontech™ Cancer Profiling Arrays II* wurde ein durch die Restriktionsenzyme PstI und SphI hergestelltes 470 bp grosses cDNA-Fragment, das den Bereich von Exon 3 bis Exon 7 umfasst, für die radioaktive Markierung eingesetzt.

2.1.9 Vektoren

pGEM [®] -T	Promega, Mannheim
pBluescript II SK (+)	Stratagene, Niederlande
pcDNA3.1 [®] /His-myc-A, B, C	Invitrogen, Karlsruhe
pBSC-SK-(N)-TER	LION Biosciences, Heidelberg
pT7T3D-PacI	RZPD, Berlin

2.1.10 Bakterienmedien

TY-Medium: 1% Trypton; 1% Hefeextrakt; 0,1% Casaminsäuren; 0,5% NaCl

TY-Amp-Medium: TY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

Agarplatten: TY-Amp-Medium mit 2% (w/v) Agar

2.1.11 Bakterienstämme

E.coli XL1 blue

Genotyp: F⁺::Tn10 *proAB+lacI^qΔZM15, recA1, endA1, gyrA96, (Nal^r), thi, hsdR17 (rk-, mk+), supE44, relA1, lac*

2.1.12 Zellkultur

BPE (<i>bovine pituitary extract</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM	BioWhittaker, Belgien
DMEM ohne Ca ²⁺	Invitrogen, Karlsruhe
Hanks' Salzlösung (10x)	Biochrom AG, Berlin
α-MEM	BioWhittaker, Belgien
4xMEM	Biochrom AG, Berlin
DMSO	Merck, Darmstadt
EGF (<i>epidermal growth factor</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma, Deisenhofen
Geneticin (G418)	PAA Laboratories, Österreich
HAM's F12	Invitrogen, Karlsruhe
Ker-SFM	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	PAA Laboratories, Österreich
MEM-Aminosäuren (50x)	Biochrom AG, Berlin
MEM-Vitamine (100x)	Biochrom AG, Berlin
Natriumbikarbonat	Biochrom AG, Berlin
nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/EDTA	BioWhittaker, Belgien

2.1.13 Eukaryontische Zelllinien

Tab. 4: In der Tabelle sind die eukaryontischen Zelllinien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, aufgeführt.

<i>Zelllinie</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Spezies</i>	<i>Quelle</i>	<i>Literaturnachweis</i>
HT-1080	Fibrosarkom-Zellen	human	DKFZ	(Rasheed et al., 1974)
hTERT	Keratinocyten; immortalisiert	human	G. Fürstenberger, DKFZ, Heidelberg	(Dickson et al., 2000; Rheinwald et al., 2002)
MCA3D	Keratinocyten; nicht-tumorigen	murin	G. Fürstenberger und F. Marks, DKFZ, Heidelberg	(Kulesz-Martin et al., 1983)
MCA3D/AT3	Keratinocyten; maligne Tumore	murin		(Quintanilla et al., 1991)
MELN	Mammakarzinom- Zellen	human	S. Medunjanin, DKFZ	(Gagne et al., 1994)
SCL-I, SCL-II	PEK-Zellen	human	C. Mauch, Universitätsklinik Köln	(Boukamp et al., 1982; Tilgen et al., 1983)
Reb	Keratinocyten; nicht-tumorigen	murin		/
SP1	Keratinocyten; benigne Tumore	murin		/
CarB	Keratinocyten; maligne Tumore	murin	G. Fürstenberger und F. Marks, DKFZ, Heidelberg	(Fusenig et al., 1978; Fusenig et al., 1985)
308	Keratinocyten; benigne Tumore	murin		(Yuspa et al., 1983)
PMK-R3	Keratinocyten; maligne Tumore	murin		(Rennecke et al., 1999)
PECA	Keratinocyten; maligne Tumore	murin		(Krieg et al., 1988)
PDV	Keratinocyten; maligne Tumore	murin		(Fusenig et al., 1978; Fusenig et al., 1985)

2.1.14 Murines Tumormaterial

TPA-behandelte Haut

Die Rückenhaut von C57BL/6- und NMRI-Mäusen wurde vorsichtig rasiert und drei Tage danach mit 10 nmol in 100µl Azeton TPA gelöstem behandelt (Schlingemann et al., 2003). Als Kontrolle diente reines Azeton. Sechs Stunden nach der TPA-Applikation wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet.

Papillome und Plattenepithelkarzinome

Papillome und Plattenepithelkarzinome aus der chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese der Maushaut wurden freundlicherweise von G. Fürstenberger, DKFZ, bereitgestellt (Fürstenberger and Kopp-Schneider, 1995).

2.1.15 Humanes Tumormaterial

Haut-Biopsien von Patienten mit gut differenzierten Plattenepithelkarzinomen, Basalzellkarzinomen und Keratoakanthomen wurden freundlicherweise von C. Mauch, Universitätsklinik Köln, zur Verfügung gestellt. Die Patienten unterzeichneten die Einver-

ständniserklärung der Abteilung für Dermatologie der Universität zu Köln mit der Genehmigung der internationalen Ethikkommission (Az. 9645/96).

2.1.16 Material für Wundheilungsstudien

RNA, die 30 min, 6 Std., 1 Tag, 3 Tage, 5 Tage, 7 Tage und 14 Tage nach Verwundung der murinen Rückenhaul präpariert worden war, wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt und von L. Florin, DKFZ, für diese Arbeiten zur Verfügung gestellt.

Kryoschnitte von Wunden, die nach definierten Zeitpunkten (1, 3, 5, 7 und 10 Tage) auf dem Rücken von Mäusen erzeugt worden waren, sowie von unverwundeter Rückenhaul wurden freundlicherweise von L. Florin und B. Dittrich, DKFZ, zur Verfügung gestellt.

2.1.17 Puffer und Lösungen

1x MOPS: 20 mM Morpholinopropansulfonsäure; 5 mM NaOAc; 0,5 mM EDTA; pH 7,0

1x NTE: 0,5 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM EDTA

1x PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM NaH₂PO₄; pH 7.6

1x SSC: 150 mM NaCl; 12,5 mM Na-Citrat; pH 6,5

1x TBE: 90 mM Tris-HCl, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA

2.1.18 Molekulargewichtsmarker

Gene Ruler Ladder Mix MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Prestained Protein Marker New England Biolabs, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische DNA Methoden

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA wurden die Zellen in 500 µl Zell-Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS; 25 µl 10mg/ml Proteinase K) bei 55°C für 3 Std. lysiert. Danach wurden 200 µl 6 M NaCl zugegeben. Nach Mischen der lysierten Zellen für 5 min erfolgte deren Zentrifugation (13000 x g; 10 min). Der erhaltene Überstand wurde mit 0.7 Volumen Isopropanol versetzt und im Anschluss an sorgfältiges Mischen wiederum zentrifugiert (13000 x g; 10 min). Das erhaltene *Pellet* wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl dH₂O resuspendiert.

2.2.1.2 Plasmidpräparation im kleinen Massstab

Zur Routine-Analyse von Klonierungen wurden Bakterien in 2 ml TY-Medium, dem 100 µg/ml Ampicillin (TY-Amp-Medium) hinzugefügt wurden, bei 37°C im Schüttelinkubator über Nacht angezogen. Die Resuspension der durch Zentrifugation (4000 upm; 3 min) sedimentierten Bakterien erfolgte in 200 µl Lösung I (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A). Die Bakterien wurden anschliessend durch 200 µl Lyse-Puffer (200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS) lysiert und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 200 µl Neutralisierungspuffer (3 M Kaliumazetat pH 5,5) und sorgfältigem Mischen wurde das Lysat zentrifugiert (13000 upm; 10 min). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäss überführt und die DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Das durch Zentrifugation (13000 upm; 10 min) erhaltene DNA-*Pellet* wurde mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl dH₂O resuspendiert.

2.2.1.3 Plasmidpräparation im grossen Massstab

Um grössere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wurden 500 ml TY-Amp-Medium mit 500 µl einer Bakterienvorkultur angeimpft und über Nacht auf einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden am darauffolgenden Tag abzentrifugiert (5000 x g; 10 min; 4°C) und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Plasmid Aufreinigungs-*Kits* (Qiagen, Hilden) nach den Vorschriften des Herstellers präpariert.

2.2.1.4 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen zur Analyse von klonierter DNA unter den von den Herstellerfirmen angegebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Um 1 µg Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen zu schneiden, wurde die DNA mit der zwei- bis fünffachen Enzymmenge (2–5 U) für 1–2 Std. in der entsprechenden Verdünnung der Restriktions-

puffer inkubiert. Die Inkubationstemperatur richtete sich dabei nach dem angegebenen Wirkungsoptimum der Restriktionsenzyme.

2.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA

Um die Religation eines linearisierten Vektors zu unterbinden, wurde nach beendetem Restriktionsverdau des Vektors dem Ansatz 1/10 Volumen 10x Dephosphorylierungspuffer und 1 μ l 1 U/ μ l Alkalische Phosphatase zugegeben. Die Reaktion wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Vektor-DNA über ein Agarosegel aufgereinigt, extrahiert (Kap. 2.2.1.10) und für die Ligation verwendet (Kap. 2.2.1.6).

2.2.1.6 Ligation von DNA

Die Ligation kompatibler DNA-Enden wurde durch T4 DNA-Ligase katalysiert. Neben 1 U des Enzyms sowie 1x Ligationspuffer enthielten die Reaktionsansätze in einem Gesamtvolumen von 20 μ l die entsprechenden Nukleinsäuren, wobei 20–50 ng Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:10 zu dem zu klonierenden Molekül eingesetzt wurde. Der Ansatz wurde 1 Std. bei RT inkubiert. Die anschließende Transformation von chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien (Kap. 2.2.1.7) erfolgte mit der Hälfte der Ligationsreaktion (Kap. 2.2.1.8).

2.2.1.7 Herstellung von chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien

100 ml TY-Medium wurde mit dem Bakterienstamm *XL-1 blue* angeimpft und unter Schütteln bei 180 upm und 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,48 inkubiert. Anschliessend wurde die Zellsuspension in zwei sterile 50 ml Röhren überführt und für 10 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (3000 upm; 10 min; 4°C) wurden die *Pellets* in eiskalter Lösung I (100 mM RbCl₂; 50 mM MnCl₂; 30 mM KAc; 10 mM CaCl₂; 15% (v/v) Glycerol; pH 5,8) resuspendiert und für 3 Std. auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (3000 x g; 10 min; 4°C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml eisgekühlter Lösung II (10 mM MOPS; 10 mM RbCl₂; 75 mM CaCl₂; 15% (v/v) Glycerol; pH 7) resuspendiert. 100 μ l Aliquots wurden angefertigt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.8 Transformation von chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien

100 μ l chemisch kompetente *E.coli* Bakterien wurden zur Hälfte des eisgekühlten DNA-Ligationsansatzes (50–100 ng DNA in 10 μ l dH₂O) gegeben. Nach Inkubation auf Eis für 30 min wurde ein 90 sek langer Hitzeschock bei 42°C durchgeführt und die Bakterien 5 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 1 ml TY-Medium wurde die Suspension 30 min bei 37°C und 180 upm geschüttelt. 100 μ l Aliquots wurden auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.9 Elektrophorese von DNA

Je nach Grösse der zu trennenden DNA-Fragmente wurden für die Analyse von DNA horizontale Agarosegele mit 0,7% bis 2% Agarosegehalt und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid eingesetzt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente 1x TBE. Die Proben wurden mit 1x DNA-Ladepuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol FF; 30% (v/v) Glycerin) versetzt und zusammen mit einem DNA-Molekulargewichtsstandard bei 5–10 V/cm gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und zur Dokumentation photographiert.

2.2.1.10 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem *QIAquick* Gel-extraktions-Kit von (Qiagen, Hilden) entsprechend der Angaben des Herstellers ausgeführt.

2.2.1.11 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Um Proteinverunreinigungen aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurde die DNA mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) gut vermischt und zentrifugiert (13000 upm; 3 min). Danach wurde die wässrige Phase zweimal mit einem Volumen eines Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Gemisches extrahiert.

2.2.1.12 Ethanolpräzipitation von DNA

Zu einem Volumen DNA-Suspension wurde 1/10 Volumen einer 3M NaOAc-Lösung pH 5,2 und 2,5 Volumen 100% (v/v) eisgekühltes Ethanol zugegeben, gemischt und 15 min bei -80°C inkubiert. Anschliessend wurde die Mischung 15 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert und das *Pellet* mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete DNA-*Pellet* wurde in dH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.1.13 Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösung

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm im Abgleich gegen das verwendete Lösungsmittel. Im Allgemeinen gilt:

für *doppelsträngige DNA*: OD₂₆₀ von 1 entspricht eine Konzentration von 50 µg/ml

für *RNA*: OD₂₆₀ von 1 entspricht eine Konzentration von 40 µg/ml

für *einzelsträngige Oligonukleotide*: OD₂₆₀ von 1 entspricht eine Konzentration von 33 µg/ml

Eine Kontamination mit Proteinen (Absorptionsmaximum bei 280 nm) lässt sich durch Erstellen des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ erkennen. Reine DNA und RNA ist charakterisiert durch einen Quotienten von 1,8–2,0.

2.2.1.14 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine Standard-Reaktion zur Amplifikation von DNA wurde unter den folgenden Bedingungen in einem *Thermo-Cycler* durchgeführt: 1/10 Volumen 10x Taq-Puffer bzw. 10x GB-Puffer (166 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 670 mM Tris-HCl pH 8,8; 67 mM MgCl_2 ; 50 mM β -Mercaptoethanol; 67 μM EDTA), 1/10 Volumen 10x dNTP-Lösung (je 2 mM dATP; dCTP; cGTP; dTTP; pH 7,0), je 1/10 Volumen 10x Oligonukleotide (2,5 mM), 1-2 U Taq-Polymerase und 10–500 ng Matrizen-DNA wurden mit dH_2O auf das entsprechende Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 1 min, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Oligonukleotide optimalen Temperatur und die DNA-Synthese bei 72°C (Taq-Puffer) bzw. 65°C (GB-Puffer) für 0,5–1,5 min abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Produktes.

2.2.1.15 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Zur Sondenherstellung wurde das *Rediprime-Kit* (Amersham, Freiburg) verwendet, das auf der *random primer*-Methode (Feinberg and Vogelstein, 1983) basiert. Die Markierung der Sonde erfolgte entsprechend der Empfehlung des Herstellers. Hierbei wurde 10–20 ng des zu markierenden DNA-Fragmentes in einem Gesamtvolumen von 45 μl durch Erhitzen auf 95°C für 5 min denaturiert, anschliessend 5 min auf Eis abgekühlt und zu der *Rediprime*-Mischung, einem Lyophilisat aus Desoxynukleotid-Triphosphaten, Nonamer-Oligonukleotiden, DNA-Polymerase und Reaktionspuffer, gegeben. Dann wurden 5 μl [α - ^{32}P]-dCTP (50 μCi) hinzupipettiert und der Ansatz 10 min bei 37°C inkubiert, damit die radioaktiv markierten Nukleotid-Triphosphate in die entstehenden Doppelstränge eingebaut werden können. Zur Trennung des markierten Fragmentes von nicht eingebauten Nukleotiden wurde der Ansatz über eine Sephadex-G50-Säule (Stratagene, Niederlande) nach dem Prinzip der Gelfiltration entsprechend der Angaben des Herstellers geleitet. Um den Einbau an radioaktiven Nukleotiden in die Sonde zu bestimmen, wurden 3 μl von dem 140 μl Gesamteluat der Säule im Szintillationszähler (LS5000TD, Beckman) vermessen.

2.2.1.16 Hybridisierung des *BD Clontech™ Cancer Profiling Arrays II*

Der *BD Clontech™ Cancer Profiling Array II* (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) umfasst cDNAs von 154 Tumorpatienten amplifiziert aus Tumorgewebe von Brust, Ovar, Kolon, Magen, Lunge, Niere, Blase, Vulva, Prostata, Uterus, Zervix, Rektum, Schilddrüse, Hoden, Haut, Dünndarm und Pancreas sowie cDNA der entsprechenden pathologisch unveränderten Gewebe der gleichen Patienten, die auf eine Nylonmembran nebeneinander aufgetragen wurden. Zusätzlich befinden sich Hybridisierungskontrollen, Positivkontrollen und cDNAs von neun verschiedenen tumorigenen Zelllinien auf der Membran. Die Hybridisierung des Arrays erfolgte entsprechend der Herstellerangaben mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (Kap. 2.2.1.15).

2.2.1.17 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten dNTPs. In einem Standardansatz für die Sequenzierungsreaktion wurden ca. 0,8 µg Plasmid-DNA, die entsprechenden Oligonukleotide (2 pmol) und 2 µl *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, USA) mit dH₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt, gemischt und in einem *Thermo-Cycler* folgenden Temperaturzyklen ausgesetzt: [96°C, 15 sek; 55°C, 8 sek; 60°C, 4 sek] x 30. Zur weiteren Aufarbeitung wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt (Kap. 2.2.1.12) und das *Pellet* in 20 µl TSR-Puffer (Applied Biosystems, USA) resuspendiert. Der Ansatz wurde nun 3 min bei 90°C erhitzt, 5 min auf Eis gekühlt und in einem *AbiPrism 310* Sequenzierer analysiert.

2.2.2 Molekularbiologische RNA-Methoden

Sämtliche Arbeiten mit RNA sowie alle Zentrifugationsschritte erfolgten stets auf Eis bzw. bei 4°C in einer Kühlzentrifuge.

2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 1 ml Trizol lysiert. Mit einem Gummischaber wurden die lysierten Zellen von der Gewebekulturschale abgelöst. Mittels einer Injektionsspritze wurde durch mehrmaliges Auf- und Abziehen, die genomische DNA geschert und in ein steriles 15 ml *Falcon*-Röhrchen überführt. Das Zelllysat wurde 5 min auf Eis inkubiert, mit 1/5 Volumen Chloroform versetzt und gut durchmischt. Nach anschließender Zentrifugation (4000 upm; 30 min; 4°C) wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und mit dem gleichen Volumen 100% Ethanol versetzt. Im weiteren Verlauf erfolgte die Aufreinigung über die *RNeasy*-Säulen des RNA Aufreinigungs-*Kits* (Qiagen, Hilden) entsprechend der Herstellerangaben. Die RNA wurde mit 250 µl dH₂O eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Zur Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Tumormaterial wurde 1 ml Trizol pro 50–100 mg Gewebe zugegeben. Das Gewebe wurde entweder im Ultra-Turrax T25 zerkleinert oder mit Hilfe eines Mikro-Dismembrators, dessen Komponenten (Teflon-Kapseln und Wolframkarbid-Kugeln) zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt worden waren, pulverisiert. Die weiteren Schritte erfolgten analog zu der RNA-Isolierung aus Zellen.

2.2.2.2 Synthese von cDNA

Um Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden, wurden 5 µg der isolierten Gesamt-RNA mit 2 U DNase in 1/10 Volumen 10x DNase-Puffer für 30 min bei 37°C in

einem Gesamtvolumen von 20 µl inkubiert. Nach der sich anschliessenden Phenol-Chloroform-Extraktion (Kap. 2.2.1.11) und Ethanolpräzipitation (Kap. 2.2.1.12) wurden 2 µg Gesamt-RNA bei 70°C für 3 min denaturiert und in einem Volumen von 25 µl mit den Oligonukleotiden *Oligo dT* (Invitrogen, Karlsruhe) unter Zugabe folgender Reagenzien revers transkribiert: 1/5 Volumen 5x AMV-Puffer, 1 mM Desoxynukleotid-Triphosphate, 100 ng *Oligo dT*, 20 U AMV-Reverse Transkriptase sowie 1,5 U RNase-Inhibitor. Der Ansatz wurde 40 min bei 41°C und 10 min bei 65°C inkubiert und anschliessend auf Eis gestellt. In der sich anschliessenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die komplementär zu der vorgelegten Matrizen-DNA sind, cDNA-Fragmente mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase amplifiziert (Kap. 2.2.1.14).

2.2.2.3 Elektrophorese von RNA

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden 1%-ige Agarosegele mit 1/6 Volumen 37% (v/v) Formaldehyd-Lösung sowie 1/20 Volumen 20x MOPS-Puffer hergestellt. Die Vorbereitung der Proben umfasste die Denaturierung von 12–15 µg RNA in 20 µl 1x Denaturierungspuffer (50% Formamid; 18% Formaldehyd (37%); 1x MOPS). Nach Erwärmung für 15 min auf 65°C wurden die Proben unverzüglich auf Eis gestellt, mit 10x RNA-Ladepuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol FF; 30% (v/v) Glycerin) versetzt und in die Geltaschen überführt. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel zur Entfernung des Formamids 30 min in dH₂O gebadet. Das Anfärben der RNA erfolgte für 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml in H₂O) und das Entfärben für mindestens 30 min in dH₂O. Zum Schluss wurde die Qualität der RNA unter UV-Durchlicht kontrolliert und photographisch festgehalten.

2.2.2.4 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (*Northern blot*)

Der Nachweis spezifischer RNA mittels radioaktiv markierter DNA-Sonden erfolgte mit einer dem *Southern blot*-Verfahren analogen Methode.

Das RNA-Gel wurde nach beendeter Elektrophorese unter UV-Licht mit einem Längenstandard photographiert. Anschliessend wurde das Gel auf einer Glasplatte über einem 10x SSC Pufferreservoir plaziert, worauf sich ein *Whatman 3 MM*-Papier, mit 10x SSC getränkt, befand. Auf das Gel wurde luftblasenfrei die Nylon-Membran *Gene Screen plus* gelegt und darauf wiederum drei Lagen mit 10x SSC getränktem *Whatman 3 MM*-Papier. Darüber wurde ein Stapel Papiertücher geschichtet, der mit einem Gewicht beschwert wurde. Über Kapillarkräfte wurde die Flüssigkeit über Nacht nach oben gesaugt und somit die RNA auf die Membran transferiert. Am nächsten Tag wurde die Membran in 2x SSC gewaschen und danach für 1 Std. bei 80°C inkubiert. Zur kovalenten Fixierung der

RNA an die Membran, wurde die Membran kurzzeitig UVC-Strahlung (Einstellung *autocrosslink*; Stratagene, Niederlande) exponiert.

2.2.2.5 Hybridisierung von RNA

Die auf die Membran fixierte RNA wurde in einer Glasröhre mit 10 ml Hybridisierungslösung (7% SDS; 0,5 M Phosphatpuffer; 1 mM EDTA) in einem Ofen bei 56°C für mindestens 1 Std. unter Rotation prähybridisiert. Danach wurden etwa 2–3x10⁷ cpm einer radioaktiv markierten Sonde (Kap. 2.2.1.15), die zuvor 5 min bei 95°C denaturiert worden war, zugegeben. Die Hybridisierung mit der Sonde erfolgte bei 65°C über Nacht. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurde die Membran unter Rotation der Röhre 15 min mit Waschlösung 1 (40 mM Phosphatpuffer; 5% SDS; 1 mM EDTA) bei 65°C gewaschen. Danach erfolgten drei weitere Waschschrirte mit Waschlösung 2 (40 mM Phosphatpuffer; 1% SDS; 1 mM EDTA) bei 65°C für 15 min. Zum Schluss wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach Stärke des Signals mit Verstärkerfolie bei -80°C belichtet.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Zur Unterbindung von Proteaseaktivitäten wurden sämtliche Arbeiten mit Proteinen stets auf Eis und mit eisgekühlten Lösungen bzw. in Gegenwart eines Protease-Inhibitors (1 mM PMSF) durchgeführt sowie zur Zentrifugation stets eine Kühlzentrifuge bei 4°C verwendet.

2.2.3.1 Herstellung von Gesamt-Proteinextrakten

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen zunächst zweimal mit kaltem PBS gewaschen, danach mit einem Gummischaber von der Gewebekulturschale abgelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation (4000 upm; 3 min; 4°C). Nach der Zugabe des dreifachen Sedimentvolumens an Lysispuffer PP100 (25 mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM NaCl; 100 mM KCl; 10% Glycerin; 0,1% NP-40) bzw. RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 0,5% Deoxycholsäure Na⁺-Salz; 1% NP-40) wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Lysat erneut zentrifugiert (13000 upm; 10 min; 4°C) und der Überstand in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde anhand eines kleinen Aliquots bestimmt und der verbleibende Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde entsprechend der klassischen Methode nach Lowry bestimmt (Lowry et al., 1951). Dazu wurden je 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung auf 150 µl mit Lowry-Lösung I (2% Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH) aufgefüllt und dann mit

250 µl einer frisch hergestellten Lowry-Lösung IV (2% Na-K-Tartrat/1% CuSO₄x5H₂O/ Lowry-Lösung I im Verhältnis von 1 : 1 : 100) gemischt. Nach einer Inkubation für 5 min bei RT wurden 100 µl Lowry-Lösung III (50% Folin-Reagenz in Wasser verdünnt) zugegeben und für 30–90 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Zur Quantifizierung wurden Eichlösungen mit bekannten BSA-Konzentrationen parallel dazu verarbeitet. Je 100 µl des Reaktionsansatzes wurden in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 660 nm im *ELISA-Reader* gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte anhand der Regressionsgeraden der Eichkurve.

2.2.3.3 Aufreinigung von Proteinen durch *Talon beads*

Die Aufreinigung rekombinanter Proteine mit einem Histidin₆-Rest erfolgte mit *Talon beads* (*Talon Metal Affinity Resin*) aus Zellkulturüberständen. Dazu wurden 100–200 µl *Talon beads* eingesetzt und mit 10 ml PBS zwei- bis dreimal äquilibriert und dabei nach jedem Schritt zentrifugiert (4000 upm; 5 min; 4°C). Anschliessend wurden die Zellkulturüberstände zu den *Talon beads* gegeben und die Reaktionsansätze inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS auf dem Drehrad für je 10 min, wobei zur Sedimentation der *Talon beads* jeweils 5 min zentrifugiert wurde (4000 upm; 4°C). Nach gründlichem Entfernen des Überstandes im letzten Waschschrte wurden die Histidin-gekoppelten Proteine durch Hinzufügen von 2x SDS-Protein-Ladepuffer von den *Talon beads* gelöst, aufgeköcht (95°C; 5 min) und der Überstand nach kurzer Zentrifugation (4000 upm; 1 min) auf ein Polyacrylamidgel (Kap. 2.2.3.4) aufgetragen.

2.2.3.4 Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli analysiert (Laemmli, 1970). Dabei richtete sich die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels nach dem Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins.

Für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde die entsprechende Acrylamid-Lösung (Trenngel-Lösung: 6-12% Acrylamid/Bisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,05% TEMED) zwischen zwei mit Abstandhaltern fixierte Glasplatten luftblasenfrei bis ca. 4 cm zum oberen Glasrand ausgegossen, mit Isopropanol überschichtet und bis zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Nach Entfernen des Isopropanols wurde das Sammelgel (Sammelgel-Lösung: 4% Acrylamid/Bisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED) gegossen und ein entsprechender Kamm eingesetzt. Zu den Proteinproben wurde 1x SDS-Protein-Ladepuffer (10 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 mM DTT; 0,4% SDS; 0,02% Bromphenolblau; 2% Glycerin) mit 1,5% β-Mercaptoethanol gegeben und nach Aufkochen (95°C; 5 min) in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels pipettiert. Als Laufpuffer für die SDS-Gelelektrophorese diente 1x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-base; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS; pH 8,7). Der

Sammelgellauf erfolgte bei konstanten 20 mA und die Länge des sich anschliessenden Trenngellaufes bei konstanten 30 mA richtete sich nach Grösse und Auftrennung des zu analysierenden Proteins.

2.2.3.5 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (*Western blot*)

Der Transfer der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulose-Membran *Optitran BA-S 83* erfolgte mittels einer *semi-dry Western blot*-Apparatur in der folgenden Weise: drei Lagen *Whatman 3 MM*-Papier, die Nitrozellulose-Membran, Trenngel und wiederum drei Lagen *Whatman 3 MM*-Papier wurden mit *Western blot*-Puffer (20 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20% Methanol) getränkt und luftblasenfrei aufeinandergelegt. Der elektrophoretische Transfer wurde bei RT und bei einer Spannung von 18 V sowie einer entsprechenden Stromstärke, die sich aus der Grösse des Gels ergab (pro cm² Gel: 2–3 mA), für etwa 1–2 Std. durchgeführt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran wurde durch eine Färbung mit *Ponceau-S*-Lösung überprüft. Um unspezifische Bindungstellen zu blockieren, wurde die Membran 30 min in Blockierungspuffer (5% (w/v) Milchpulver; 0,1% Tween 20 in PBS) inkubiert. Die Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers in Blockierungspuffer erfolgte für 1–2 Std. bei RT oder über Nacht bei 4°C in der entsprechenden Verdünnung (1:1000 anti-Myc; 1:500 anti-E-Cadherin; 1:500 anti-Aktin). Im Anschluss wurde die Membran mit Waschpuffer (0,1% Tween 20 in PBS) jeweils dreimal für 10 min gewaschen und mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist, ebenfalls in Blockierungspuffer für 1 Std. bei RT inkubiert (1:2500 anti-Kaninchen; 1:2500 anti-Ziege; 1:2000 anti-Maus). Zum Schluss wurde die Membran mit Waschpuffer erneut dreimal für 10 min gewaschen. Die Membran wurde auf der Proteinoberseite mit 2 ml einer frisch zubereiteten 1:1-Mischung der beiden ECL-Detektionslösungen für etwa 1 min bedeckt. Anschliessend wurde die Flüssigkeit abgetropft und die Membran, geschützt durch eine Frischhaltefolie, in eine Filmkassette gelegt. Die Exposition des Films richtete sich nach der jeweiligen Signalintensität.

2.2.3.6 Gelatine-Zymographie

Die Zymographie ist ein Verfahren, das die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mit einer Überprüfung der enzymatischen Aktivität kombiniert. Da BSSP von Zellen in das Kulturmedium sezerniert wird, wurde eine identische Anzahl von Zellen auf Gewebekulturschalen ausgesät und zur Analyse 48 Std. konditionierte Zellüberstände verwendet. Nach dem Abzentrifugieren toter Zellen (4000 upm; 5 min) wurde das rekombinante Protein über *Talon beads* aufgereinigt (Kap. 2.2.3.3) und mit nicht-reduzierendem 1x SDS-Protein-Ladepuffer (10 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 mM DTT; 0,4% SDS; 0,02% Bromphenolblau; 2% Glycerin) versetzt. Ohne Aufkochen wurde das aufgereinigte Protein in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel (Kap. 2.2.3.4), bei dem

das Trenngel 1 mg/ml Gelatine enthält, aufgetrennt. Um das SDS zu entfernen, wurde das Gel danach zweimal mit einer 2,5%-igen Triton X-100-Lösung für 30 min gewaschen, kurz in dH₂O gebadet und 16 Std. in Reaktionspuffer (0,1 M Glyzin-NaOH pH 8,3) bei 37°C in einem Wasserbad unter leichtem Schwenken inkubiert. Mittels Anfärbung des Gels durch Coomassieblau-Lösung (0,2% Coomassieblau; 10% Essigsäure; 20% Methanol) für 1 Std. wurde die verbliebene Gelatine dargestellt. Die ungefärbten Areale, die der Gelatinase-Aktivität der jeweiligen Proben entsprachen, wurden durch Behandlung mit Entfärbungslösung (10% Essigsäure; 20% Methanol) für etwa 15–30 min sichtbar gemacht. Das Gel wurde schliesslich auf *Whatman 3 MM*-Papier gelegt, mit einer Frischhaltefolie bedeckt und für 2 Std. auf einen Gelrockner gelegt.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Fixierung von Gewebe und Einbettung in Paraffin

Die gefrorenen Gewebe wurden über Nacht bei 4°C mit 4% Paraformaldehyd pH 7,2 fixiert und am nächsten Tag bei 4°C für 30 min mit PBS gewaschen. Danach wurden die Präparate 30 min in einer 0,85%igen NaCl-Lösung bei 4°C und anschliessend zweimal 15 min in 0,85% NaCl/Ethanol (1:1) bei RT inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 15 min und schliesslich 30 min in 70% Ethanol/PBS bei RT. Das Gewebe wurde weiterhin durch 85% und 95% Ethanol/PBS für jeweils 30 min entwässert und dann dreimal in 100% Ethanol für jeweils 1 Std. gegeben. Nach zweimaliger Inkubation in Xylol für 30 min und einer Inkubation in Xylol über Nacht wurde das Material für die Einbettung in ein Paraffin/Xylol (1:1)-Gemisch überführt und 1 Std. bei 56°C inkubiert. Schliesslich wurden die Präparate mit Hilfe des Einbettungsgerätes *Tissue Tek TES* in ein Bad mit flüssigem Paraffin gegeben. Aus dem Bad entnommen wurden die Präparate in Plastik-Kassetten mit Paraffin eingegossen und bei 4°C gelagert.

2.2.4.2 Anfertigung von Paraffingewebeschnitten

Mit Hilfe des Weichschnittmikrotoms RM 2155 wurden von den Paraffinblöcken (Kap. 2.2.4.1) 6 µm Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Diese wurden danach zum Aushärten der Schnitte über Nacht bei 42°C inkubiert.

2.2.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur histologischen Begutachtung der Gewebeschnitte wurden die Präparate mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt, wobei das Hämatoxylin die basophilen Zellkerne blau und das Eosin die eosinophilen Strukturen des Zytoplasmas, der Kollagene oder der Muskeln rot färbt.

Die Präparate wurden zunächst durch zweimalige Inkubation in 10 min Xylol deparaffinisiert und dann durch eine absteigende Ethanolreihe in jeweils 100%, 95%, 90%,

80%, 70%, 50% und 30% Ethanol für 2 min hydratisiert. Nach dem Anfärben für 5 min in 0.1% Mayer's Hämatoxylinlösung wurden die Schnitte 1 min in Leitungswasser gewaschen und 20 sek in 0,5% HCl/70% Ethanol überführt. Es folgte das Wässern der Präparate für 10 min unter fließendem Leitungswasser. Dann wurden die Gewebeschnitte in 0,5%-iger Eosinlösung gefärbt und in einer aufsteigenden Ethanolreihe durch kurzes Eintauchen in 70%, 95% und 100% Ethanol dehydratisiert. Nach zweimaliger Inkubation für 5 min in Xylol wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

2.2.4.4 *In situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten (ISH)

Die *in situ*-Hybridisierung auf Schnitten in Paraffin eingebetteter Gewebe erfolgte nach Wilkinson und Green (Wilkinson and Green, 2004).

***In vitro*-Transkription der Ribonukleotid-Sonde**

Die *in vitro*-Transkription wurde zur Herstellung von *antisense*- und *sense*-RNA-Sequenzen von einem Transkriptionsvektor mit den entsprechenden Promotorbindungsstellen für Phagen-RNA-Polymerasen durchgeführt, wobei als Kontrolle für unspezifisches Hintergrundsignal stets das *sense*-Transkript eingesetzt wurde. Zuerst wurde das Transkriptionsplasmid mit Restriktionsendonukleasen linearisiert (Kap. 2.2.1.4) und die DNA mit dem *QIAquick* PCR Aufreinigungs-Kit nach den Empfehlungen des Herstellers aufgereinigt. Zur radioaktiven Markierung des DNA-Transkriptes wurde [α - 35 S]-UTP verwendet und in dem folgenden Ansatz eingesetzt: 1 μ g/ μ l DNA in 1x TSC-Puffer (40 mM Tris pH 8, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 10 mM NaCl, 4 mM Spermidin, 50 μ g/ml BSA), 20 mM DTT, 2 U RNasin, 625 μ M rNTPs (ohne UTP), 50 μ Ci [α - 35 S]-UTP, 30 U Phagenpolymerase (T3, T7 oder Sp6). Nach einer Inkubation von 1–2 Std. bei 37°C wurden 3 U RQ1-DNase und 30 μ g tRNA zugegeben und weitere 15 min bei 37°C inkubiert, um die Plasmid-DNA zu entfernen. Danach folgte die Aufreinigung der RNA-Sonde nach den Anweisungen der Herstellerfirma über die Sephadex-G50-Säule (Kap. 2.2.1.15). 3 μ l des Säuleneluates wurden im Szintillationszähler vermessen, das verbleibende Restvolumen mit 2M NH₄OAc und 2,5 Volumen 100% Ethanol versetzt und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

Vorbereitung und Prähybridisierung der Gewebeschnitte

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden zunächst zweimal durch 10 min Inkubation in Xylol deparaffinisiert und anschliessend durch eine Ethanolreihe mit jeweils 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% und 30% Ethanol für 2 min rehydratisiert. In der sich nachfolgenden Prähybridisierung wurden die Gewebeschnitte für 5 min in 0,86% NaCl eingetaucht, danach 5 min mit PBS gewaschen und 20 min mit 4% PFA/PBS (pH 7,2) fixiert. Darauf folgten zwei Waschschrte mit PBS für jeweils 5 min. Nach einer Proteinase K-Behandlung (10 mg/ml in PBS) für 20 min wurden die Präparate zweimal

gewaschen, 5 min mit 4% PFA/PBS (pH 7,2) nachfixiert und wiederum 5 min in PBS eingetaucht. Um positive Ladungen zu neutralisieren und damit unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde eine Inkubation in Triethanolamin/Essigsäureanhydrid-Lösung (3,125 ml/650 µl in 250 ml dH₂O) für 10 min durchgeführt. Nachdem die Gewebeschnitte 5 min in PBS gewaschen sowie danach 5 min in 0,86% NaCl inkubiert worden waren, erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit jeweils 30%, 50%, 70%, 80%, 90% 95% und 100% Ethanol für 2 min und schliesslich das Trocknen bei RT.

Hybridisierung der Gewebeschnitte

Die in Ethanol gelagerte radioaktiv markierte Sonde wurde zentrifugiert (13000 upm; 10 min), das erhaltene Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert (13000 upm; 10 min). Das getrocknete Präzipitat wurde in 100 mM DTT aufgenommen, so dass die spezifische Aktivität $1,5 \times 10^6$ cpm/µl betrug. Die Hybridisierungslösung bestand aus den folgenden Reagenzien: 1x Hybridisierungssalz (0,02% Polyvinylpyrrolidon; 0,02% Ficoll; 0,038% NaH₂PO₄ pH 6,8; 5 mM EDTA, 300 mM NaCl; 10 mM Tris pH 8), 50% Formamid, 10% Dextransulfat, 50 ng/µl tRNA, 10 mM DTT. Die RNA-Sonde wurde mit der Hybridisierungslösung auf das zehnfache Volumen aufgefüllt, was einer spezifischen Aktivität von $1,5 \times 10^5$ cpm/µl in dem Gesamtansatz entsprach. Die prähybridisierten Gewebeschnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und die radioaktive Hybridisierungslösung nach einem Denaturierungsschritt (5 min; 80°C) vorsichtig aufgetragen. Um ein Austrocknen zu vermeiden, wurde die Lösung mit einem Stück Parafilm bedeckt und eine Plastikkammer vorbereitet, bei der der Boden mit 2x SSC und 50% Formamid getränktem *Whatman 3 MM*-Papier ausgelegt wurde. In dieser feuchten Kammer wurden die Gewebeschnitte über Nacht bei 55°C in einem Wärmeschrank inkubiert.

Waschen der Gewebeschnitte

Im Anschluss an die Hybridisierung erfolgte das Waschen unter stringenten und ³⁵S-stabilisierenden Bedingungen. Dazu wurden die Präparate dreimal mit 2x SSC, 50% Formamid und 20 mM β-Mercaptoethanol gewaschen: einmal für 15 min bei 37°C, dann für 30 min unter Erwärmen von 37°C auf 65°C und schliesslich unter leichtem Schütteln für 2–3 Std. bei 65°C. Nach Inkubation in NTE für 15 min bei 37°C wurden die Gewebeschnitte mit 20 µg/ml RNase A in NTE behandelt und im Anschluss für 15 min bei 37°C in NTE gewaschen. Die Präparate wurden nun in 2x SSC, 50% Formamid und 20 mM β-Mercaptoethanol für 30 min inkubiert und dann mit 2x SSC und dann mit 0,1x SSC für 15 min bei RT gewaschen. Zur Dehydratisierung folgte eine aufsteigende Ethanolreihe mit jeweils 30%, 50%, 70%, 80%, 90% 95% und 100% Ethanol für 2 min.

Zum Schluss wurden die Präparate getrocknet und die Signalintensität durch Exposition eines Röntgenfilmes ermittelt.

Entwickeln und Färben der Gewebeschnitte

Zur Detektion des radioaktiven Signals auf den Gewebeschnitten wurden die Objektträger unter Lichtausschluss mit einer Photoemulsion beschichtet. Dazu wurde die Photoemulsion in einem Wasserbad bei 42°C geschmolzen und im 1:1-Verhältnis mit 0,6 M NH₄OAc verdünnt. Die Gewebeschnitte wurden in die verdünnte Photoemulsion eingetaucht, getrocknet und abhängig von der beobachteten Signalstärke für 7–14 Tage bei 4°C in einem autoradiographischen Verfahren entwickelt. Unter Lichtausschluss wurden dazu die Präparate 3 min in Entwicklerlösung (1:5 in Leitungswasser verdünnt), danach 4 min in Fixierungslösung (1:1 in Leitungswasser verdünnt) inkubiert und schliesslich zweimal für 5 min in Leitungswasser gewaschen. Die Schnitte wurden daraufhin mit 0.1% Hämatoxylin/1% Eosin gegengefärbt (Kap. 2.2.4.3) und mit Entellan eingedeckt.

2.2.4.5 Immunhistochemie (IHC)

Die immunhistochemischen Färbungen wurden auf Paraffinschnitten eingebetteter Tumore durchgeführt.

Zunächst wurden die Gewebeschnitte zweimal in Xylol inkubiert und dann durch eine absteigende Ethanolreihe mit jeweils 100%, 95%, 90%, 80% und 70% Ethanol für je 2 min rehydratisiert. Nach dem Waschen der Präparate für 5 min in PBS wurden die Schnitte für 1 Std. bei 65°C inkubiert und wiederum 5 min mit PBS bei RT gewaschen. Die Objekte auf den Schnitten wurden mit einem Fettstift umrandet und für 10–12 min mit 0,1% Trypsin/PBS behandelt, das anschliessend wieder durch Inkubation für 5 min mit 0,1 µg/ml Trypsin-Inhibitor/PBS inaktiviert wurde. Auf die Trypsin-Behandlung, die der Freilegung des Epitops dient, wurde bei einer Immunfärbung mit dem Antikörper anti-hK6 aufgrund der Anwendungsempfehlung des Herstellers verzichtet. Zur Blockierung endogener Peroxidaseaktivität wurden die Gewebeschnitte 10 min mit frisch hergestelltem 3% H₂O₂/Methanol bedeckt und im Anschluss daran zweimal mit PBS für jeweils 2 min gewaschen. Für die folgenden Schritte wurden die Komponenten des *Vectastain ABC Kits* verwendet. Um unspezifische Bindungskapazitäten abzusättigen, wurden die Präparate mit Blockierungslösung, die sich aus dem Normalserum des 2. Antikörpers verdünnt in 1% BSA/PBS zusammensetzt, für 30 min inkubiert. Der Primärantikörper wurde für 2 Std. bei RT in der Blockierungslösung in der entsprechenden Konzentration (1:100 anti-hK6; 1:200 anti-MSP) eingesetzt, wobei in einem Kontrollansatz kein Primärantikörper zu der Blockierungslösung gegeben wurde. Es folgten drei Waschschrte für 3 min in PBS. Der entsprechende biotinylierte Sekundärantikörper wurde in einer 1:200 Verdünnung in der Blockierungslösung für 30 min bei RT auf den Präparaten inkubiert. Zur Verstärkung des

Signals wurden die Präparate für 30 min mit ABC-Reagenz (5 ml Blocklösung; 2 Tropfen Reagenz A; 2 Tropfen Reagenz B), welche 30 min vor dem Auftragen vorbereitet werden musste, inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte dreimal für jeweils 3 min in PBS gewaschen. Für die Substratreaktion wurden die Präparate mit DAB (Diaminobenzidin)-Lösung (DAB Substrat *Kit*: 5 ml dH₂O; 2 Tropfen Pufferkonzentratlösung; 4 Tropfen DAB-Konzentratlösung; 2 Tropfen H₂O₂-Lösung) lichtgeschützt angefärbt. Die Färbereaktion wurde durch Überführen der Schnitte in dH₂O abgebrochen. Im Anschluss an die DAB-Färbung erfolgte eine Gegenfärbung mit 0.1% Hämatoxylin wie in Kap. 2.2.4.3 beschrieben, jedoch ohne Inkubation in Eosin-Lösung.

2.2.4.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenz auf kultivierten Zellen

Die zu analysierenden Zellen wurden auf Deckgläschen in Zellkulturschalen kultiviert, zweimal mit PBS gespült und dann mit 4% PFA/PBS für 15 min fixiert. Anschliessend wurden die Zellen dreimal kurz mit PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen sowie zur Membranperforierung erfolgte eine Inkubation für 30 min in der Blockierungslösung (1% BSA/0,5% Triton-X-100 in PBS). Nach einem kurzen Waschschrift in 0,2% Tween 20/PBS wurde der Primärantikörper in der Blockierungslösung entsprechend verdünnt (1:100 anti-E-Cadherin) und für 2 Std. bei RT auf den Zellen inkubiert. Im Anschluss daran wurde dreimal mit PBS für 3 min gewaschen. Der Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper wurde ebenfalls in der entsprechenden Verdünnung in Blockierungslösung (1:200 anti-Kaninchen, Cy3) vorbereitet und zusammen mit 1 µg/ml Bisbenzimid H33342 Fluorochrom zur Gegenfärbung der Zellkerne auf die Zellen pipettiert. Nach 30 min Inkubation wurde dreimal mit PBS für 3 min gewaschen und die Deckgläschen auf Objektträgern mit Mowiol eingedeckt.

Immunfluoreszenz auf Gewebeschnitten

Die Kryoschnitte wurden aufgetaut und anschliessend mit eiskaltem MeOH/Aceton 1:1 für 3–5 min fixiert. Danach wurden die Präparate getrocknet, mit einem Fettstift umrandet und für 5 min mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Gefrierschnitte für 1 Std. in 1% BSA/PBS inkubiert und danach wiederum dreimal mit PBS gewaschen. Der Primärantikörper wurde in 1% BSA/PBS in der entsprechenden Verdünnung (1:200 anti-MSP) eingesetzt und für 3 Std. auf den Schnitten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper in der gewünschten Verdünnung (1:200 anti-Kaninchen, Cy3) sowie 1 µg/ml Bisbenzimid H33342 Fluorochrom in 1% BSA/PBS für 1 Std. auf die Präparate gegeben. Es folgte erneut dreimaliges Waschen mit PBS und ein kurzes Bad in dH₂O. Die Gefrierschnitte wurden schliesslich in Mowiol eingedeckt.

2.2.4.7 Phalloidin-Färbung

Phalloidin, ein Toxin des weissen Knollenblätterpilzes, bindet Aktinfilamente und kann deshalb dazu verwendet werden, das Zytoskelett kultivierter Zellen darzustellen, wenn es konjugiert mit einem Fluoreszenzfarbstoff vorliegt.

Die Phalloidin-Färbung wurde parallel zu der indirekten Immunfluoreszenz auf kultivierten Zellen eingesetzt. Dazu wurde wie unter 2.2.4.6 beschrieben vorgegangen und zu der Blockierungslösung mit Sekundärantikörper und Bisbenzimid H33342 das Phalloidin Alexa Fluor[®]488 in einer Verdünnung von 1:40 zugegeben.

2.2.5 Zellkulturmethoden

2.2.5.1 Kulturbedingungen

Sämtliche Arbeitsgänge wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt.

MCA3D und MCA3D/AT3

Die Keratinozytenlinie MCA3D wurde aus DMBA behandelte neonatale Haut von Balb/c-Mäusen isoliert und auf die Resistenz gegenüber Kalzium-induzierter Differenzierung selektioniert (Kulesz-Martin et al., 1983). Aus dieser Keratinozytenlinie ging durch Transfektion und stabile Integration des aktivierten Ras-Gens die Zelllinie MCA3D/AT3 hervor (Quintanilla et al., 1991). Die beiden Keratinozytenlinien sind durch unterschiedliche Tumorigenität nach der Injektion in Nacktmäusen gekennzeichnet. Während bei der Zelllinie MCA3D keine Tumore nach subkutaner Injektion entstehen (Kulesz-Martin et al., 1983), kommt es bei der Zelllinie MCA3D/AT3 zu Ausbildung maligner Tumore (Kulesz-Martin et al., 1983) (Kap. 2.1.13, Tab. 4). Die beiden Keratinozytenlinien wurden routinemässig in α -MEM mit 10% FCS und 2 mM L-Glutamin auf Plastikschalen kultiviert und in einem Brutschrank bei 34°C und 5% CO₂ inkubiert.

Reb, SP1, 308, CarB, PMK-R3, PECA, PDV

Die Kultivierung der murinen Keratinozyten Reb, SP1, 308, CarB, PMK-R3, PECA und PDV, die sich in ihrer Tumorigenität nach Injektion in Nacktmäusen unterscheiden (vgl. Kap. 2.1.13, Tab. 4), erfolgte in 4xMEM mit 10% FCS, 1x Hanks' Salzlösung, 1x MEM-Vitaminen, 1x nicht-essentielle Aminosäuren, 1x MEM-Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin und 7,5% Natriumbicarbonat. Der pH-Wert des Mediums wurde anschliessend auf pH 7 eingestellt. Die Inkubation der Keratinozyten fand in einem Brutschrank bei 34°C und 5% CO₂ statt.

hTERT

Die Keratinozytenlinie hTERT ging aus normalen humanen Keratinozyten hervor, die durch die Transfektion von TERT, der Proteinuntereinheit der Telomerase, immortalisiert wurden (Dickson et al., 2000; Rheinwald et al., 2002). Die Kultivierung von Zellen bei geringer Dichte wurde in serumfreiem Keratinozytenmedium Ker-SFM, dem 25 µg/µl BPE, 0,2 ng/ml EGF und 0,3 mM CaCl₂ zugefügt wurde, durchgeführt. Um die Zellen in einer höheren Dichte in Kultur zu halten, z.B. zur Isolierung von RNA, wurden sie in Gegenwart einer 1:1-Mischung des serumfreien Keratinozytenmediums Ker-SFM und des DF-K-Mediums bestehend aus 50% DMEM ohne Ca²⁺, 25% HAM's F12, 25 µg/µl BPE, 0,2 ng/ml EGF und 1,5 mM L-Glutamin kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

HT-1080

Die Zelllinie HT-1080 wurde 1972 aus der Biopsie eines Fibrosarkom-Patienten etabliert (Rasheed et al., 1974). Die Zelllinie wurde routinemässig in DMEM mit 10% FCS auf Plastikschalen kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

SCL-I und SCL-II

Die beiden Zelllinien SCL-1 und SCL-II gehen aus Plattenepithelkarzinomen zweier Patienten hervor (Boukamp et al., 1982; Tilgen et al., 1983). Die Kultivierung erfolgte routinemässig in Gegenwart von DMEM mit 10% FCS auf Plastikschalen in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.5.2 Passagieren von Zellen

Erreichten die Zellen eine Konfluenz von etwa 80%, wurden sie passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 1 ml 0,25% Trypsin/EDTA überschichtet und bis zum beginnenden Ablösen bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von Medium mit 10% FCS wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (1000 upm; 3 min) sedimentiert und nach Absaugen des Überstands in einem entsprechenden Volumen an Medium resuspendiert und die Zellzahl mit dem Zellzählgerät *Coulter Counter* in einer Verdünnung von 1:200 bestimmt. Danach wurden die Zellen in der gewünschten Zellzahl ausgesät.

2.2.5.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden durch Trypsinieren geerntet und gezählt. Anschliessend wurde die Zellsuspension in ein *Falcon*-Röhrchen überführt und für 3 min bei 1000 upm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment mit ca. 1x10⁶ Zellen in 1 ml Einfriermedium (Medium; 10% FCS; 10% DMSO) resuspendiert und in ein

Kryoröhrchen transferiert. Die Zellen wurden anschliessend für 1,5 Std. auf Eis inkubiert und dann bei -80°C gelagert. Die langfristige Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Einfrierröhrchen zügig auf 37°C erwärmt bis die Flüssigkeit mit einem restlichen Eiskern in ein *Falcon*-Röhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Vollmedium überführt werden konnte. Nach Zentrifugation (1000 upm; 3 min) wurden die Zellen in Vollmedium aufgenommen und in eine Kulturschale transferiert.

2.2.5.4 Mykoplasmen-Test

Um eine Kontamination der verwendeten Zelllinien mit Mykoplasmen auszuschliessen, wurden in regelmässigen Abständen Kontrollen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen alle zwei Monate durch eine Färbung mit Bisbenzimid H33342 Fluorochrom überprüft. Nachdem sich die Zellen mindestens eine Woche in Abwesenheit von Antibiotika in Kultur befanden, wurden sie auf Deckgläschen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10 min in Methanol/Eisessig 3:1 fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte das Anfärben mit $1\ \mu\text{g/ml}$ Bisbenzimid H33342 Fluorochrom (1:1000 in PBS verdünnt) für 15 min bei RT. Zum Schluss wurden die Zellen dreimal in PBS überführt und mit Mowiol eingedeckt. Mykoplasmen-freie Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop durch einen klar abgegrenzten Kern ohne Punktmuster, das im Falle einer Kontamination auftritt und die DNA der Bakterien widerspiegelt, identifiziert. Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden ausschliesslich Kulturen ohne Mykoplasmen eingesetzt.

2.2.5.5 Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion der murinen Keratinozytenlinien MCA3D und der Fibrosarkom-Zelllinie HT-1080 mittels Elektroporation erfolgte in dieser Arbeit zur stabilen Integration von DNA in das Genom, da starke elektrische Felder die Membran kurzfristig permeabilisieren können.

Zur Elektroporation wurden die Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen und abzentrifugiert (900 upm; 3 min). Nach dem Waschen der Zellen mit PBS und erneuter Zentrifugation wurde die Zellkonzentration im Zellzählgerät bestimmt. Die Zellzahl wurde auf 1×10^7 MCA3D- bzw. 1×10^6 HT-1080-Zellen pro ml PBS eingestellt. Anschliessend wurden $700\ \mu\text{l}$ der Zellsuspension zu $10\ \mu\text{g}$ DNA, die in $100\ \mu\text{l}$ PBS gelöst vorlag, gegeben und die Mischung 10 min bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Elektroporation in 4 mm-Elektroporationsküvetten im Elektroporationsgerät *Gene Pulser* unter zelltyp-spezifischen Bedingungen: 400 V; $500\ \mu\text{F}$ bei MCA3D-Zellen bzw. 250 V; $960\ \mu\text{F}$ bei HT-1080-Zellen. Nach einer Inkubation bei RT für 5 min wurden die elektroporierten

Zellen mit Kulturmedium versetzt und auf Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Stabile transgene Linien wurde durch Zugabe von 500 µg/ml G418 in das Kulturmedium im Falle der MCA3D-Zellen und 800 µg/ml G418 im Falle der HT-1080-Zellen etabliert. Nach etwa 10 bis 14 Tagen wurden einzelne Zellklone mit Hilfe von sterilen Filter-Pipettenspitzen isoliert.

2.2.5.6 Erstellen von Wachstumskurven

Für die Erstellung einer Wachstumskurve wurde eine definierte Anzahl von Keratinozyten auf *24-well*-Kulturschalen ausplattiert. Alle zwei Tage wurde die Zellzahl mit Hilfe des Zellzählgerätes bestimmt und frisches Vollmedium zu den Zellen gegeben. Die Beobachtungen erfolgten über einen Zeitraum von 10 Tagen.

2.2.5.7 *In vitro*-Migrationsstudien

Um das Migrationsverhalten von Zellen zu analysieren, wurden *in vitro*-Migrationsstudien durchgeführt.

Die zu untersuchenden Zelllinien wurden auf *6-well*-Kulturschalen ausgesät, so dass nach Adhäsion am darauffolgenden Tag ein konfluenter Zellrasen vorlag. Um die weitere Proliferation der Zellen zu unterbinden, wurde dem Zellkultur-Medium Mitomycin C (20 ng/ml) zugesetzt und die Zellen für 4 Std. bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer gelben Pipettenspitze, eine Lücke quer durch den konfluenten Zellrasen jeder Kulturschale gekratzt. Die abgelösten Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und frisches Vollmedium zu den Zellen gegeben. Die Defekte wurden am Phasenkontrastmikroskop photographisch festgehalten und bis zum Verschliessen der Lücke alle 24 Std. an drei verschiedenen Stellen pro Zelltyp dokumentiert. Zur Auswertung des Versuches wurde der normalisierte Abstand der beiden Zellfronten an den Rändern des Spaltes zu den verschiedenen Zeitpunkten vermessen.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung Tumor-assoziiierter Gene in der Hautkarzinogenese

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung neuer Tumor-assoziiierter Gene mit differentieller Expression im Verlauf der epithelialen Tumorentstehung. Dazu wurde mRNA von TPA-behandelter Rückenhaul sowie von Papillomen und PEK (Plattenepithelkarzinomen) aus der chemisch induzierten Karzinogenese der Maushaut zusammen mit mRNA der entsprechenden Kontrollen präpariert und die fluoreszenzmarkierte cDNA auf zwei unabhängigen cDNA-*Microarrays*, dem 20 k *LION ArrayTAG™* (Lion Biosciences, Heidelberg) und dem 15 k *NIA-Microarray* (National Institute of Ageing, Bethesda, USA), hybridisiert (Abb. 3). Die cDNA-Klone, die sich auf den *Microarrays* befinden, sind in Tabelle 2 (*NIA*) bzw. Tabelle 3 (*ArrayTAG*) unter <http://www.dkfz.de/molgen/div/hummerich/> aufgeführt. Informationen über die einzelnen Klone können in der Datenbank der Abteilung „Molekulare Genetik“, DKFZ, unter http://www.dkfz-heidelberg.de/kompl_genome/-index.html abgerufen werden.

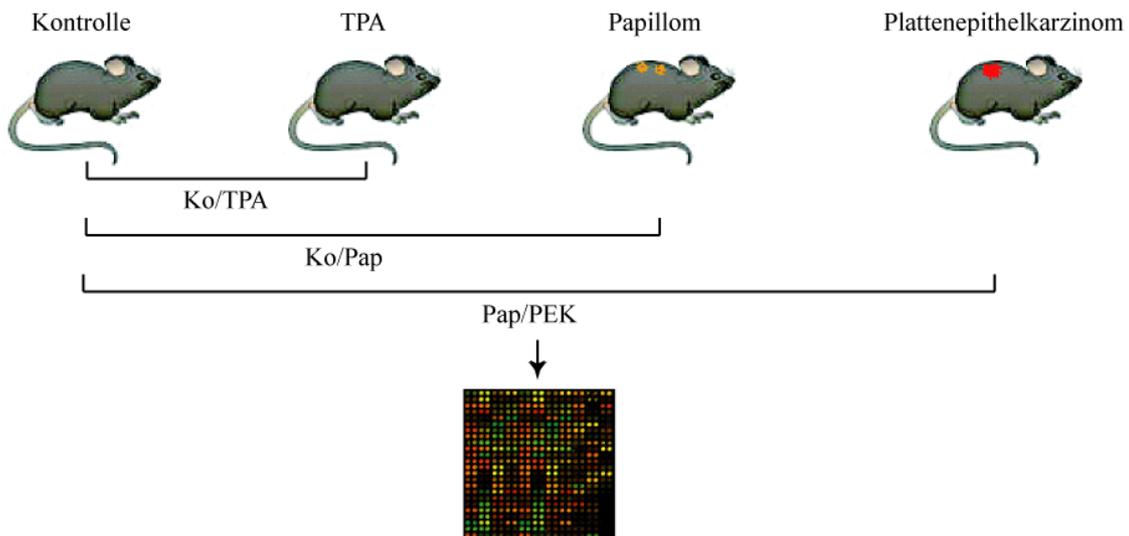


Abb. 3: Durchführung einer *Microarray*-Analyse zur Untersuchung einzelner Stadien der Hautkarzinogenese.

Für die *Microarray*-Analyse wurde RNA aus Mäusen isoliert, die die einzelnen Stadien der chemisch induzierten Hautkarzinogenese, d.h. 6 Std. TPA-behandelte Rückenhaul (TPA), Papillome (Pap) und Plattenepithelkarzinome (PEK), repräsentiert. Nach der cDNA-Synthese wurde die fluoreszenzmarkierte cDNA gegenüber den entsprechenden Kontrollen (Ko) von normaler Rückenhaul, die von Mäusen identischen Geschlechts und gleichen Alters stammt, auf zwei unabhängige cDNA-*Microarrays* (20 k *LION ArrayTAG™*, 15 k *NIA-Microarray*) hybridisiert.

Durch die Untersuchung von RNA aus mindestens drei unterschiedlichen Tieren kamen individuen-spezifische Variationen in der Genexpression nicht zum Tragen. Um Unterschiede im Einbau der Fluoreszenzfarbstoffe zu berücksichtigen, wurden von allen Ansätzen *color switch*-Experimente durchgeführt, bei denen die Fluorochrome für die Markierung der Kontrollen und der zu analysierenden Proben unterschiedlicher Tumorstadien umgekehrt eingesetzt wurden. Desweiteren wurden die Hybridisierungen aller Ansätze in einem Replika-Experiment wiederholt.

Ein Vergleich der Expressionsdaten für Gene, die auf beiden Arrays enthalten waren, ergab eine sehr hohe Korrelation der Messwerte, was die Qualität der durchgeführten Analyse unterstreicht (Hummerich et al., 2004b; Manuskript eingereicht). Nach Integration aller erhaltenen Ergebnisse wurden ausschliesslich diejenigen Gene für weitere Arbeiten berücksichtigt, für die die Messwerte in einem signifikanten Bereich von einer 2,8-fachen linearen Veränderung der Genexpression lagen und die durch ein unabhängiges Experiment bestätigt werden konnten. Insgesamt konnte die Expression von 6545 verschiedenen Genen ausgewertet werden, von denen 1500 auf beiden *Arrays* vorhanden waren. Von diesen 6545 Genen wiesen ca. 1000 Gene ein differentielles Expressionsprofil in mindestens einem der drei analysierten Stadien auf. Die Tabellen 7 (Tab. 7) und 8 (Tab. 8) im Anhang A.1 der vorliegenden Arbeit zeigen die 25 am stärksten induzierten bzw. reprimierten Gene in PEK der Maushaut. Die Expressionsdaten aller analysierten Gene in den verschiedenen Tumorstadien sind in Tabelle 4 (*NIA*) bzw. in Tabelle 5 (*LION ArrayTAG™*) unter <http://www.dkfz.de/molgen/div/hummerich/> einsehbar.

Die durchgeführte *Microarray*-Analyse bestätigte die differentielle Expression einiger bekannter Gene, die bereits in früheren Untersuchungen im Rahmen von SSH (*suppression subtractive hybridisation*) und *Microarray*-Studien mit TPA-behandelter Rücken-haut von Mäusen durchgeführt worden waren (Schlingemann et al., 2003). Diese Untersuchungen führten bereits zur Identifizierung von Genen wie z.B. *bssp*, *s100a8* und *s100a9*, für die eine funktionelle Beteiligung an der Hautkarzinogenese postuliert wird (Breitenbach et al., 2001; Gebhardt et al., 2002). In Übereinstimmung mit dem Ziel, unbekannte Tumor-assoziierte Gene zu finden, enthielt die Liste der differentiell exprimierten Gene auch eine Vielzahl unbekannter Gene wie EST- (*expressed sequence tag*) und Riken-Klone, die bislang noch nicht mit der Tumorentstehung im Allgemeinen oder mit der Haut-tumorgenese im Speziellen in Zusammenhang gebracht worden waren.

Auf der Basis der globalen Expressionsanalyse wurden 42 Gene ausgesucht und mittels RT-PCR deren differentielle Expression in murinen Geweben, d.h. in TPA-behandelter Haut, Papillomen und PEK, überprüft. Die Abbildung 4 A (Abb. 4 A) zeigt die Validierung einiger Gene (*lcn2*, *crabp2*, *fosl1*, *anxa1*, *rik2210418J09*, *rik1200016C12*, *adam8*,

rik4930579A11, *nupr1*, *tnfrsf12a*, *rik56303400A09*, *jup*, *h19*, *gsn*, *ndr2*, *fh11*), die entweder auf einem oder auf beiden *Microarrays* zu finden waren. *β-tubulin*, das als Standard für die Qualität und die Quantität der eingesetzten cDNA verwendet wurde, ergab ein vergleichbares Expressionsprofil in allen untersuchten Proben. Eine Übereinstimmung der Ergebnisse aus der *Microarray*-Analyse mit den Resultaten der RT-PCR konnte in 76% der Fälle für mindestens zwei der drei experimentell untersuchten Bedingungen festgestellt werden. Ausserdem wurde die differentielle Expression ausgewählter Gene durch quantitative RQ-PCR bestätigt (L. Hummerich, persönliche Mitteilung).

Eines der mittels RT-PCR verifizierten Gene, *rik1200016C12*, stellt das murine Ortholog zu *KLK9* (Kallikrein 9) dar. Interessanterweise stimmt dessen Expressionsprofil mit der in der SSH-Analyse identifizierten Serinprotease *bssp* überein (Abb. 4 B). Als deren potentiell humanes Ortholog gilt *KLK6* (Kallikrein 6), ein weiteres Mitglied der Kallikrein-Genfamilie.

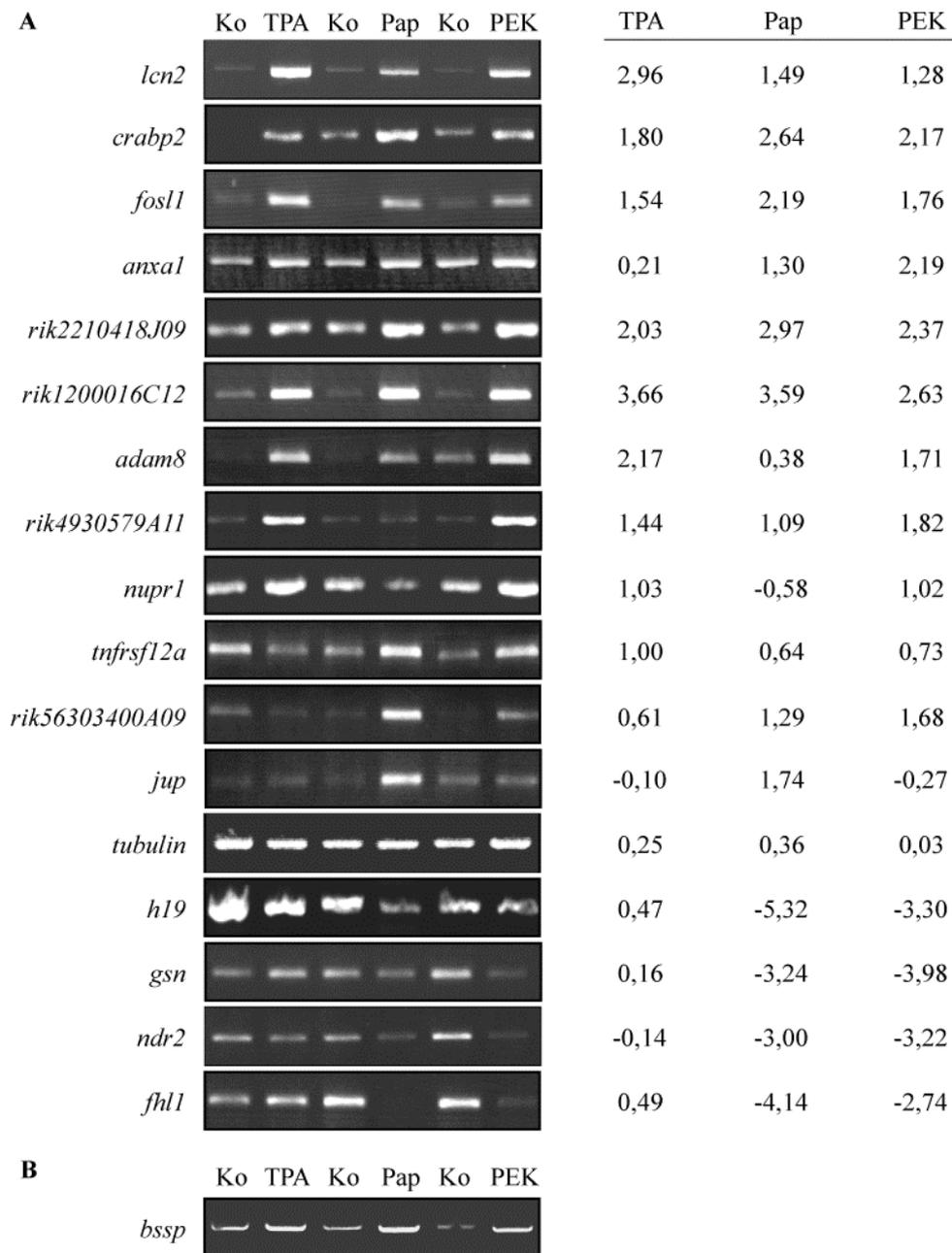


Abb. 4: Verifizierung der Ergebnisse aus der *Microarray*-Analyse durch semi-quantitative RT-PCR.

RNA aus muriner Rückenhaul, die 6 Std. mit TPA behandelt worden war (TPA), aus Papillomen (Pap) und Plattenepithelkarzinomen (PEK) wurde im Anschluss an die cDNA-Synthese für RT-PCR-Analysen eingesetzt. Als Kontrolle (Ko) diente jeweils normale Haut von Mäusen gleichen Geschlechts und gleichen Alters.

(A): In der Abbildung ist die Expression einiger ausgewählter Gene dargestellt, die konstitutiv in allen (*lcn2*, *crabp2*, *fosl1*, *anxa1*, *rik2210418J09*, *rik1200016C12*, *adam8*) bzw. in einzelnen untersuchten Tumorstadien (*rik4930579A11*, *nupr1*, *tnfrsf12a*, *rik56303400A09*, *jup*) hochreguliert oder in fortgeschrittenen Tumorstadien herunterreguliert sind (*h19*, *gsn*, *ndr2*, *fhl1*). Die Qualität und die Quantität der cDNA wurden durch Amplifikation eines β -*tubulin*-Fragmentes überprüft. Neben den jeweiligen RT-PCR-Abbildungen der einzelnen Gene sind die *Microarray*-Expressionsdaten für die Tumorstadien (TPA, Pap, PEK) aufgeführt. Falls Gene mehrfach auf einem *Microarray* bzw. auf beiden *Microarrays* vorhanden waren, wurde der Mittelwert berechnet.

(B): Die Mehrzahl der validierten Gene mit verstärkter Expression in den einzelnen Tumorstadien verhielt sich wie die Serinprotease *bssp*, die zuvor durch SSH (*suppression subtractive hybridisation*) als induziertes Gen in der murinen Hautkarzinogenese identifiziert worden war.

Um die zelluläre Lokalisation hochregulierter Gene in Tumoren der Mauhaut zu bestimmen, wurde die mRNA-Expression von einzelnen ausgesuchten Genen durch *in situ*-Hybridisierungen auf murinen Gewebeschnitten untersucht. Die Gene *anxa1*, *lcn2*, *tnfrsf12a* sowie die unbekanntenen Klone *rik4930579A11* und *rik2210418J09* wiesen eine erhöhte Expression in den Keratinozyten von Papillomen und PEK auf (Abb. 5). Dagegen war die Expression im Tumorstroma und in der dem Tumor benachbarten Haut kaum bzw. nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt). In vorhergehenden Analysen wurde für eine Vielzahl weiterer Gene (*slpi*, *junB*, *ralgds*, *s100a8*, *s100a9* und *bssp*) ein vergleichbares Expressionsmuster bereits durch *in situ*-Hybridisierungen gezeigt (Breitenbach et al., 2001; Gebhardt et al., 2002; Schlingemann et al., 2003).

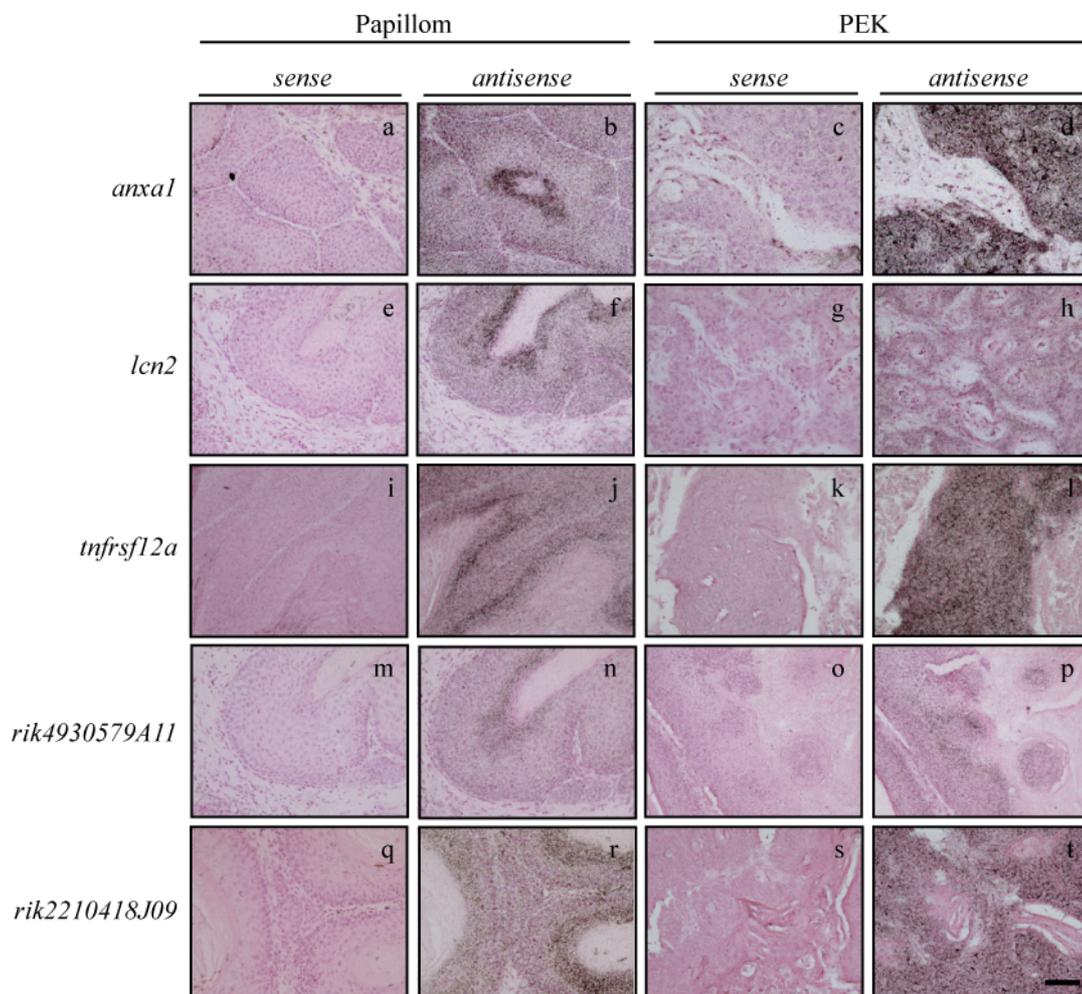


Abb. 5: Erhöhte Expression von *anxa1*, *lcn2*, *tnfrsf12a*, *rik4930579A11* und *rik2210418J09* in den Keratinozyten muriner Hauttumoren.

Für die Analyse der Expression in Papillomen und Plattenepithelkarzinomen wurden Paraffinschnitte von chemisch induzierten Tumoren weiblicher NMRI-Mäuse verwendet und mit ^{35}S -markierten *Antisense*-Ribonukleotidsonden spezifischer cDNA-Fragmente von *anxa1* (a-d), *lcn2* (e-h), *tnfrsf12a* (i-l), *rik4930579A11* (m-p) und *rik2210418J09* (q-t) hybridisiert. Als Kontrolle für die Spezifität diente die *Sense*-Ribonukleotidsonde. Nach der Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eosin wurden alle Präparate im Hellfeld photographiert. Positives Signal ist als schwarzes Punktmuster im Hellfeld zu erkennen.

(Skalierung: 50 μm).

Um einen Eindruck zu bekommen, inwieweit die identifizierten Gene für die Tumorentstehung *in vivo* relevant sind, wurden cDNAs von Keratinozytenzelllinien analysiert, die nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse nicht-tumorigene oder tumorigene Eigenschaften besitzen (vgl. Tab. 4; Kap. 2.1.13). RT-PCR-Analysen ergaben, dass für einzelne Gene (*lcn2*, *nr6a1*, *anxa1*, *junB*, *fosl1*, *adam8*, *rik1200016C12*, *rik5630400A09*, *rik4930579A11*) eine Korrelation zwischen der Expression und der Tumorigenität besteht (Abb. 6). Aufgrund dessen liegt eine direkte oder indirekte Beteiligung dieser Kandidatengene an der neoplastischen Transformation bzw. der Tumorentstehung nahe.

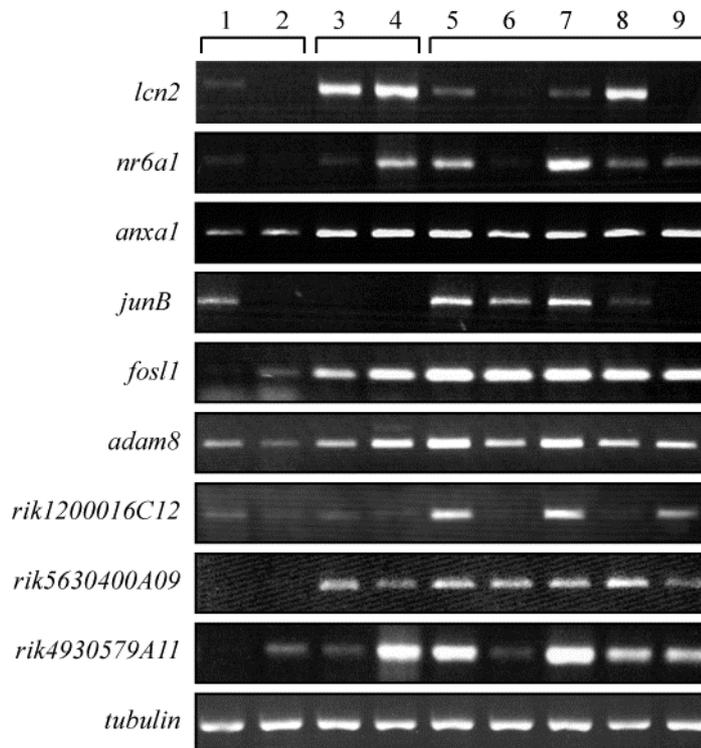


Abb. 6: Expression von Tumor-assoziierten Genen in Keratinozyten-Zelllinien.

RT-PCR-Analysen mit RNA aus nicht-tumorigenen Keratinozytenzelllinien (1: MCA3D, 2: Reb1) und Zellen, die *in vivo* benigne (3: 308, 4: SP1) oder maligne Tumore (5: MCA3D/AT3, 6: CarB, 7: PDV, 8: PMK-R3, 9: PECA) ausbilden, wurden mit genspezifischen Oligonukleotiden für *lcn2*, *nr6a1*, *anxa1*, *junB*, *fosl1*, *adam8*, *rik1200016C12*, *rik56303400A09* oder *rik4930579A11* durchgeführt. Die cDNA-Qualität sowie deren Quantität wurden mit β -tubulin-spezifischen Oligonukleotiden kontrolliert.

Ob sich die im murinen System beobachtete Veränderung in der Expression individueller Gene auch auf den Prozess der humanen Karzinogenese übertragen lässt, wurde durch *in situ*-Hybridisierung unter Verwendung von humanen Hauttumorschnitten überprüft. Eine erhöhte Expression konnte für *anxa1*, *lcn2*, *s100a8* und *s100a9* in mindestens zwei von drei PEK unterschiedlicher Patienten in Keratinozyten des Tumors und nicht im Tumorstroma bzw. in der benachbarten, pathologisch unveränderten Haut nachgewiesen werden (Abb. 7).

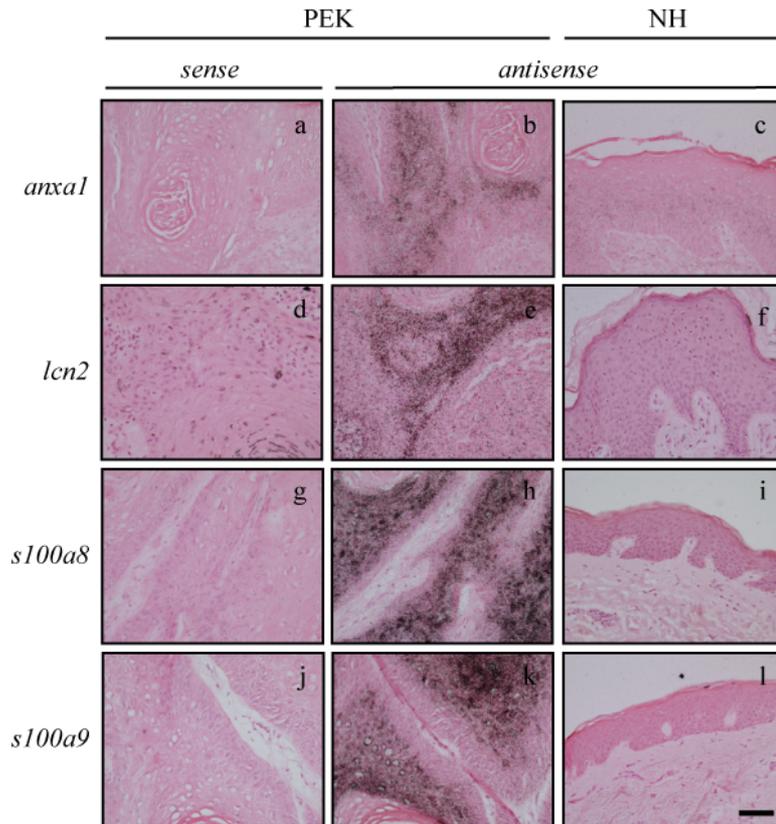


Abb. 7: Induzierte Expression von *anxa1*, *lcn2*, *s100a8* und *s100a9* in humanen Hauttumoren.

Paraffinschnitte von Plattenepithelkarzinomen unterschiedlicher Patienten wurden mit ^{35}S -markierten Antisense-Ribonukleotidsonden spezifischer cDNA-Fragmente von *anxa1* (a-c), *lcn2* (d-f), *s100a8* (g-i) und *s100a9* (j-l) hybridisiert. Die Hybridisierung mit der Antisense-Ribonukleotidsonde ergab kaum detektierbares bzw. kein Signal in der dem Tumor benachbarten, pathologisch unveränderten Haut (c, f, i, l). Als Kontrolle für die Spezifität wurde die Sense-Oligonukleotidsonde eingesetzt. Die Präparate wurden mit Hämatoxylin und Eosin gegengefärbt und unter Hellfeldbedingungen im Mikroskop photographisch dokumentiert.

(Skalierung: 50 μm).

Die bisher gezeigten Daten demonstrieren, dass die Kombination aus dem chemisch induzierten Karzinogenesemodell der Maushaut und der *Microarray*-Analyse die Identifizierung Tumor-assoziiierter Gene ermöglichte. Die differentielle Genexpression konnte nicht nur in murinen, sondern auch in humanen PEK gezeigt werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Daten zum Teil auf die Tumorentstehung beim Menschen übertragen werden können. Die Resultate aus der *Microarray*-Analyse kombiniert mit den Daten aus anderen Studien (z.B. SSH) liefern die Basis für weiterführende Experimente auf der Proteinebene sowie für funktionelle Analysen einiger aufschlussreicher Kandidaten-Gene in Zellkultursystemen und Tiermodellen.

3.2 Expressionsstudien zu Tumor-assoziierten Proteasen

3.2.1 Expression von Proteasen in humanen Hauttumoren

Aufgrund der Vielzahl der im Verlauf des experimentellen Hautkarzinogenesemodells der Maus differentiell regulierten Gene galt es nun, sich auf eine bestimmte funktionelle Gruppe von Genen zu konzentrieren, die eine Charakterisierung mit Hilfe möglichst ähnlicher experimenteller Strategien erlaubt. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf sezernierte bzw. membranständige Proteasen gerichtet, da sie im Zusammenhang mit der Tumorentstehung, Bildung von Metastasen und Tumorangiogenese interessante Kandidaten darstellen (Kap. 1.2). Sezernierte Proteine eignen sich besonders gut für den Einsatz als Tumormarker, weil deren Bestimmung z. T. in Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin vollzogen werden kann. Desweiteren macht die Verfügbarkeit von Inhibitoren, die sowohl für eine funktionelle Inaktivierung der Enzyme im Rahmen von *in vitro*-Experimenten als auch in der Tumorthherapie verwendet werden können, die Proteasen ebenfalls zu aussichtsreichen Kandidaten für eine weiterführende, detaillierte Analyse.

Bei der Hybridisierung der cDNA-Microarrays wurden die beiden Proteasen *adam8* und *KLK9*, das humane Homolog zu *rik1200016C12*, identifiziert und mit Hilfe von RT-PCR-Analysen deren Induktion in TPA-behandelter Haut, in Papillomen und in PEK sowie in tumorigenen Keratinozyten verifiziert (Abb. 4 A und Abb. 6). Während ADAM8 zu der Familie der Metalloproteasen mit Disintegrin-Domäne gehört, handelt es sich bei dem murinen Homolog zu *KLK9* um ein Mitglied der Kallikrein-Proteasen. Wie zuvor erwähnt wurde die Protease BSSP, ein weiteres Mitglied dieser Familie, im Zusammenhang mit der chemisch induzierten Hautkarzinogenese in unserer Arbeitsgruppe bereits identifiziert (Breitenbach et al., 2001). BSSP weist zu dem humanen *KLK6/neurosin/protease M/zyme*-Gen ausgeprägte Homologien auf und ist ebenfalls sowohl nach TPA-Stimulation als auch in Papillomen und PEK der Maus hochreguliert (Abb. 4 B).

Zunächst sollte überprüft werden, inwieweit eine erhöhte Expression dieser Proteasen mit der Entstehung von Hauttumoren beim Menschen korreliert. Hierfür wurde RNA aus einem KA (Keratoakanthom) sowie aus mehreren PEK und BZK (Basalzellkarzinomen) von verschiedenen Patienten präpariert und die cDNA mittels semiquantitativer RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für *KLK6*, *KLK9* und *adam8* untersucht (Abb. 8). Gegenüber normaler Haut ohne pathologische Veränderungen konnte sowohl für *KLK6* und *KLK9* als auch für *adam8* eine verstärkte Expression in der Mehrzahl der humanen Tumore beobachtet werden. Mit Ausnahme des benignen KA sind die Kallikreine *KLK6* und *KLK9* in den exakt gleichen Hauttumoren in vergleichbaren Mengen koexprimiert.

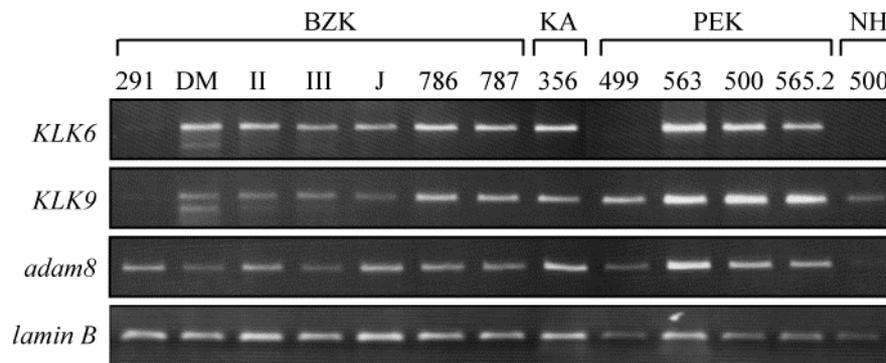


Abb. 8: Induktion der Proteasen *KLK6*, *KLK9* und *adam8* in humanen Plattenepithel- und Basalzellkarzinomen gegenüber normaler Haut.

Aus einem benignen Keratoakanthom (KA), verschiedenen Basalzellkarzinomen (BZK), Plattenepithelkarzinomen (PEK) und normaler Haut (NH) wurde RNA isoliert und cDNA synthetisiert. RT-PCR-Analysen zeigten eine erhöhte Expression der Kallikrein-Proteasen *KLK6* und *KLK9* sowie von *adam8* in humanen Tumoren der Haut gegenüber der Kontrolle. Die Qualität und die Quantität der cDNA wurden durch Amplifikation eines *lamin B*-Fragmentes überprüft.

3.2.2 Expression von *bssp/KLK6* in murinen und humanen Hauttumoren

Die RT-PCR-Analysen deuten darauf hin, dass die beiden Proteine hK6 und hK9 in den Prozess der Hautkarzinogenese involviert sind. Für einige epitheliale Tumore ist die Beteiligung einzelner Mitglieder der Kallikreinfamilie bereits beschrieben, jedoch wurde deren Expression in Hauttumoren bis zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeiten noch nicht untersucht. Aus diesem Grund erfolgte die detaillierte Untersuchung der Expression und der Funktion der Kallikrein-Proteasen in der Karzinogenese der Haut. Zunächst wurde der Fokus auf BSSP/hK6 gelegt, da zu dieser Protease sowohl Informationen über Inhibitoren und potentielle ECM-Substrate als auch Antikörper zur Verfügung standen. Durch *in situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten von chemisch induzierten Papillomen und PEK der Maus konnte für BSSP eine erhöhte Expression in Keratinozyten nachgewiesen werden (Abb. 9 A). Um zu klären, ob die Zunahme auf mRNA-Ebene auch mit einer erhöhten Proteinexpression korreliert, wurden immunhistochemische Analysen auf Gewebeschnitten muriner Hauttumore durchgeführt. Damit das endogene BSSP-Protein im Gewebe detektiert werden konnte, wurde der anti-MSP-Antikörper eingesetzt, der gegen das Homolog von BSSP aus der Ratte gerichtet ist. Die Spezifität dieses Antikörpers war vorab in einer *Western blot*-Analyse von Überständen und Zelllysaten transfizierter Zellen getestet worden und führte zur Erkennung des BSSP-Proteins bei 28 kDa (Daten nicht gezeigt). Die immunhistochemischen Untersuchungen belegten, dass BSSP überwiegend in den differenzierenden Keratinozyten muriner Papillome vorliegt (Abb. 9 B). Dies bestätigt die zuvor durch *in situ*-Hybridisierung beobachtete Expression und erlaubt ausserdem einen Rückschluss auf eine mögliche funktionelle Beteiligung des BSSP-Proteins im Verlauf der Tumorgenese.

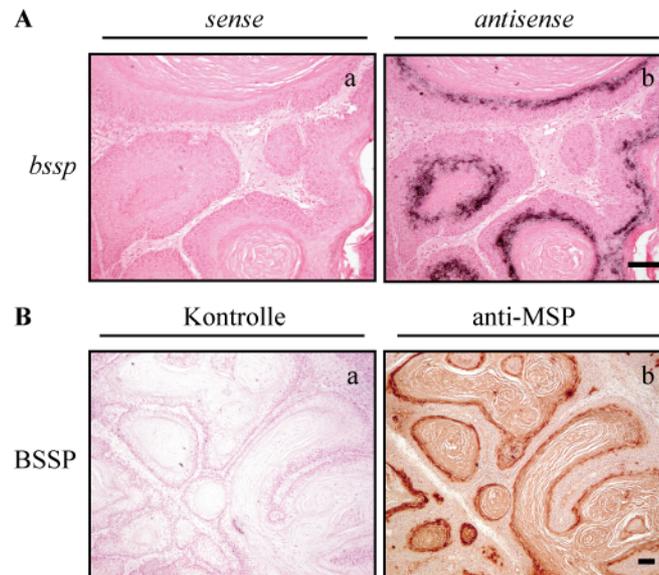


Abb. 9: Erhöhte Expression von *bssp*/BSSP auf mRNA- und Proteinebene in murinen Papillomen.

(A): *In situ*-Hybridisierung diente dem Nachweis der *bssp*-Expression in murinen Papillomen, wobei ein *bssp*-spezifisches cDNA-Fragment aus dem 5'-Bereich des offenen Leserasters für die Markierung mit ^{35}S -UTP eingesetzt wurde. Die Hybridisierung wurde mit der genspezifischen *Antisense*- (b) und der *Sense*-Ribonukleotidsonde (a) als Kontrolle durchgeführt und nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eosin unter Hellfeldbedingungen photographisch festgehalten.

(Skalierung: 200 μm).

(B): Immunhistochemische Analysen wurden für die Detektion des BSSP-Proteins in murinen Papillomen eingesetzt. Dabei wurde der anti-MSP-Antikörper verwendet (b), dessen spezifische Erkennung von BSSP zuvor in *Western blot*-Untersuchungen nachgewiesen worden war. Als Kontrolle wurde der Sekundärantikörper eingesetzt (a).

(Skalierung: 200 μm).

Der nächste Schritt bestand darin nachzuweisen, ob die Beobachtungen, die für BSSP im murinen System gemacht wurden, auch für den Prozess der humanen Karzinogenese der Haut zutreffen. Aufgrund der Sequenzidentität von 67% auf Proteinebene sowie der chromosomalen Lokalisation stellt *KLK6* das wahrscheinlichste humane Ortholog zu *bssp* dar. Zunächst wurde die kodierende cDNA für *KLK6* aus der von der Brustkrebslinie MCF-7 abgeleiteten MELN-Zelllinie mit *bssp*-spezifischen Oligonukleotiden durch PCR amplifiziert (Kap. 2.1.7). Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM[®]-T kloniert und im Anschluss durch Sequenzierung überprüft. Ein Fragment der *KLK6*-cDNA-Sequenz wurde für *in situ*-Hybridisierungen eingesetzt, um die Expression von *KLK6* in humanen PEK verschiedener Patienten zu untersuchen (Abb. 10 A). Eine deutliche Expression in den Keratinozyten der Tumore bestätigte die zuvor für das murine System erhaltenen Resultate. Ebenso konnte mit Hilfe von Immunhistochemie die Induktion auf Proteinebene in humanen Keratoakanthomen und PEK gezeigt werden (Abb. 10 B). Im Gegensatz dazu wurde in der dem Tumor benachbarten, pathologisch unveränderten Haut kein Signal detektiert (Daten nicht gezeigt).

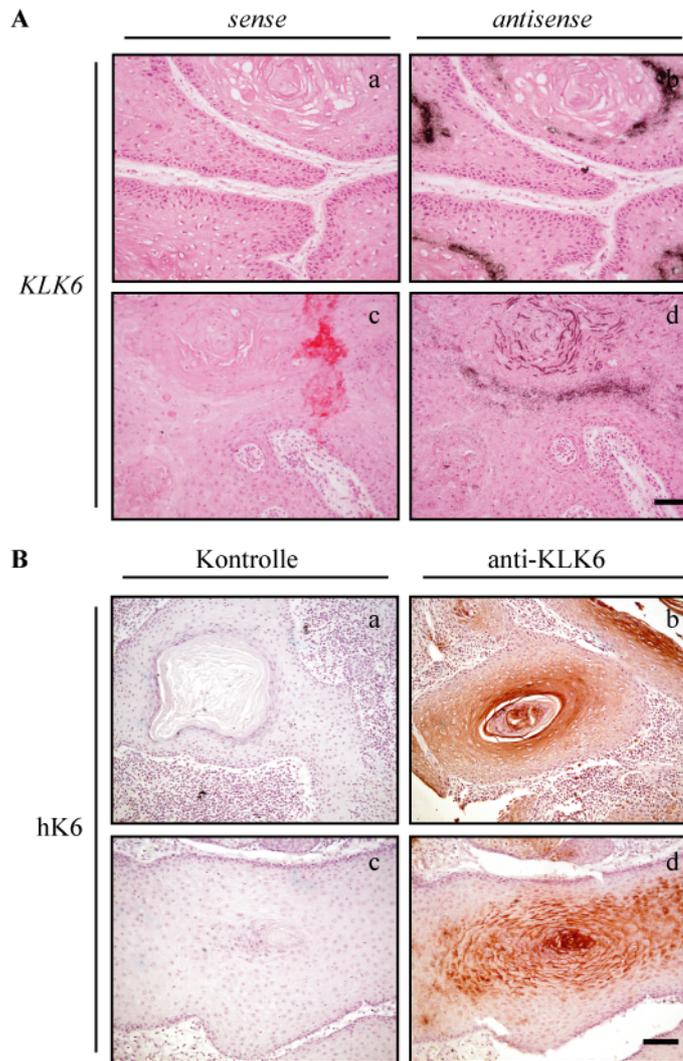


Abb. 10: Erhöhte Expression von *KLK6*/hK6 auf mRNA- und Proteinebene in humanen Tumoren der Haut.

(A): Die Expression von *KLK6* wurde durch *in situ*-Hybridisierungen auf Gewebeschnitten von humanen Plattenepithelkarzinomen (PEK) analysiert. Ein *KLK6*-spezifisches cDNA-Fragment wurde mit ^{35}S -UTP radioaktiv markiert und als genspezifische *Antisense*- (b, d) bzw. *Sense*-Ribonukleotidsonde als Kontrolle (a, c) für die Hybridisierung verwendet. In zwei von drei Hauttumoren verschiedener Patienten PEK212 (a, b) und PEK563 (c, d) wurde eine erhöhte Expression im Tumor detektiert. Die mit Hämatoxylin und Eosin gegengefärbten Paraffinschnitte wurden unter Hellfeldbedingungen photographiert.

(Skalierung: 200 μm).

(B): Unter Verwendung eines spezifischen anti-hK6-Antikörpers wurde die verstärkte Expression von hK6 in Keratoakanthomen (a, b) und Plattenepithelkarzinomen (c, d) durch Immunhistochemie nachgewiesen. Als Kontrolle wurde nur der Sekundärantikörper verwendet (a, c).

(Skalierung: 200 μm).

Neben der Expression in Hauttumoren konnte nachgewiesen werden, dass *KLK6* mRNA in den beiden Zelllinien SCL-I und SCL-II, die aus PEK von Patienten etabliert wurden, stärker exprimiert wird als in der immortalisierten, nicht-tumorigenen humanen Keratinozyten-Zelllinie hTERT (Abb. 11).

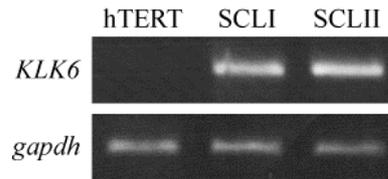


Abb. 11: Induktion von *KLK6* in den aus Plattenepithelkarzinomen etablierten SCL-Zelllinien.

Aus der nicht-tumorigenen immortalisierten Keratinozytenzelllinie hTERT sowie aus den aus Plattenepithelkarzinomen verschiedener Patienten etablierten Zelllinien SCL-I (SCLI) und SCL-II (SCLII) wurde RNA isoliert und anschliessend für eine cDNA-Synthese eingesetzt. In der nachfolgenden RT-PCR-Analyse wurden *KLK6*-spezifische Oligonukleotide eingesetzt. Die Kontrolle der cDNA-Qualität sowie deren Quantität erfolgte mit *gapdh*-spezifischen Oligonukleotiden.

Die Expression in der Karzinogenese der humanen Haut unterstützt die Hypothese, dass es sich bei *KLK6* um das funktionelle Homolog zu *bssp* handelt und unterstreicht eine mögliche Beteiligung dieses Proteins an der Entstehung und Etablierung der Tumore.

3.2.3 Expression von *KLK6* in epithelialen Tumoren

Nachdem eine erhöhte *KLK6*-Expression mit humanen Hauttumoren in Verbindung gebracht werden konnte, war nun von zentraler Bedeutung zu klären, ob die Expression auch in anderen epithelialen Tumoren differentiell reguliert wird. Um einen möglichst umfassenden Überblick über die Expression in verschiedenen Tumoren zu erhalten, wurde der kommerziell erhältliche *BD Clontech™ Cancer Profiling Array II* mit einer *KLK6*-spezifischen Probe hybridisiert (Abb. 12).

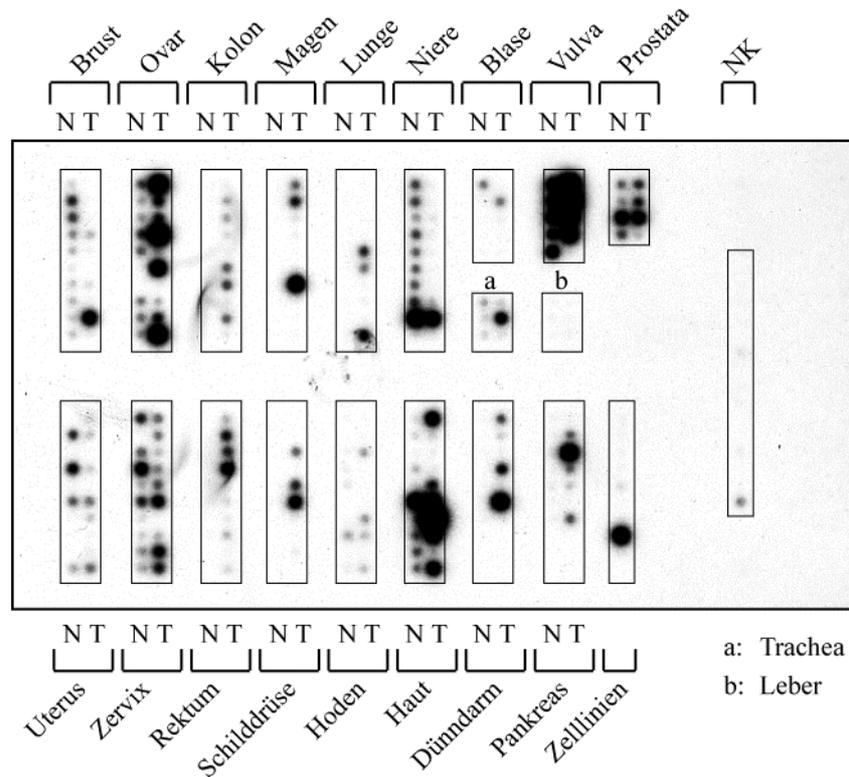


Abb. 12: Expression von *KLK6* in epithelialen Tumoren.

Der *BD Clontech™ Cancer Profiling Array II*, der cDNA aus verschiedenen humanen Tumor- (T) und Normalgeweben (N) sowie tumorigenen Zelllinien enthält, wurde mit einer *KLK6*-spezifischen ³²P-markierten Sonde hybridisiert. Als Negativkontrollen (NK) wurden Gesamt-RNA aus Hefe, Hefe-tRNA, *E.coli*-DNA, Poly(A), humane Cot-1-DNA, humane genomische DNA und Ubiquitin-cDNA auf den Filter aufgebracht.

Das Ergebnis bestätigte die zuvor beobachtete Induktion von *KLK6* in humanen Hauttumoren, da sechs der zehn Proben (60%) ein deutliches Signal zeigten. Um welchen Typ von Hauttumor es sich dabei handelte ist in Tab. 5 dargestellt. Daraus geht hervor, dass *KLK6* in beiden PEK der Haut und ausserdem in drei von sieben malignen Melanomen induziert vorlag.

Tab. 5: Expression von *KLK6* in Hauttumoren.

Die Tabelle zeigt die Hauttumore, die auf dem *BD Clontech™ Cancer Profiling Array II* (Reihenfolge auf der Membran von oben nach unten) zu finden sind, und gibt an, ob *KLK6* in diesen exprimiert ist: (+): *KLK6* Expression; (-): keine *KLK6* Expression.

Hauttumor	<i>KLK6</i>
malignes Melanom	+
malignes Melanom	-
malignes Melanom	-
malignes Melanom	-
malignes Melanom	+
unbekannt	+
Plattenepithelkarzinom	+
Plattenepithelkarzinom	+
malignes Melanom	-
malignes Melanom	+

Neben den Hauttumoren konnte eine signifikant erhöhte Expression in Ovarialtumoren (70%) und eine reduzierte Expression in Brusttumoren (70%) beobachtet werden, die bereits beschrieben worden waren (Tanimoto et al., 2001; Diamandis et al., 2000; Yousef et al., 2004). Zudem wurde in fast allen Vulvakarzinomen, in einer Vielzahl gastrointestinaler Karzinome wie z.B. des Magens, des Dünndarms, des Dickdarms und des Enddarms sowie in einigen Lungen-, Pankreas- und Schilddrüsentumoren eine Induktion festgestellt. Eine der Tumor-Zelllinien auf dem Array, die Kolon-Adenokarzinomlinie SW480, exprimierte ebenfalls *KLK6*. Interessanterweise zeigten alle Nierenzelltumore bis auf eine Ausnahme eine Abnahme der *KLK6*-Expression im Vergleich zum Normalgewebe. Alle anderen Tumortypen (Blase, Prostata, Trachea, Uterus, Zervix, Hoden) zeichneten sich durch ein überwiegend inhomogenes Bild bzw. durch keine Expression (Leber) aus.

Demzufolge wird *KLK6* in einer Vielzahl epithelialer Tumore dereguliert. Die Aufklärung der Funktion von BSSP und hK6 in epithelialen Zellen könnte daher einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Tumorentstehung und der Tumorentwicklung leisten.

3.3 Funktionelle Charakterisierung der Serinprotease BSSP/hK6

3.3.1 Stabile Expression von transgenem BSSP in Keratinozyten

Um zu untersuchen, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der erhöhten BSSP-Expression und der neoplastischen Transformation von Keratinozyten und damit der Tumorentstehung besteht, wurde die Funktion von BSSP in Keratinozyten analysiert. Die Aufklärung dieser Fragestellung erfolgte zunächst mittels *in vitro*-Experimenten durch Generierung von BSSP-überexprimierenden Keratinozytenzelllinien. Dazu wurde das offene Leseraster der cDNA-Sequenz unter die Kontrolle des CMV (Cytomegalovirus)-Promotors im Vektor pcDNA3.1[®]/His-myc-A gebracht (Abb. 13 A). Durch Mutation des endogenen Stopkodons erfolgte die rekombinante Expression von BSSP zusammen mit dem C-terminalen Histidin₆-Rest und dem *myc tag*. Der Histidin₆-Rest ermöglichte die Aufreinigung des Proteins über *Talon beads* und der *myc tag* die Detektion im *Western blot* über den anti-Myc-Antikörper.

Für die funktionelle Analyse von BSSP ist der Nachweis unumgänglich, dass es sich bei dem überexprimierten Protein tatsächlich um ein proteolytisch aktives Enzym handelt. Dazu wurde die Aktivität von BSSP mittels Zymographie überprüft. In vorhergehenden Experimenten hatte sich herausgestellt, dass die Fibrosarkom-Zelllinie HT-1080 eine hohe Transfektionseffizienz aufwies und bei stabiler Transfektion grosse Mengen an

rekombinantes BSSP in den Zellkulturüberstand freisetzte, was eine Voraussetzung für die zymographische Untersuchung darstellt. Aufgrund dessen wurde die HT-1080-Zelllinie stabil mit dem Expressionskonstrukt transfiziert, das sezernierte BSSP aus dem Überstand einzelner Klone aufgereinigt und durch Zymographie analysiert (Abb. 13 B). Da Gelatine als *in vitro*-Substrat von BSSP bereits beschrieben worden war, wurde es dem Zymogramm beigefügt (Matsui et al., 2000). Parallel dazu wurde die Expression und die Sekretion von BSSP durch *Western blot* überprüft. Aus den zwei weissen Banden im Zymogramm auf der Höhe von etwa 28 kDa ist ersichtlich, dass proteolytisch aktives BSSP die im Gel vorhandene Gelatine degradierte. Die Bande mit dem höheren Molekulargewicht entspricht dabei Pro-BSSP und die niedermolekulare Bande aktiviertem BSSP.

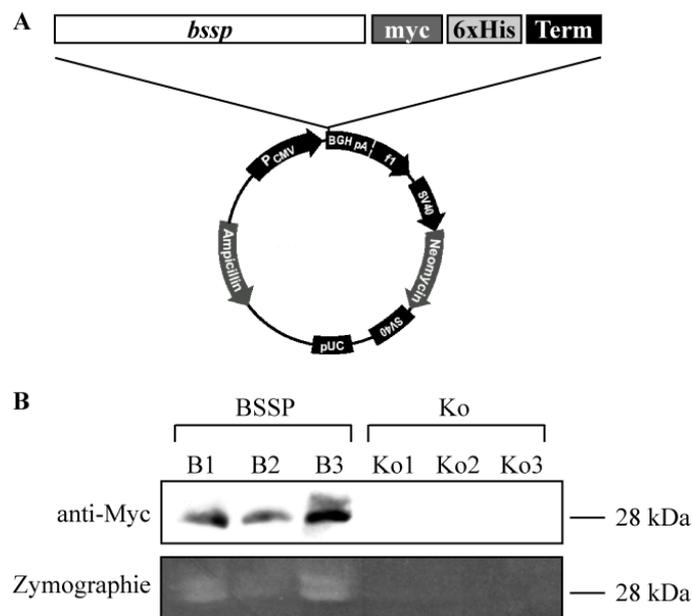


Abb. 13: Expression von proteolytisch aktivem BSSP-Protein in HT-1080 Fibrosarkom-Zelllinien.

(A): Der Expressionsvektor *pcDNA3.1*[®]/*His-myc-A* wurde für die rekombinante Überexpression von BSSP eingesetzt. Dazu wurde die für das offene Leseraster kodierende cDNA-Sequenz (*bssp*) in die Klonierungsregion des Vektors hinter den CMV-Promotor (*P_{CMV}*) eingefügt. Das rekombinant exprimierte Protein mit einer Grösse von 28 kDa konnte über einen Histidin₆-Rest (6xHis) aufgereinigt und anschliessend über einen *myc tag* (*myc*) im *Western blot* mit Hilfe des anti-Myc-Antikörpers detektiert werden.

(B): Die Fibrosarkom-Zelllinie HT-1080 wurde stabil mit dem in Abb. 13 A dargestellten BSSP-Expressionskonstrukt bzw. in einem Kontrollansatz mit dem *pcDNA3.1*[®]/*His-myc-A*-Vektor transfiziert. Rekombinantes BSSP wurde aus 48 Std. konditionierten Zellkulturüberständen von drei Klonen, die das BSSP-Expressionskonstrukt tragen (BSSP: B1, B2, B3), über den His₆-Rest mit *Talon beads* aufgereinigt. Gleichermassen wurde mit drei Kontroll-Klonen, die den Leervektor enthalten (Ko: Ko1, Ko2, Ko3), verfahren. 1/3 des aufgereinigten, rekombinanten Proteins bzw. der Kontrollen wurde für eine *Western blot*-Analyse mit dem anti-Myc-Antikörper und 2/3 für die zymographische Überprüfung der Aktivität von BSSP verwendet. Nach Entfärben des gelatinehaltigen, Coomassiegefärbten Polyacrylamidgels wurden weisse Banden bei einem Molekulargewicht von 28 kDa als Zeichen des proteolytischen Gelatine-Abbaus durch das rekombinante BSSP sichtbar.

Damit beweist die Zymographie, dass in den drei stabil transfizierten HT-1080 Klonen, bei denen sezerniertes BSSP durch *Western blot*-Analysen im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden konnte, die Protease in ihrer aktiven Konformation vorlag. Aus diesem Grund wurde das BSSP-Expressionskonstrukt für die stabile Transfektion der nicht-tumorigenen Keratinozyten-Zelllinie MCA3D verwendet. Diese Zelllinie wurde ausgewählt, da sie endogenes *bssp* in kaum nachweisbarem Umfang exprimiert (vgl. Abb. 14 A). Im Gegensatz dazu wies die tumorigene Keratinozytenlinie MCA3D/AT3, die aus MCA3D-Keratinozyten durch Einbringen des Ras-Onkogens hervorging (Quintanilla et al., 1991), eine starke *bssp*-Expression auf (Daten nicht gezeigt).

Nach der Etablierung einzelner MCA3D-Zellklone wurden die Klone auf mRNA- und Proteinebene auf die Expression von exogenem BSSP untersucht (Abb. 14 A und B).

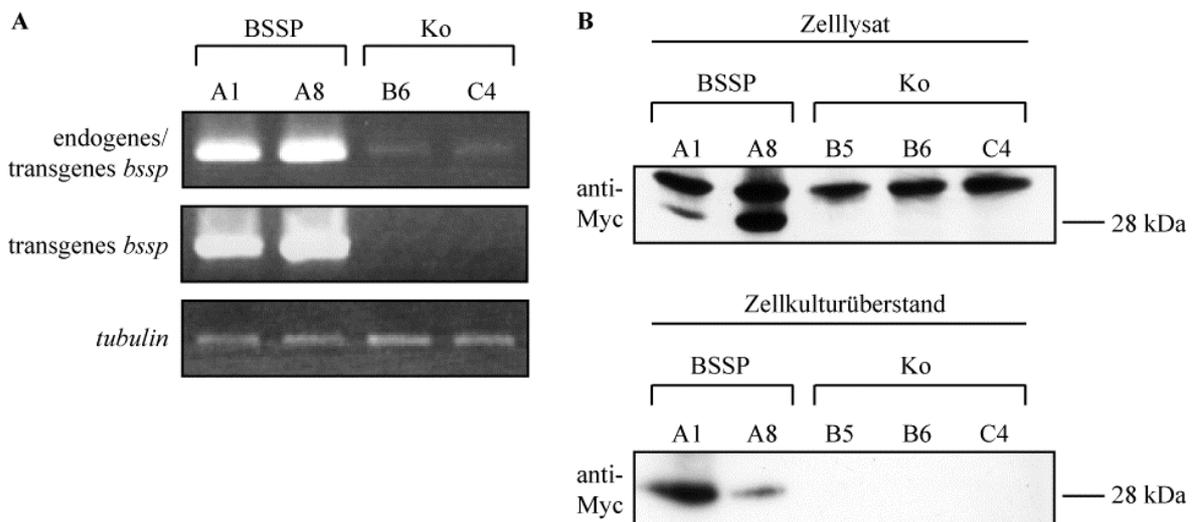


Abb. 14: Stabile Expression von BSSP in MCA3D-Keratinozyten.

MCA3D-Klone, die mit dem BSSP-Expressionskonstrukt (BSSP: A1, A8) bzw. in einem Kontrollansatz mit dem Leervektor pcDNA3.1[®]/His-myc-A (Ko: B5, B6, C4) transfiziert worden waren, wurden auf die Expression von rekombinantem BSSP untersucht.

(A): In RT-PCR-Analysen mit cDNA aus den o.g. MCA3D-Klonen wurden Oligonukleotide eingesetzt, die zur spezifischen Amplifikation des endogenen und transgenen *bssp*-Transkriptes führen. Um ausschliesslich die transgene mRNA zu detektieren, wurde ein *bssp*-spezifisches Oligonukleotid zusammen mit einem Oligonukleotid, das im Bereich des *myc tags* bindet, verwendet. Zur Kontrolle der cDNA-Qualität und der -Quantität wurde ein β -*tubulin*-Fragment amplifiziert.

(B): Zelllysate sowie die entsprechenden 48 Std. konditionierten und mit *Talon beads* behandelten Zellkulturüberstände von o.g. MCA3D-Klonen wurde nach Polyacrylamidgelelektrophorese einer *Western blot*-Analyse mit dem anti-Myc-Antikörper unterzogen.

Sowohl die RT-PCR als auch die *Western blot*-Analyse zeigten, dass transgenes BSSP in den Keratinozyten auf mRNA- und Proteinebene exprimiert wurde. Darüberhinaus sezernierten die Keratinozyten das Protein zum Teil in den Zellkulturüberstand. In den Kontrollklonen, die aus der Transfektion mit dem Leervektor hervorgegangen waren,

konnte auf mRNA-Ebene nur geringe Mengen an endogenem *bssp* und auf Proteinebene kein exogenes BSSP nachgewiesen werden. Die vorliegenden stabilen Keratinozytenklone (MCA3D-BSSP#A1, MCA3D-BSSP#A8), die aktives exogenes BSSP produzieren, und die Kontrollen (MCA3D-Mock#B6, MCA3D-Mock#C1, MCA3D-Mock#C4) wurden für die nachfolgenden *in vitro*-Studien zur funktionellen Charakterisierung von BSSP eingesetzt.

3.3.2 Einfluss von BSSP auf die Morphologie von Keratinozyten

Die Expression von BSSP in Keratinozyten führte zu einer drastischen Änderung der Zellmorphologie (Abb. 15). Sowohl die parentale Zelllinie MCA3D als auch die Vektor-transfizierten Kontrollklone (Mock) zeichneten sich durch klonales, zweidimensionales Wachstum unter Aufrechterhaltung deutlicher Zell-Zell-Kontakte aus. Dies bewirkte ein „pflastersteinartiges“ Aussehen der Zellen. Wie exemplarisch an dem Klon MCA3D-BSSP#A8 gezeigt, waren die BSSP-transfizierten Keratinozyten durch einen verlängerten Zellkörper mit einer fibroblastenähnlichen Morphologie charakterisiert. Sie wuchsen nicht als zweidimensionale Kolonien, sondern mehrschichtig mit offensichtlich reduziertem Kontakt zur Nachbarzelle.

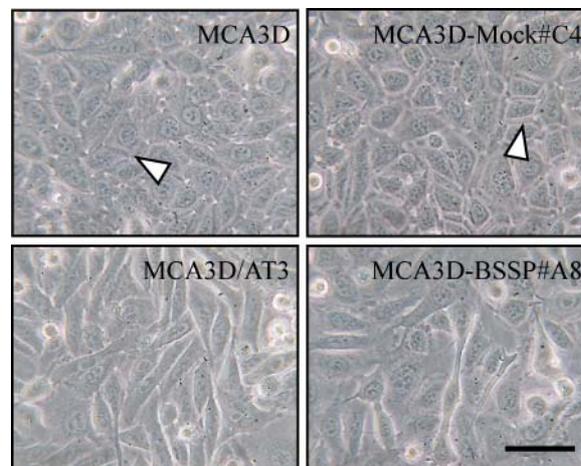


Abb. 15: Veränderte Morphologie von BSSP-exprimierenden Keratinozyten.

Die Abbildung zeigt Phasenkontrastaufnahmen der tumorigenen Keratinozytenzelllinie MCA3D/AT3, der nicht-tumorigenen Keratinozytenzelllinie MCA3D sowie des Kontrollklons MCA3D-Mock#C4 und des repräsentativen BSSP-exprimierenden Klons MCA3D-BSSP#A8. Bei der parentalen Zelllinie MCA3D und dem Kontrollklon MCA3D-Mock#C4 sind Bereiche ausgeprägten Zell-Zell-Kontaktes mit weissen Pfeilspitzen markiert.

(Skalierung: 25 μ m).

3.3.3 Veränderungen der Zell-Zell-Adhäsion in BSSP-überexprimierenden Keratinozyten

Um zu überprüfen, ob die mikroskopisch beobachtete Veränderung der Zell-Zell-Adhäsion in BSSP-exprimierenden Keratinozyten auf molekularer Ebene belegt werden kann, wurde die Expression des zentralen Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin in den Keratinozyten-Klonen untersucht. Das integrale Membranprotein E-Cadherin vermittelt als Bestandteil der Desmosomen die homophile Zellinteraktion in Epithelzellen und ist ausserdem für die Aufrechterhaltung der epithelialen Polarität verantwortlich. Der Verlust der E-Cadherin Expression und damit der Funktion in epithelialen Karzinomen gilt als einer der primären Ursachen für die mesenchymale Transition von Epithelzellen und für das invasive Verhalten transformierter Zellen (Kang and Massague, 2004; Hazan et al., 2004) (Kap. 1.1.3).

Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen gegen E-Cadherin in MCA3D-Keratinozyten und MCA3D-Kontrollklonen ergaben das charakteristische Expressionsmuster von E-Cadherin, bei dem das Signal als durchgängige Linie an den Kontaktstellen zwischen einzelnen Zellen zu finden ist (Abb. 16). In den BSSP-exprimierenden MCA3D-Klonen war dagegen die Intensität der Fluoreszenz an den Zellgrenzen signifikant reduziert, ein Effekt, der in der tumorigenen Keratinozytenlinie MCA3D/AT3 noch deutlicher wurde. Zudem war in beiden Keratinozytenlinien das E-Cadherin Protein in kleinen Aggregaten entweder an der Membran oder im Zytoplasma lokalisiert.

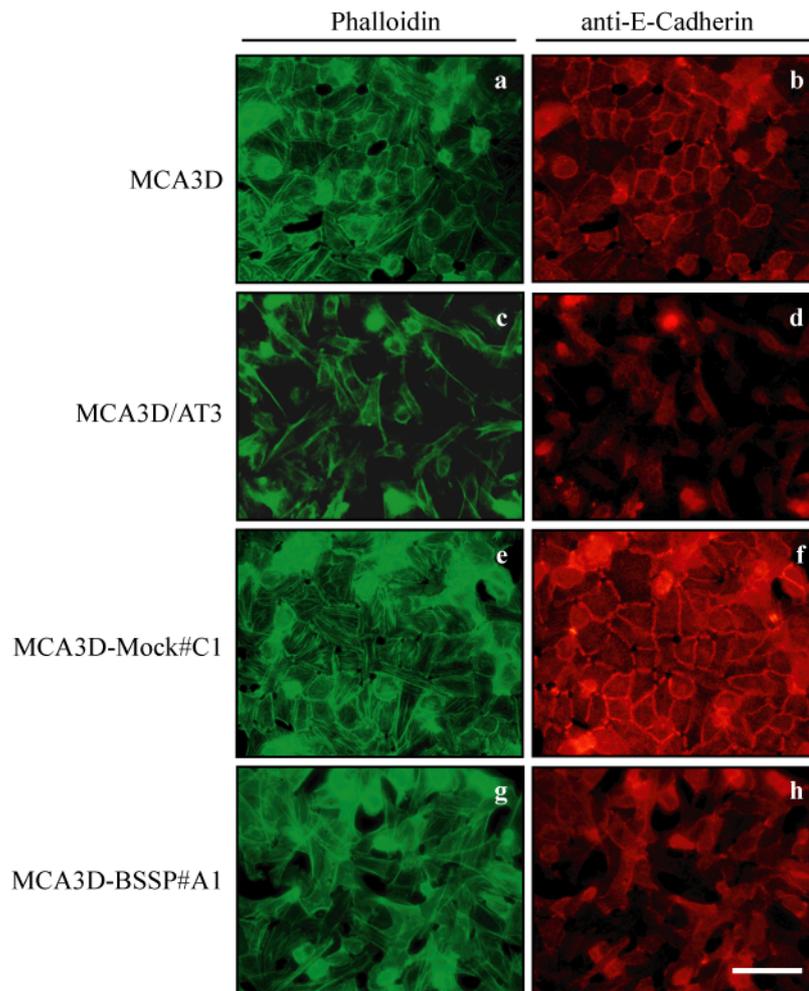


Abb. 16: Translokation von E-Cadherin in BSSP-exprimierenden Keratinozyten.

Mit einem anti-E-Cadherin-Antikörper wurden indirekte Immunfluoreszenz-Analysen (rote Fluoreszenz) der Zelllinien MCA3D (b) und MCA3D/AT3 (d) sowie der Vektor- bzw. BSSP-transfizierten Keratinozytenklone MCA3D-Mock#C1 (f) bzw. MCA3D-BSSP#A1 (h) durchgeführt. Die Morphologie der Keratinozyten wurde durch eine Phalloidin-Färbung (grüne Fluoreszenz) des Zytoskeletts sichtbar gemacht (a, c, e, g). (Skalierung: 25 μ m).

Die Immunfluoreszenz-Färbung liess keine Schlussfolgerung darüber zu, ob es sich bei dem veränderten E-Cadherin-Signal um eine reduzierte Expression oder um eine veränderte Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle handelte. *Western blot*-Analysen ergaben, dass keine Unterschiede in der Expression von E-Cadherin zwischen den BSSP-, den Vektor-transfizierten Keratinozytenklonen und den MCA3D/AT3-Keratinozyten vorlagen (Abb. 17).

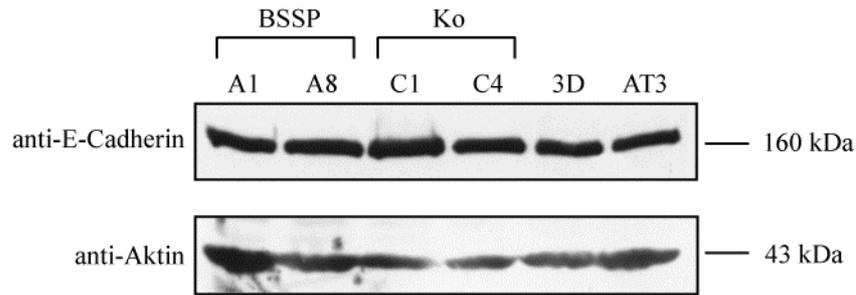


Abb. 17: Konstante E-Cadherin-Expression in BSSP-exprimierenden Keratinozyten.

Zellextrakte aus den BSSP-überexprimierenden Keratinozyten (BSSP) MCA3D-BSSP#A1, MCA3D-BSSP#A8, aus den Kontrollklonen (Ko) MCA3D-Mock#C1 und MCA3D-Mock#C4 sowie aus MCA3D- (3D) und MCA3D/AT3-Keratinozyten (AT3) wurden nach der Auftrennung in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel durch *Western blot* mit dem anti-E-Cadherin-Antikörper untersucht. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurde ein anti-Aktin-Antikörper eingesetzt.

Die Ergebnisse machten deutlich, dass die beobachteten Unterschiede in der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten nicht auf einen Verlust des E-Cadherin Proteins zurückgingen, sondern auf eine veränderte Verteilung in der Zelle. Zelluläre Prozesse, die von einer verminderten Zellaggregationsfähigkeit beeinflusst werden, sind u.a. Wachstum und Migration, die im Folgenden näher charakterisiert wurden.

3.3.4 Beeinflussung des Wachstumsverhaltens von Keratinozyten durch BSSP

Die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beim Wachstum von Zellen dient der Zelle als Signal für den Wachstumsstillstand (Kontaktinhibition). Untersuchungen mit der Brusttumor-Zelllinie MCF-7, die mit einem dominant-negativen E-Cadherin-Konstrukt transfiziert wurde, belegen, dass funktionelles E-Cadherin für die Kontaktinhibition von Tumorzellen verantwortlich ist (Vizirianakis et al., 2002). Um zu klären, ob aufgrund der veränderten Lokalisation des E-Cadherin-Proteins die Kontaktinhibition von BSSP-exprimierenden Keratinozyten gestört ist, wurden Wachstumskurven von den stabilen Linien erstellt (Abb. 18).

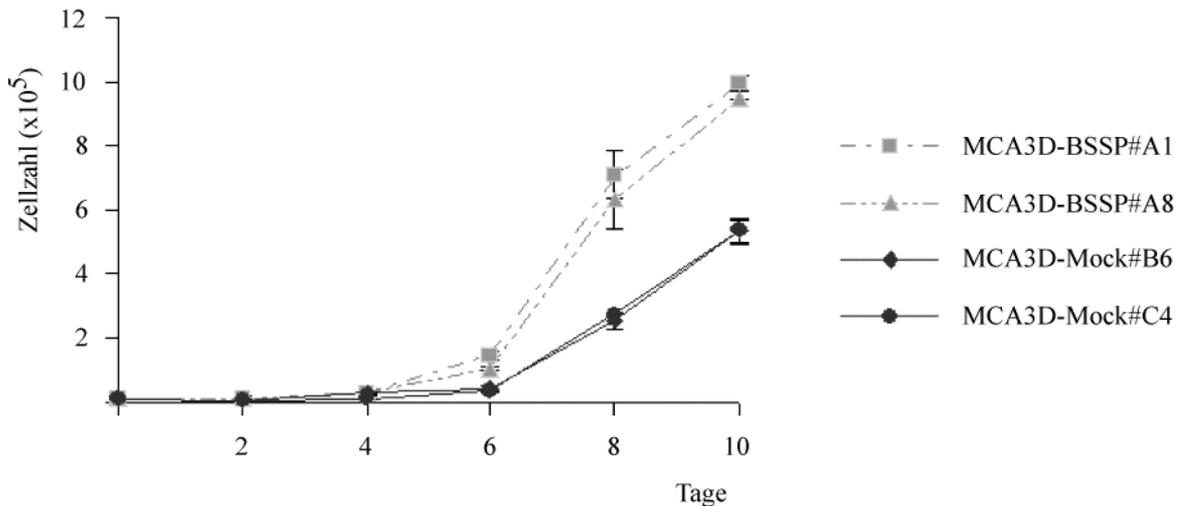


Abb. 18: Verstärktes Wachstum von BSSP-exprimierenden Keratinozyten.

Für die Erstellung einer Wachstumskurve wurde eine definierte Anzahl von Keratinozyten auf Kulturschalen ausplattiert und alle zwei Tage die Zellzahl bestimmt. Verglichen wurde über einen Zeitraum von zehn Tagen das Wachstum der Kontrollklone MCA3D-Mock#B6 und MCA3D-Mock#C4 sowie der BSSP-exprimierenden Klone MCA3D-BSSP#A1 und MCA3D-BSSP#A8. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren, unabhängigen Experiment bestätigt.

Die Untersuchungen zeigten, dass zunächst das Wachstumsverhalten der Kontrollen und der BSSP-exprimierenden Klone identisch ist. Erreichten die Zellen jedoch das Stadium einer konfluenten Zellschicht, die ihnen eine zunehmende Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten ermöglichte, kam es bei den BSSP-exprimierenden Keratinozyten im Gegensatz zu den Kontrollen zu einer kontinuierlichen Zunahme der Zellzahl. Somit scheint BSSP zumindest in Keratinozyten, direkt oder indirekt an Prozessen der Zell-Zell-Adhäsion und Kontaktinhibition beteiligt zu sein.

3.3.5 Einfluss von BSSP auf die Migration von Keratinozyten

Die Hemmung der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion ist eine wesentliche Voraussetzung für die Invasion und die Metastasierung von Karzinomen. Eine Reihe von Studien belegen, dass E-Cadherin die Motilität von Zellen reguliert und deren invasives Verhalten unterdrückt (Chen et al., 1997; Handschuh et al., 1999). Möglicherweise können die beobachteten Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte in BSSP-exprimierenden Keratinozyten einen Einfluss auf die Migration der Zellen ausüben. Weiterhin wird die Bewegung von Zellen auf Matrixmolekülen durch ein komplexes Zusammenspiel von Integrinen, die den Kontakt zum Substrat herstellen, und Proteasen, die die Adhäsion an das Substrat rückgängig machen, gesteuert (Ivaska and Heino, 2000). Um zu untersuchen, ob BSSP für die Migration von Zellen von Bedeutung ist, wurden *in vitro*-Migrationsexperimente durchgeführt. Um auszuschließen, dass mögliche Effekte auf Proliferationsunterschiede zwischen den Zellen zurückzuführen sind, wurden die Zellen mit Mitomycin C, das die DNA-Replikation hemmt, präinkubiert (Kap. 2.2.5.6; Abb. 19).

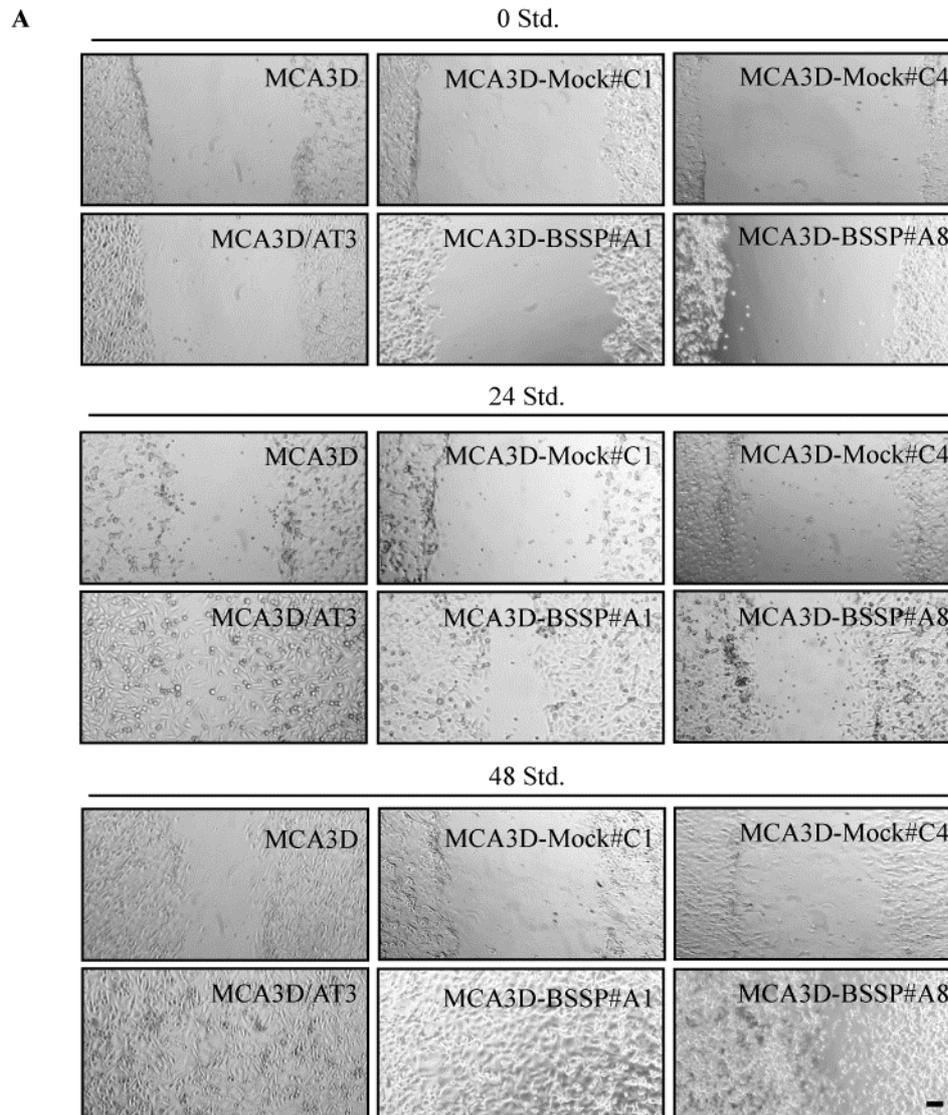


Abb. 19: Erhöhte Migration von BSSP-exprimierenden Keratinozyten.

(A): Nach der Inhibition der Proliferation der zu untersuchenden Keratinozyten durch Mitomycin C-Behandlung (20 ng/ml) wurde eine Pipettenspitze durch den konfluenten Zellrasen gezogen (Zeitpunkt 0 Std.) und untersucht, wie schnell die Lücke durch die migrierenden Zellen wieder geschlossen wurde. Die Migration der parentalen Zelllinie MCA3D, der Kontrollklone MCA3D-Mock#B6 und MCA3D-Mock#C4 sowie der BSSP-exprimierenden Klone MCA3D-BSSP#A1 und MCA3D-BSSP#A8 wurde nach 24 Std. und 48 Std. photographisch dokumentiert. Als Positivkontrolle wurde die tumorogene Keratinozytenzelllinie MCA3D/AT3 verwendet, die durch ausgeprägte Motilität gekennzeichnet ist. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei durchgeführten Migrationsstudien.

(Skalierung: 200 μ m).

Bei den migrierende Zellen der tumorigenen Zelllinie MCA3D/AT3, die als Kontrolle dienten, kam es bereits nach 24 Std. zu einer kompletten Wiederbesiedlung der freien Fläche. Während der Spalt von den Kontrollklonen und den MCA3D-Keratinozyten nur minimal geschlossen wurde, stellten die BSSP-exprimierenden Klone in einem Zeitraum von etwa 48 Std. den Zellrasen komplett (MCA3D-BSSP#A1) oder nahezu komplett (MCA3D-BSSP#A8) wieder her. Die quantitative Auswertung der mikroskopisch

dokumentierten Migration belegte die Aussage, dass die Expression von BSSP die Migration von Keratinozyten fördert (Abb. 19 B).

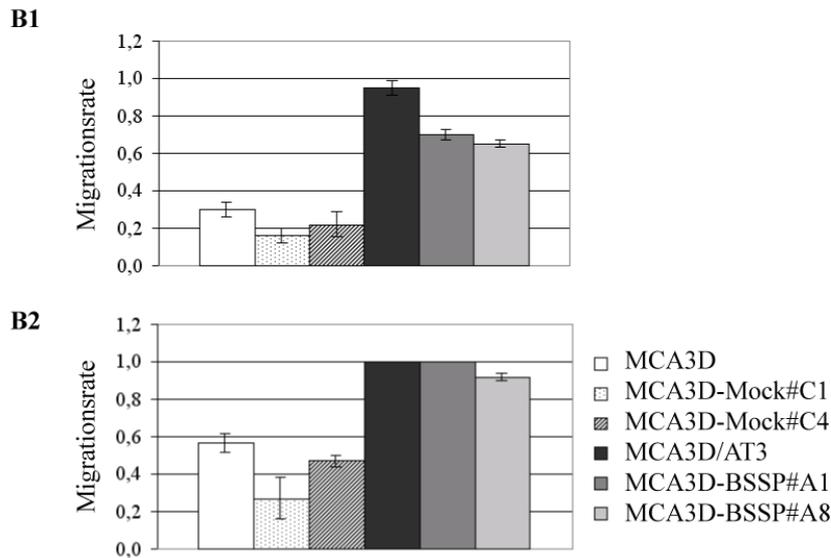


Abb. 19: Erhöhte Migration von BSSP-exprimierenden Keratinozyten.

(B): In dem Diagramm ist die Quantifizierung der *in vitro*-Migrationsstudie für die Zelllinien MCA3D, MCA3D-Mock#C1, MCA3D-Mock#C4, MCA3D/AT3, MCA3D-BSSP#A1 und MCA3D-BSSP#A8 dargestellt. Der Abstand zwischen der wandernden Zellfront wurde an drei unterschiedlichen Stellen des Spaltes nach 0 Std., d.h. direkt im Anschluss an die Erzeugung des Spaltes, nach 24 Std. (B1) und nach 48 Std. (B2) vermessen. Alle Abstände ausgehend von der Spaltgröße zum Zeitpunkt 0 Std. wurden normalisiert, der komplette Verschluss des Spaltes durch die Zellen gleich 1 gesetzt und die Mittelwerte samt Standardabweichungen des anteilig geschlossenen Spaltes errechnet. Die Abbildung zeigt die Quantifizierung eines repräsentativen Experimentes von insgesamt drei durchgeführten Migrationsstudien.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Expression von BSSP in den nicht-tumorigenen MCA3D-Keratinozyten zu einer veränderten Morphologie, zu einer verstärkten Zelldichte und zu einer erhöhten Migration der Zellen führt. Als mögliche Ursache dafür kommt die reduzierte Zell-Zell-Adhäsion in Betracht, die mit einer Reorganisation von E-Cadherin korreliert.

3.3.6 Expression von BSSP in der Wundheilung der Haut

Die Migration von Zellen ist essentiell für Prozesse wie Embryonalentwicklung, Inflammation, Angiogenese, Invasion von Tumoren und Wundheilung. Nach einer Verwundung der Haut wandern die Keratinozyten vom Wundrand in die offene Wundfläche ein, damit das Epithel an der verletzten Stelle wiederhergestellt wird (Reepithelialisierung). Um sich ihren Weg zwischen dem Fibrinpfropf und der Matrix zu bahnen, produzieren die Keratinozyten Proteasen, die die Bestandteile der ECM abbauen (Li et al., 2003; Parks, 1999; Xue et al., 2004). Ob BSSP ebenfalls im Wundheilungsprozess, z.B. im Rahmen der Reepithelialisierung, exprimiert wird, wurde durch RT-PCR-Analyse von mRNA aus Wunden untersucht, die zu definierten Zeitpunkten auf dem Rücken von Mäusen erzeugt worden waren. Es zeigte sich, dass BSSP bereits 6 Std. nach der Verwundung leicht induziert wurde. Eine konstante, deutlich erhöhte Expression dauerte von etwa Tag 1 bis Tag 7 an, um dann wieder auf das Basalniveau vergleichbar mit unverwundeter Maushaut zurückzugehen (Abb. 20).

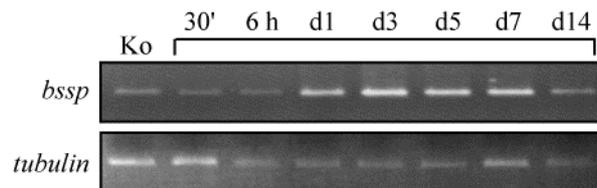


Abb. 20: Induktion von BSSP im Wundheilungsprozess der Haut.

Aus RNA von Wunden wurde nach 30 min (30'), 6 Std. (6 h), 1 Tag (d1), 3 Tagen (d3), 5 Tagen (d5), 7 Tagen (d7) und 14 Tagen (d14) cDNA synthetisiert. RT-PCR-Analysen wurden mit *bssp*-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Als Kontrolle wurde cDNA aus unverwundeter Maushaut verwendet (Ko). Die Überprüfung der cDNA-Qualität sowie deren Quantität erfolgte mit β -*tubulin*-spezifischen Oligonukleotiden.

Informationen über die genaue Lokalisation des BSSP-Proteins lieferten Immunfluoreszenz-Studien auf Kryoschnitten von Wunden, die einen Tag, 3 Tage, 5 Tage, 7 Tage oder 10 Tage nach der Verwundung der Rückenhaut von Mäusen hergestellt worden waren. Während sich an Tag 1 nach Verwundung noch keine spezifische Expression auf Proteinebene zeigte, konnte an Tag 3 das BSSP-Protein sowohl am Wundrand als auch in den in die Wunde einwandernden Keratinozyten nachgewiesen werden (Abb. 21). An Tag 5 konnte BSSP nicht mehr im Wundbett, sondern nur noch im Randbereich der Wunde und an Tag 7 in der Epidermis der bereits geschlossenen Wunde detektiert werden.

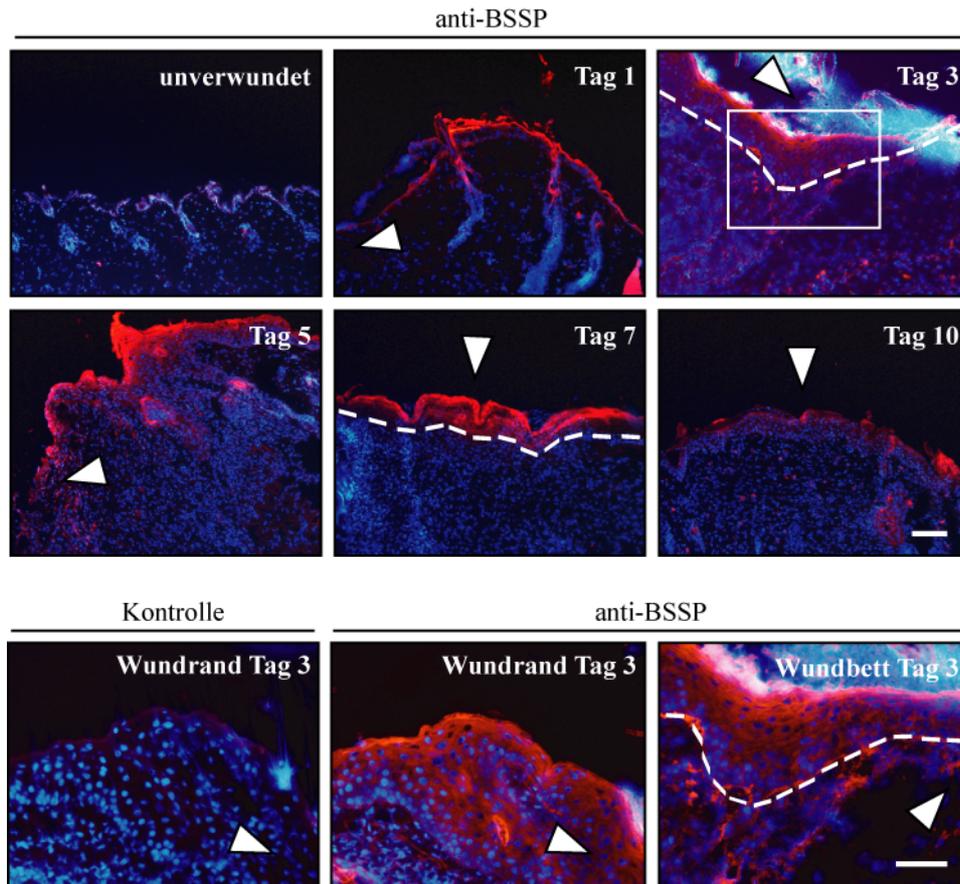


Abb. 21: Expression des BSSP-Proteins im verwundeten Gewebe der murinen Haut.

Aus Wunden von Mäusen wurde nach einem Tag, 3 Tagen, 5 Tagen, 7 Tagen und 10 Tagen Kryoschnitte angefertigt und mit dem BSSP-spezifischen anti-MSP-Antikörper (anti-BSSP) die Expression von BSSP im Wundgewebe untersucht. Als Kontrollen dienten Gewebeschnitte von unverwundeter Maushaut (unverwundet) und als Kontrolle für die Antikörperspezifität wurde nur der Sekundärantikörper eingesetzt (Kontrolle). Die weissen Pfeilspitzen markieren die Lokalisation der offen bzw. der bereits geschlossenen Wunde. Die gestrichelte, weisse Linie weist exemplarisch in einigen Abbildungen auf die Lokalisation der Basalmembran hin. (Skalierung: 200 bzw. 100 μm).

Folglich wird BSSP nicht nur im Prozess der Hautkarzinogenese, sondern auch im Wundheilungsprozess exprimiert. Bei beiden Vorgängen stellt die durch BSSP bedingte Veränderung der E-Cadherin-Lokalisation und damit der Zell-Zell-Adhäsion ein wichtiger Parameter dar, der Zellwachstum und Migration beeinflussen kann.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung neuer Tumor-assoziiierter Gene

Bei der Tumorentstehung handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, bei dem genetische und epigenetische Veränderungen für den Übergang von einer normalen Zelle zu einer malignen Tumorzelle verantwortlich sind (Compagni and Christofori, 2000). Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, neue Tumor-assoziierte Gene zu identifizieren, die an der epithelialen Tumorgenese beteiligt sind. Anhand des Mausmodells der chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese war es möglich, die differentielle Genexpression in den einzelnen, voneinander abgrenzbaren Stadien der Tumorentstehung, wie Initiation, Promotion und Progression (Kap. 1.1.2), näher zu charakterisieren und anhand dieser Informationen Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu ziehen. Der Vorteil des murinen Systems besteht darin, dass alle Stadien für eine Analyse vorliegen. Dagegen stehen bei humanem Tumormaterial meist späte Stadien in begrenzten Mengen zur Verfügung, da die Anamnese und die frühzeitige Diagnose auf histologische Befunde beschränkt und deshalb mit einer Reihe von Schwierigkeiten verbunden sind (Kap. 1.1.1). Die Übertragbarkeit des murinen *in vivo*-Modellsystems auf den Menschen konnte bereits in einer Vielzahl von Studien belegt werden, die zeigen, dass der mehrstufige Prozess der Tumorentstehung sowie die beobachteten Veränderungen im Expressionsmuster auch für die humane Karzinogenese gelten (Lu et al., 2001; Mukthar et al., 2004) (Kap. 1.1.2). Demnach handelt es sich bei der chemisch induzierten Hautkarzinogenese der Maus um ein humanpathologisch relevantes Modell, das sich für die Analyse der stadienspezifischen Genexpression in menschlichen Tumoren eignet.

Um Veränderungen im Genexpressionsprofil der experimentell induzierten Karzinogenese der Maushaut unter optimierten Bedingungen zu untersuchen, wurde eine Kombination aus SSH zusammen mit reverser *Northern blot*-Analyse und cDNA-*Microarray*-Studie durchgeführt (Breitenbach et al., 2001; Schlingemann et al., 2003; Hummerich et al., 2004b; Manuskript eingereicht). Auf diese Weise lassen sich die Vorteile des *Microarrays* sowie des SSH-Ansatzes miteinander verbinden, da sowohl eine grosse Anzahl von Genen überprüft als auch auch Transkripte geringerer Expressionsstärke erfasst werden konnten.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Validierung der Daten aus der *Microarray*-Analyse sowie auf die Charakterisierung von Kallikrein-Proteasen, insbesondere von BSSP/hK6, deren Bedeutung im Karzinogeneseprozess sowohl durch die SSH- als auch durch die *Microarray*-Methode erfasst wurde. Die Verwendung zweier grosser cDNA-Arrays, des 20 k *LION ArrayTAGsTM* (Lion Biosciences) und des 15 k NIA (*National Institute of Ageing*)-*Microarrays*, ermöglichte die Untersuchung von insgesamt 6545 auswertbaren cDNA-Klonen. In einem sogenannten *scatter plot* (Verteilungsdiagramm), der anhand einer Regressionsgeraden die Vergleichbarkeit der Expressionsdaten beider *Arrays* angibt, konnte für annotierte Gene mit signifikant veränderter Genexpression in PEK (Plattenepithelkarzinomen) eine deutliche Korrelation zwischen den Daten des NIA- und des *LION ArrayTAGTM*-*Microarrays* festgestellt werden (Hummerich et al., 2004b; Manuskript eingereicht). Die Qualität und die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Resultate wurden demnach durch die vergleichbaren Expressionsdaten der Gene, die auf beiden *Arrays* vorhanden waren, belegt. Ausserdem wurde die differentielle Expression ausgewählter Gene durch semi-quantitative und quantitative RT-PCR sowie durch *in situ*-Hybridisierung im Rahmen dieser Arbeit und in vorausgegangenen Studien nachgewiesen (Breitenbach et al., 2001; Gebhardt et al., 2002; Schlingemann et al., 2003). Für einige im *Microarray* identifizierte Gene, wie z.B. Cyclin D1 und Gene der S100-Familie, wurde bereits gezeigt, dass sie funktionell in der epidermalen Karzinogenese eine Rolle spielen (Rodriguez-Puebla et al., 1999; Eckert et al., 2004), was ebenfalls die Verlässlichkeit der Ergebnisse aus dem *Micoarray* bestätigte. Entsprechend dem Ziel dieser Arbeit befanden sich unter den differentiell exprimierten Genen auch bekannte und unbekannte cDNA-Klone, die bislang noch nicht mit Tumorentstehung assoziiert worden waren. Solche Tumor-assoziierte Gene stellen einen möglichen Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen und für die Entwicklung neuer Tumormarker dar.

Um aus den erhaltenen Datenmengen der *Microarray*-Analyse molekulare Mechanismen für die Entstehung epidermaler Neoplasien ableiten zu können, wurden verschiedene Computer-gestützte Analysen durchgeführt. Mittels der *Software* EASE (*expression analysis systematic explorer*) konnten die identifizierten Gene einzelner Tumorstadien in funktionelle Klassen eingeteilt werden. TPA-Applikation stimuliert beispielsweise die Expression von Genen, die in der Immun- und Stressantwort sowie in der Wundheilung, z.B. *slpi* (*secretory leukocyte protease inhibitor*), eine Rolle spielen (Ashcroft et al., 2000; Ward and Lentsch, 2002). Da sich das Stadium der Tumorpromotion durch Hyperplasie und Entzündung auszeichnet (Kap. 1.1.2), bestätigten die Resultate der EASE-Analyse die Qualität der *Microarray*-Studie. Im weiteren Verlauf der Karzinogenese wurden diese Gene herunterreguliert, was die Suppression der Immunantwort gegenüber dem Tumor widerspiegelt. Weiterhin wurde im Stadium des

benignen Papilloms eine verstärkte Expression Katabolismus- und Apoptose-assoziiierter Gene festgestellt, z.B. von *pgk 1* (*phosphoglyzeratkinase 1*) und *bcl-10* (*B-cell leukemia/lymphoma 10*). Die Induktion von Genen, die für Proteine der Glykolyse kodieren, steht im Einklang mit einem historischen Phänomen, dem sogenannten „Warburg Effekt“, der eine erhöhte Glykolyserate in Tumorzellen beschreibt (Zu and Guppy, 2004). Demgegenüber schien die durch EASE-Analyse beobachtete Induktion von Genen, die an der Apoptose beteiligt sind, dem aktuellen Konzept der Apoptoseblockade in Tumoren zu widersprechen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen konnten jedoch in PEK apoptotische Zellen identifiziert werden (Stern et al., 1997). Programmierter Zelltod kann dabei ein Zeichen endogener Mutagenität und genomischer Instabilität sein. Die in späten Stadien der Tumorgenese induzierten Gene, die in der Regulation des Zellzyklus und der Proliferation (z.B. Zykline) involviert sind, unterstützten die Hypothese, dass die Entstehung epidermaler Tumore massgeblich auf vermehrtem Wachstum und Expansion der Zellen, jedoch nicht auf der Inhibition der Apoptose, basiert.

Die Anwendung des SOM (*self organizing maps*)-Algorithmus ermöglichte die Gruppierung von Genen entsprechend ihres Expressionsprofils. Genprodukte, die ähnliche Funktionen besitzen oder Bestandteil des gleichen Signalweges sind, zeigen in den verschiedenen Stadien der Tumorgenese eine Koregulation und können demzufolge durch die SOM-Analyse einer gleichen Gruppe, einem sogenannten *Cluster*, zugeordnet werden. Zwei Gene, die in allen drei experimentell analysierten Stadien induziert vorlagen, waren *crabp2* (*cellular retinoic acid binding protein*) und *lcn2* (*lipocalin-2*) (Abb. 4). Die CRABP-Proteine können Synthese, Abbau und die Konzentration der verfügbaren Retinsäure im Zytoplasma kontrollieren (Donovan et al., 1995). Es konnte bereits gezeigt werden, dass *crabp2* in PEK und Keratoakanthomen konstitutiv hochreguliert ist (Vahlquist et al., 1996). Ebenso vermag *Lcn2* als extrazellulärer Transporter lipophiler Moleküle, die Verfügbarkeit von Retinsäure und Fettsäuren zu regulieren (Flower, 1994). Die Koregulation beider Gene deutet auf die Beteiligung des Vitamin A-Metabolismus bzw. der Retinsäure vermittelten Genexpression bei der Hautkarzinogenese hin. *NGAL* (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), das humane Homolog zu *lcn-2*, wird in pathologischen Hautveränderungen wie Psoriasis und PEK, die mit einer gestörten Differenzierung einhergehen, verstärkt exprimiert (Mallbris et al., 2002). Lipocaline wurden auch mit anderen Tumoren in Verbindung gebracht, jedoch bleibt ihre genaue Funktion ungeklärt (Bratt, 2000). Weiterhin liefert die Bestimmung koregulierter Gene durch die SOM-Analyse die Basis für die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die für die stadienspezifische Expression Tumor-assoziiierter Gene verantwortlich sind. Insbesondere AP-1 und NF- κ B nehmen eine zentrale Rolle in der Hautkarzinogenese ein (Young et al., 2003). Ein Vergleich der regulatorischen Elemente in der Promotorregion von Genen eines SOM-Clusters kann zur Identifizierung weiterer Transkriptionsfaktoren

beitragen, die über die Interaktion mit AP-1 und NF- κ B oder durch einen unabhängigen Mechanismus an der neoplastischen Transformation epidermaler Zellen mitwirken.

Ziel der FACT (*flexible annotation and correlation tool*)-Analyse war es, die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihrer chromosomalen Lokalisation in einzelne Gruppen bzw. *Cluster* einzuteilen. Auf diese Weise können chromosomale Aberrationen identifiziert werden, die möglicherweise mit der epithelialen Karzinogenese in Zusammenhang stehen. Sowohl die Resultate der FACT- als auch der EASE-Analyse deuteten darauf hin, dass einige Gene der EDC (*epidermal differentiation complex*)-Region auf dem humanen chromosomalen Lokus 1q21 im Verlauf der Tumorgenese der Haut dereguliert werden (Hummerich et al., 2004a; Manuskript in Vorbereitung). Der EDC-Komplex umfasst eine Reihe von strukturell und funktionell verwandten Genen, die an der Differenzierung von Keratinozyten beteiligt sind, darunter auch die Familie der S100-Gene (Williams et al., 2002). Die Microarray-Analyse ergab eine Repression von S100a3 und eine Induktion von S100a8 und S100a9 in Papillomen und PEK sowie eine spezifische Hochregulation von S100a6 in PEK, die durch quantitative RT-PCR bestätigt werden konnte (Hummerich et al., 2004a; Manuskript in Vorbereitung). Der Chromosomenabschnitt 1q21 ist durch Rearrangements im Verlauf der Tumorgenese charakterisiert (Schafer et al., 1995) und ist in PEK der Kopf- und Halsregion sowie der Lunge überrepräsentiert (Egeli et al., 2000; Petersen et al., 2000). Grund dafür könnte die hohe Homologierate der einzelnen Gene sein, die die Stabilität des Genlokus durch Chromosomenbrüche und Rekombinationsereignisse gefährdet. Die Kalzium-bindenden Proteine der S100-Familie sind sowohl in Prozesse der Tumorprogression als auch der Tumorsuppression involviert (Heizmann et al., 2002), jedoch war ihre differentielle Expression in der Hautkarzinogenese bislang unbekannt und konnte erstmals in dieser Arbeit nachgewiesen werden (Abb. 7).

Ein funktionelles *Cluster* von Genen, das laut EASE-Analyse in PEK überrepräsentiert ist, steht mit dem Kollagen-Metabolismus in Verbindung, darunter die grosse Gruppe der Proteasen. Für *collagenase-3/mmp-13*, *mt1-mmp/mmp-14* und *gelatinase B/mmp-9*, konnte eine Induktion in murinen PEK festgestellt werden. Weitere Studien belegen, dass PEK der Kopf- und Halsregion eine verstärkte Expression von *collagenase-3/mmp-13* in invasiven Tumorzellen oder in Einzelfällen auch in Stromazellen zeigen (Johansson et al., 1997). Auf mRNA-Ebene wurde *mt1-mmp/mmp-14* in PEK und BZK (Basalzellkarzinome) der Haut detektiert (Kerkela et al., 2001). Ein weiteres Mitglied der Metalloproteasen, *adam8*, wurde mittels *Microarray* in allen Stadien der Hautkarzinogenese als hochreguliert identifiziert (vgl. Abb. 4) und zeigt in RT-PCR-Analysen eine verstärkte Expression in tumorigenen Keratinozyten (vgl. Abb. 6). Die Familie der ADAMs ist an der Freisetzung von Wachstumsfaktoren, der Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen

sowie der Migration beteiligt, so dass eine kritische Funktion bei der Entstehung maligner Tumoren postuliert wird (zur Übersicht vgl. Seals and Courtneidge, 2003). Die Bindung von ADAMs an die Oberfläche von Tumorzellen liefert indirekte Hinweise darauf, dass diese Proteasen das Verhalten von Tumorzellen beeinflussen können. ADAM12 und ADAM15 binden an $\alpha 9\beta 1$ -Integrin der embryonalen Tumorzelle Ntera-2 (Eto et al., 2000) und ADAM15 zusätzlich an $\alpha 5\beta 3$ -Integrin von Melanom-Zellen (Iba et al., 1999; Zhang et al., 1998). Weiterhin ist ADAM17/TACE (*tumour necrosis factor- α -converting enzyme*) an der Transaktivierung des EGFR beteiligt, über dessen Signalweg Proliferation, Migration und Apoptoseinhibition humaner Tumorzellen vermittelt werden (Gschwind et al., 2003; zur Übersicht vgl. Fischer et al., 2003). Für ADAM8 konnte bereits gezeigt werden, dass es sich um ein proteolytisch aktives Enzym handelt, das bei der Zelladhäsion eine Rolle spielt (Schlomann et al., 2002). Diese Beobachtungen weisen auf eine mögliche funktionelle Beteiligung von ADAM8 an dem Prozess der Hauttumorgenese hin.

Einer der in der *Microarray*-Analyse identifizierten Riken-Klone, *rik1200016C12*, zeichnete sich durch erhöhte Expression in allen Stadien der epithelialen Karzinogenese sowie in malignen Keratinozyten aus (vgl. Abb. 4 und Abb. 6). Homologierecherchen ergaben, dass es sich bei dem humanen Ortholog um die Kallikrein-Protease *KLK9* handelt. Die murine Serinprotease *bssp*, deren potentiell humanes Homolog *KLK6* darstellt, wurde zuvor in unserer Arbeitsgruppe durch SSH als TPA-induziertes Gen mit erhöhter Expression in PEK gefunden. In Übereinstimmung mit der Regulation ihrer Expression über Steroide (Borgono and Diamandis, 2004a) wurden die Mitglieder der Kallikrein-Familie bisher hauptsächlich mit hormonabhängigen Tumoren assoziiert. Die Kallikreine *KLK5*, *KLK6*, *KLK7*, *KLK8*, *KLK10*, *KLK11* und *KLK14* sind in Ovarialtumoren (Yousef and Diamandis, 2003b) oder *KLK11*, *KLK14* und *KLK15* in Prostata Tumoren (Diamandis et al., 2002; Yousef et al., 2003d; Stephan et al., 2003) induziert. Demgegenüber wurde eine Herunterregulation der Kallikreine *KLK5*, *KLK6*, *KLK8* und *KLK10* in Brusttumoren (Yousef et al., 2004) und von *KLK2*, *KLK3*, *KLK5*, *KLK6* und *KLK10* in Prostata Tumoren beobachtet (Hakalahti et al., 1993; Petraki et al., 2003; Magklara et al., 2000; Abrahamsson et al., 1988; Pretlow et al., 1991; Yousef et al., 2002b; Luo and Diamandis, 2000). Eine Überexpression von Kallikreinen in Hauttumoren konnte jedoch bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht gezeigt werden.

4.2 KLK6/hK6, das humane funktionelle Homolog zu bssp/BSSP?

Seit einigen Jahren wird kontrovers diskutiert, ob es sich bei *bssp* um das murine Ortholog zu dem humanen *KLK6*-Gen handelt. Matsui et al. (2000), postulierten, dass eine Identität von 88% über die gesamte Sequenz auf Aminosäureebene zwischen BSSP und

MSP (Ratte), jedoch nicht von 67% zwischen hK6 und BSSP für eine Homologie ausreichend ist (Matsui et al., 2000) (vgl. Abb. 22 A, B). Demgegenüber wurde in anderen Studien die Homologie von 67% zwischen hK6 und BSSP als signifikant eingestuft (Yamanaka et al., 1999; Bernett et al., 2002).

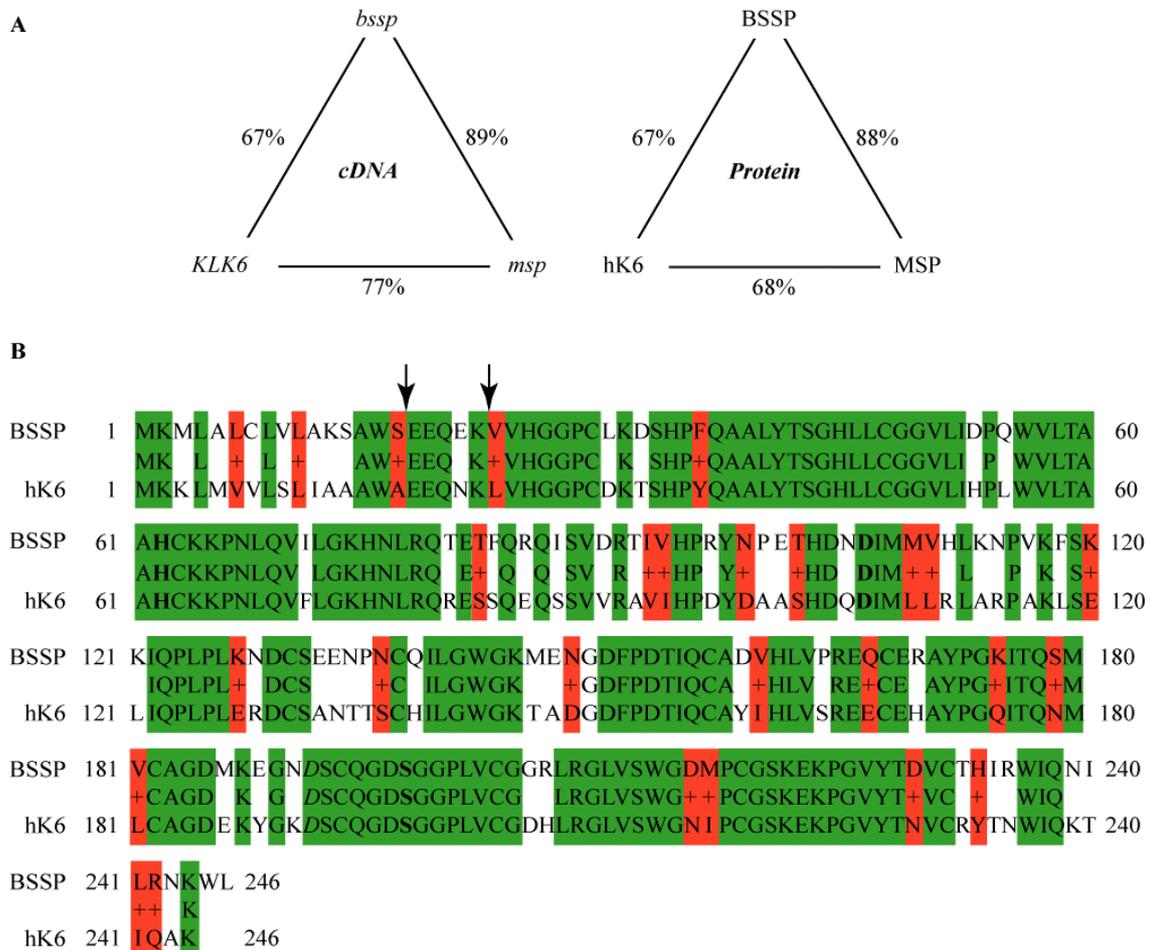


Abb. 22: Homologie zwischen *bssp*/BSSP und *KLK*/*hK6*.

(A): In der Abbildung sind die Ähnlichkeiten von *bssp*/BSSP der Maus, *msp*/MSP der Ratte und *KLK6*/*hK6* des Menschen auf der Ebene der cDNA-Sequenz/Aminosäure-Sequenz in einer Übersicht zusammengestellt.

(B): Die Abbildung zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen von BSSP und hK6. In grün bzw. rot hervorgehoben sind identische bzw. übereinstimmend positiv geladene Aminosäurereste (+). Zwischen den beiden Sequenzen ist die Konsensus-Sequenz dargestellt. Die Pfeile markieren das Ende der Prä-/Prosequenz. Die Aminosäurereste der katalytischen Triade Histidin⁶², Aspartat¹⁰⁶ und Serin¹⁹⁸ sind fett und das Aspartat¹⁸⁹ der sogenannten S1-Bindungstasche ist kursiv hervorgehoben.

In einem im Jahr 2000 erschienenen Artikel, der einen Vergleich der Genome dreier eukaryontischer Modellorganismen, *Drosophila*, *Caenorhabditis* und *Saccharomyces*, präsentiert, wurde gefordert, dass Proteine, die als „verwandt“ klassifiziert werden, mindestens 80% Sequenzidentität besitzen müssen (Rubin et al., 2000). Die Autoren räumen allerdings ein, dass dieser Zahlenwert äusserst stringent ist, da einige bekannte Orthologe, wie Homeobox-Proteine, die ausserhalb der Homeodomäne geringe

Sequenzähnlichkeit besitzen, ausgeschlossen werden. Deshalb ist eine funktionelle Homologie von BSSP und hK6 trotz der vergleichsweise geringeren Identität der Aminosäuresequenzen durchaus denkbar.

Als weitere Parameter für die Homologie zweier Gene in unterschiedlichen Spezies können chromosomale Lokalisation, evolutionäre Abstammung, genomische Organisation, Expression, Regulation und Funktion herangezogen werden. Die identische Abfolge von Genen in einer chromosomalen Region in Maus und Mensch, deren gleiche relative Lage zueinander sowie dieselbe Richtung der Transkription stellen Hinweise für ein gemeinsames Vorläufergen dar. Diese Beobachtungen resultieren daraus, dass die Evolution der Chromosomen durch ein zufälliges Rearrangement von Chromosomenbruchstücken entstanden ist, woraufhin sich die Gene jeweils im Verlauf der Evolution speziesspezifisch weiterentwickelt haben. Einen evolutionär konservierten chromosomalen Abschnitt, eine sogenannte sythenische Region, stellt der murine Kallikrein-Lokus auf Chromosom 7B2 und der humane Genlocus 19q13.4 dar (Abb. 23). Während die Reihenfolge der Gene auf den Chromosomenabschnitten gleich ist, existieren Unterschiede ausschliesslich im Hinblick auf die Grösse des Genlokus und die Anzahl der Paraloge und Pseudogene, die aufgrund von zusätzlichen Genduplikationen entstanden sind (Borgono et al., 2003). Folglich sind *KLK6* und *bssp* höchstwahrscheinlich evolutionär aus einem gemeinsamen Gen hervorgegangen.

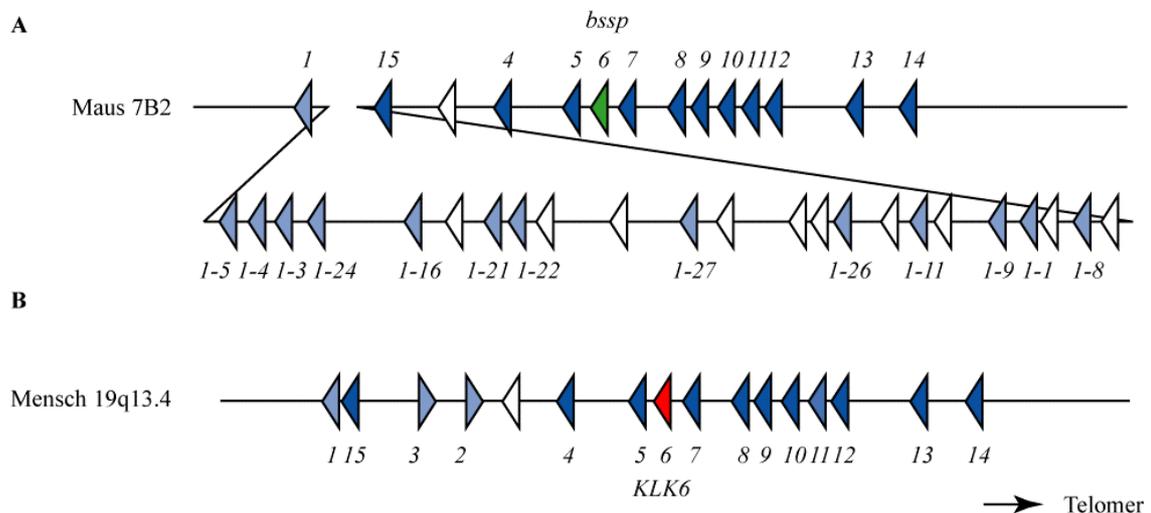


Abb. 23: Organisation des Kallikrein-Genlokus in der Maus (A) und im Menschen (B).

Die Dreiecke symbolisieren die Lage der Gene und ihre Transkriptionsrichtung. Hellblaue Dreiecke stellen die klassischen glandulären Kallikrein-Gene (*KLK1*, *KLK2*, *KLK3*) sowie deren Paraloge in der Maus (*1-5*, *1-4*, *1-3*, *1-24*, *1-16*, *1-21*, *1-22*, *1-27*, *1-26*, *1-11*, *1-9*, *1-1*, *1-8*), dunkelblaue Dreiecke die nicht-klassischen Kallikrein-Gene (*KLK4-KLK15*) und weisse Dreiecke Kallikrein-Pseudogene dar. Das grüne bzw. das rote Dreieck symbolisiert die Lokalisation des *bssp*- bzw. des *KLK6*-Gens. Die offizielle Nomenklatur der Gene wurde auf die jeweiligen Nummern reduziert. Die Darstellung erfolgte nicht massstabsgetreu.

(nach Borgono et al., 2003).

Die genomische Organisation von *bssp* und *KLK6* zeichnet sich durch eine Reihe gemeinsamer charakteristischer Besonderheiten aus, die die Verwandtschaft beider Gene deutlich machen (Abb. 24).

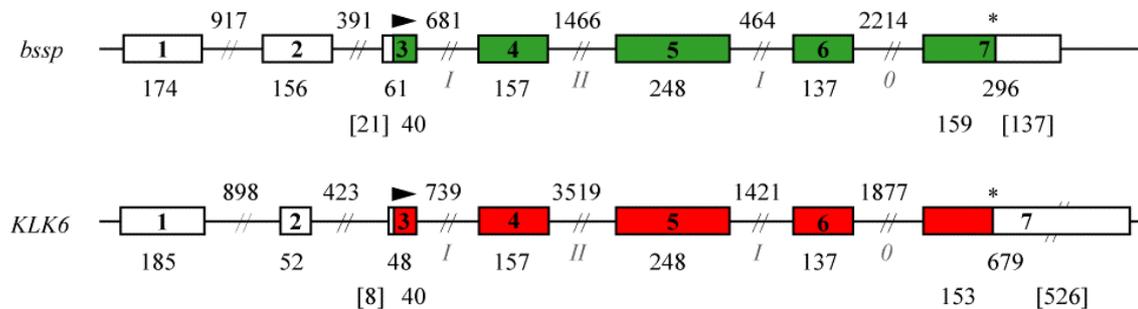


Abb. 24: Genomische Organisation der Gene *bssp* und *KLK6*.

Die nicht-kodierende Region der Gene ist in weiss und die kodierende Region in grün (*bssp*) bzw. rot (*KLK6*) abgebildet. Die Zahlen unter den als Kästchen dargestellten Exons 1 bis 7 geben die Länge der Exons, während die Zahlen über den durch Striche symbolisierte Introns die Längen der Introns in [bp] angibt. In Kursivschrift sind die Intronphasen gezeigt. Das schwarze Dreieck markiert das Startkodon in Exon 3 und der Stern das Stopkodon in Exon 7.

Beide Gene besitzen zwei nicht-kodierende Exons in der 5'-Region sowie fünf kodierende Exons identischer oder nahezu identischer Grösse, die durch Introns gleicher Phasen (I – II – I – 0) unterbrochen werden. Auf Proteinebene sind sowohl bei BSSP als auch bei hK6 die Positionen für die Aminosäuren der katalytischen Triade Histidin⁶², Aspartat¹⁰⁶ und Serin¹⁹⁸ konserviert (Abb. 22 B). Beide Proteine werden als Prä-/Pro-Enzyme mit einem Signalpeptid von 16 Aminosäuren und dem Aktivierungspeptid von 5 Aminosäuren synthetisiert. Insgesamt besteht BSSP aus 246 Aminosäuren bzw. hK6 aus 244 Aminosäuren. Hinsichtlich ihrer Aktivität können hK6 und BSSP als Trypsin-ähnliche Proteasen bezeichnet werden, was aus dem Aspartat¹⁸⁹ in der sogenannten S1-Bindungstasche sechs Positionen vor dem katalytischen Serin hervorgeht (Perona and Craik, 1995) (Abb. 22 B). Die experimentelle Untersuchung der Substratspezifitäten *in vitro* ergab, dass sowohl BSSP als auch hK6 in der Lage sind, Casein und Fibronectin katalytisch zu spalten (Magklara et al., 2003; Matsui et al., 2000). Die Degradation von Gelatine durch hK6 wurde bisher nicht untersucht, aber da hK6 Kollagen Typ I und Typ IV hydrolysiert (Magklara et al., 2003), ist die Spaltung von Gelatine, der denaturierten Form von Kollagen, ebenfalls wahrscheinlich. Weiterhin zeigte die Blockierung der Substratumsetzung mit Hilfe von Inhibitoren, dass beide Enzyme vornehmlich durch SBTI (*soybean trypsin inhibitor*), aber auch durch Benzamidin in ihrer hydrolytischen Aktivität gehemmt werden konnten (Magklara et al., 2003; Matsui et al., 2000). Beide Proteasen weisen demnach nicht nur ähnliche Präferenzen bzgl. Substraten auf, sondern sie können auch durch gleiche Substanzen in ihrer enzymatischen Aktivität inhibiert werden. Eine Übersicht über die Proteasen BSSP und hK6 in Hinsicht auf ihre Spezifität, potentielle Substrate und posttranslationale Regulation liefert die Tabelle 6 (Tab. 6).

Tab. 6: Spezifität, Substrate und Regulation von BSSP und hK6.

Die Pfeile markieren die Schnittstelle innerhalb des Pro-Enzyms.

Abkürzungen: *soybean trypsin inhibitor*, SBTI; Extrazelluläre Matrix, ECM

<i>Protease</i>	<i>Pro-Peptid Schnittstelle</i>	<i>ECM Substrate</i>	<i>Inhibitoren</i>	<i>Literaturnachweis</i>
BSSP	K ⁵ ↓V ⁶	Gelatine, Casein, Fibronectin	SBTI, Benzamidin, Aprotinin, Leupeptin, Antipain	(Matsui et al., 2000)
hK6	K ⁵ ↓L ⁶	Kollagen I und IV, Fibonektin, Laminin, Fibrinogen	Antithrombin III, SBTI, Benzamidin	(Borgono et al., 2003)

Sowohl *bssp* als auch das humane *KLK6* werden im Zentralnervensystem exprimiert und zwar insbesondere in der Medulla Oblongata sowie im Cerebellum (Matsui et al., 2000; Scarisbrick et al., 1997). Die für *KLK6* beobachtete Expression in Herz, Leber, Testis, Milz und Niere konnte für BSSP bislang nicht bestätigt werden, was jedoch durch die unterschiedliche Sensitivität der jeweils verwendeten Nachweismethoden erklärt werden kann (Meier et al., 1999; Yousef et al., 1999). In der gesunden Haut wurde die Expression von *KLK6* im Vergleich zu anderen Kallikreinen als moderat eingestuft und durch *in situ*-Hybridisierung im Bereich des *Stratum granulosum*, der Haarfollikel und der Talgdrüsen lokalisiert (Komatsu et al., 2003). Äusserst geringe Mengen des BSSP-Transkriptes konnten ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie in weiteren Expressionsstudien in den Haarfollikeln der Haut detektiert werden (Meier et al., 1999). Die Induktion von *KLK6* in Ovarialkarzinomen und in primären Brusttumoren (Anisowicz et al., 1996; Diamandis et al., 2000a) (Tab. 9 im Anhang) deutet auf ein Tumor-assoziiertes Expressionsmuster der Kallikrein-Protease hin. Damit übereinstimmend zeichnen sich BSSP und hK6 den Analysen dieser Arbeit zufolge auch durch eine Induktion in der Hautkarzinogenese aus (Kap. 3.2). Das Expressionsprofil der murinen und der humanen Protease zeigt demnach, insbesondere im Zentralnervensystem, in der Haut und in Tumoren, eine Reihe von Gemeinsamkeiten. Für *KLK6* konnte eine TPA-vermittelte Induktion in SCL-I-Zellen und für *bssp* in der murinen Haut nachgewiesen werden (Abb. 9; Daten nicht gezeigt). Zudem zeichnen sich beide Gene durch eine Ras-Abhängigkeit aus (Ignatenko et al., 2004; Daten nicht gezeigt). Die Befunde weisen auf einen ähnlichen transkriptionellen Regulationsmechanismus der beiden Gene hin.

Die aufgeführten Charakteristika bzgl. Homologie, chromosomaler Lokalisation, genomischer Organisation, enzymatischer Aktivität, Expression und Regulation von *KLK6* und *bssp* unterstützen die Hypothese, dass es sich bei beiden Proteasen um Orthologe handelt. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die Enzyme in den beiden Spezies vergleichbare Funktionen erfüllen. Neben den in dieser Arbeit angewandten *in vitro*-Untersuchungen ist die Analyse von Mausmodellen, die sich durch eine BSSP-

Überexpression oder BSSP-Defizienz auszeichnen, von grosser Bedeutung für die Aufklärung der bislang weitgehend unbekanntem Funktion von *KLK6*/hK6 im Menschen.

4.3 BSSP/hK6, ein neuer Marker für epitheliale Tumore?

Ausgehend von der BSSP-Expression in murinen Papillomen und PEK konnte die Induktion des humanen Orthologs *KLK6*/hK6 in Keratoakanthomen, PEK und BZK verschiedener Patienten auf Nukleinsäure- und Proteinebene festgestellt werden (Abb. 8, Abb. 9 und Abb. 10). Weiterhin wurde eine Überexpression von *KLK6* in Melanomen der Haut, in Ovarialtumoren, in Vulvatumoren und in gastrointestinalen Tumoren des Magens, Dünndarms, Dickdarms und Enddarms gezeigt (vgl. Abb. 12). Demgegenüber steht interessanterweise eine verglichen mit dem Normalgewebe reduzierte Expression in Brust- und Nierentumoren (vgl. Abb. 3.10). Die Tatsache, dass eine differentielle Expression von *KLK6* in einigen epithelialen Tumoren bereits beschrieben wurde, unterstützt die Beobachtungen. Während *KLK6* im Gewebe metastasierender Brusttumoren herunterreguliert ist, zeigen Ovarialtumore insbesondere in fortgeschrittenen Stadien eine hK6-Überexpression, die mit einer schlechten Prognose für die Patientinnen einhergeht (Tanimoto et al., 2001; Hoffman et al., 2002) (vgl. Tab. 9 im Anhang). Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge ist *KLK6* einerseits in Nierenzellkarzinomen herunterreguliert und andererseits in verschiedenen Tumoren des Darms und in der kolorektalen Adenokarzinomlinie SW480 hochreguliert (Abb. 12). Bestätigt wird letztere Beobachtung dadurch, dass *KLK6* nicht nur aus der humanen COLO 201 Kolonadenokarzinom-cDNA-Bibliothek kloniert wurde (Yamashiro et al., 1997), sondern auch in der Caco-2 Kolonkarzinomlinie nach Transformation mit Ki-ras gegenüber der Ausgangszelllinie induziert vorliegt (Ignatenko et al., 2004). Die Ras-abhängige Expression konnte auch für das murine Ortholog *bssp* beobachtet werden. Während in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten parentalen MCA3D-Keratinocyten kein *bssp*-Transkript nachweisbar war, wurde nach *ras*-Transfektion dieser Linie das *bssp*-Gen in den sogenannten MCA3D/AT3-Keratinocyten angeschaltet (Daten nicht gezeigt). Da Mutationen im *ras*-Onkogen ein zentrales Ereignis bei der Entstehung von NMSC (vgl. Kap. 1.1.3) und von Kolonkarzinomen (zur Übersicht vgl. Grady and Markowitz, 2002) darstellen und in 30-50% aller beobachteten Fälle vorliegen (Rodenhuis, 1992; Barbacid, 1990; Breivik et al., 1994), ist damit möglicherweise die konstitutive Aktivierung der *KLK6*-Expression in bereits frühen Stadien der Tumorgenese verbunden. Eine frühzeitige Induktion von BSSP/hK6 im Karzinogeneseprozess belegt auch die Expression von BSSP in benignen Papillomen der Maus (Abb. 9), von *KLK6* in Keratoakanthomen (Abb. 8 und Abb. 10 B) und in Psoriasis (Gan et al., 2000). Bei Psoriasis handelt es sich um eine pathologische Veränderung der Haut, die analog zur Hautkarzinogenese mit einer Hyperproliferation epidermaler Keratinocyten einhergeht. Zwischen Parakeratosen, einer möglichen Vorstufe

für die Entstehung eines PEK, und psoriatischer Haut bestehen eine Reihe von Gemeinsamkeiten im Expressionsprofil (Hivnor et al., 2004), was auf die Aktivierung von Genen hindeutet, die die Grundlage für die Ausbildung eines Tumors schaffen. Deshalb könnte man sich eine Hochregulation von *bssp/KLK6* bereits in präkanzerogenen Läsionen der Haut, die sich optisch gut von Psoriasis oder anderen Hautveränderungen unterscheiden lassen, für die Etablierung eines Tumormarkers zunutze machen.

Immer mehr experimentelle Anhaltspunkte belegen, dass die Kallikreine möglicherweise Teil einer enzymatischen Kaskade darstellen, über die sie ihre Funktion geltend machen. Hinweise darauf liefert u.a. die Koexpression einer Reihe von Kallikreinen in verschiedenen Geweben und die kollektive transkriptionelle Regulation über Steroidhormone (Yousef and Diamandis, 2002). Zudem wurde die katalytische Spaltung der Pro-Form der Kallikreine durch andere Familienmitglieder bereits mehrfach bewiesen, z.B. vermag hK5 Pro-hK7 in der Haut zu aktivieren (Brattsand and Egelrud, 1999) genauso wie hK2, hK4 und hK15 Pro-hK3 in hK3 umwandeln können (Takayama et al., 1997; Takayama et al., 2001a; Takayama et al., 2001b). Voraussetzung für den Ablauf einer funktionellen Kaskade der Kallikreine ist dabei deren gemeinsame Regulation. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, zeichnen sich epidermale Tumore nicht ausschliesslich durch eine Überexpression von BSSP bzw. hK6, sondern auch von *rik1200016C12* (Abb. 4) bzw. *KLK9* (Abb. 8) aus. In PEK wurde zudem eine Induktion von *KLK8/neurospine* festgestellt (Kuwaie et al., 2002). Interessanterweise wurde eine gemeinsame Induktion von *KLK6* und von *KLK9* in Proben von Psoriasispatienten und eine gemeinsame Hochregulation dieser beiden Gene, von *KLK8* und einer Reihe von weiteren Kallikreinen in Ovarialtumoren beobachtet (Gan et al., 2000; Hoffman et al., 2002; Yousef et al., 2003b). Diese Befunde deuten auf eine parallele Aktivierung der einzelnen Mitglieder im Verlauf der Progression von Tumoren hin (Yousef and Diamandis, 2002). Tatsächlich konnte eine Induktion der Expression von *rik1200016C12* auch in den stabilen BSSP-exprimierenden Keratinozyten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass die Mitglieder einer Kaskade sich unter Umständen gegenseitig über einen indirekten Mechanismus auf Transkriptionsebene aktivieren können, um den vollständigen Ablauf der Kaskade und damit die Ausübung einer Funktion zu garantieren. Als potentieller Mechanismus kommen dabei PARs (Protease-aktivierte Rezeptoren) in Frage, eine Familie von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, deren Stimulation über die Spaltung des N-Terminus durch Serinproteasen erfolgt (Macfarlane et al., 2001).

Neben der gegenseitigen Regulation auf transkriptioneller Ebene sind möglicherweise sowohl epigenetische als auch genetische Veränderungen für die parallele Induktion mehrerer Kallikreine im Tumorgewebe verantwortlich. Eine gemeinsame transkriptionelle Regulation von Kallikreinen über Steroidhormone kann für die Expression in

hormonabhängigen Tumoren, nicht aber in PEK und BZK der Haut in Betracht gezogen werden. Lokus-Kontroll-Regionen kontrollieren als regulatorische Elemente über eine Distanz von mehr als 100 kb die stadien- und gewebespezifische Expression von Genfamilien (Levings and Bungert, 2002). In der Ratte konnte eine solche Lokus-Kontroll-Region nachgewiesen werden, die die spezifische Expression der Kallikrein-Familienmitglieder in der Speicheldrüse vermittelt (Smith et al., 1992). Weitere Hinweise für die Existenz eines solchen übergeordneten Kontrollmechanismus liefern die vier Kallikreine *KLK2*, *KLK3*, *KLK4* und *KLK15*, die in der Zentromer-nahen Region des Chromosomenabschnitts 19q13.3 liegen (vgl. Abb. 23) sowie in Prostatatumoren differentiell exprimiert und Androgen-reguliert sind (Yousef and Diamandis, 2001; Rittenhouse et al., 1998). Demgegenüber zeigen die nahe dem Telomer gelegenen Kallikreine *KLK5* bis *KLK14* eine Überexpression in Ovarialtumoren (Yousef et al., 2003b). Für zwei der Telomer-nahen Gene *KLK6* und *KLK9* konnte ebenfalls in beiden Fällen im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Verbindung zu Hauttumoren hergestellt werden. Zytogenetische Untersuchungen liefern Informationen darüber, dass die Induktion verschiedener Kallikreine auch auf chromosomalen Reorganisationen basieren kann. Für hK6 konnte die erhöhte Expression in Ovarialtumoren auf eine Genamplifikation zurückgeführt werden (Ni et al., 2004). Ein Rearrangement des chromosomalen Kallikrein-Lokus 19q13 liegt bei einer Reihe von humanen Tumoren vor, u.a. bei Pankreas-, Schilddrüsen- und Ovarialtumoren (Mitelman, 1994), die in einigen Fällen eine *KLK6*-Überexpression aufweisen (vgl. Abb. 12). Amplifikationen im Bereich 19q konnten bei nicht-kleinzelligen Lungentumoren und in PEK der Kopf- und Halsregion festgestellt werden, wohingegen in Keratoakanthomen überwiegend ein Verlust und nur in Einzelfällen eine Amplifikation von 19q in PEK der Haut vorgefunden wurde (Clausen et al., 2002; Mitelman, 1994; Speicher et al., 1995). Ausführliche zytogenetische Studien unter Einbeziehung einer grösseren Anzahl von PEK der Haut stehen jedoch noch aus.

Es wurde bereits erörtert, dass Familienmitglieder der Kallikreine als Tumormarker in Betracht gezogen werden können (zur Übersicht vgl. Yousef and Diamandis, 2003a) (Tabelle 8 im Anhang). In der klinischen Praxis sind hK3/PSA (*prostate specific antigen*) und hK2 bereits als valide Marker etabliert und für die Entdeckung und Therapiesteuerung des Prostatakarzinoms unentbehrlich (Diamandis, 1998; Rittenhouse et al., 1998). Auch hK6 stellt einen vielversprechenden neuen Biomarker für die Diagnose und die Überwachung des Krankheitsverlaufes von Ovarialtumoren dar, da eine Untersuchung von Seren ergab, dass in 66% der Fälle die hK6-Konzentration in Patientinnen mit Ovarialtumoren signifikant erhöht war (Diamandis et al., 2000a). Im Rahmen dieser Studien wurden allerdings keine Serumproben von Hauttumorpatienten miteingeschlossen. Die Analyse von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren zeigte keine erhöhte Konzentration von hK6 im Blut, obwohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit zumindest

auf Nukleinsäureebene eine Induktion festgestellt werden konnte. Trotz der verglichen mit Ovarialtumoren geringeren Expression des Transkriptes (vgl. Abb. 12) hängt die Konzentration von hK6 im Blut letztlich von der Effektivität der Sekretion ab, welche wiederum von der Gewebearchitektur und der Angiogenese bestimmt wird. Weiterführende Analysen mit Serumproben von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren verschiedener Stadien sowie von Patienten mit PEK, BZK und Melanomen der Haut können darüber Auskunft geben, ob eine Detektion von hK6 im Blut möglich ist. Sensitive Analysemethoden mit hoher Spezifität zur Quantifizierung von hK6 im Blut liegen bereits in Form einer immunofluorometrischen Messung vor (Diamandis et al., 2000b). Um sich einen Überblick darüber zu verschaffen, ob eine erhöhte hK6-Expression im Tumorgewebe von diagnostischem Wert ist, muss eine breit angelegte Überprüfung von NMSCs und Melanomen unterschiedlicher Stadien erfolgen. Die Verwendung eines hauttumor-spezifischen *Tissue Arrays* würde eine gleichzeitige Analyse vieler Patientenproben erlauben, so dass nach statistischer Auswertung eine potentielle Korrelation von Expression und Diagnostik, Stadium oder Prognose untersucht werden kann. Da BSSP/hK6 höchstwahrscheinlich Teil einer Enzym-Kaskade ist, die im Tumor aktiviert wird, erscheint es sinnvoll, zusätzlich andere Kallikreine wie Rik1200016C12/hK9 in die Beurteilung der Hauttumore miteinzubeziehen. Die Kombination mehrerer Kallikreine als Biomarker in einem multiparametrischen *Screening*-Ansatz könnte die Wahrscheinlichkeit einer zuverlässigen, exakten Aussage über Diagnose und Krankheitsverlauf erhöhen.

4.4 Funktion von BSSP/hK6 in pathophysiologischen Prozessen der Haut

Für BSSP ist weder unter physiologischen noch unter pathophysiologischen Bedingungen eine Funktion in der Haut bekannt. Die Mitglieder der Kallikreinfamilie nehmen im Körper eine Vielzahl von Aufgaben in physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen wahr, wobei sie überwiegend mit der Regulation des Zellwachstums und mit dem Gewebeumbau (*tissue remodelling*) in Verbindung gebracht worden sind (Borgono and Diamandis, 2004b). In Hinsicht auf krankhafte Veränderungen der Haut konnte bislang nur eine Induktion von hK6, hK7, hK8 und hK9 in Psoriasis sowie von hK8 in seborrhoischer Keratose, Lichen Planus und einigen PEK beobachtet werden (Ekholm and Egelrud, 1999; Gan et al., 2000; Kuwae et al., 2002). Untersuchungen lassen eine Beteiligung von hK8 an der Differenzierung von Keratinozyten vermuten (Kuwae et al., 2002; Kirihara et al., 2003a). Ein potentieller funktioneller Mechanismus in der Haut wurde ausschliesslich für hK7 beschrieben, das proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β aktivieren kann (Nylander-Lundqvist et al., 1996; Nylander-Lundqvist and Egelrud, 1997). Obwohl sowohl in Brust- als auch Ovarialtumoren eine differentielle Expression von hK6 bereits länger bekannt und hK6 auch in einer Reihe von anderen Tumoren dereguliert ist,

konnte noch nicht genau geklärt werden, welchen funktionellen Beitrag hK6 hinsichtlich der Tumorentstehung leistet.

4.4.1 Funktionelle Charakterisierung von BSSP durch *in vitro*-Analysen

In dieser Arbeit wurden mittels stabiler Transfektion BSSP-überexprimierende Zelllinien generiert, um durch deren Charakterisierung die biologische Funktion von BSSP/hK6 in Keratinozyten näher zu beschreiben. BSSP-transfizierte Keratinozyten zeigten gegenüber den Vektor-transfizierten Kontrollen eine fibroblastoide Morphologie, ein verstärktes Wachstum sowie erhöhte Motilität (Abb. 15, Abb. 18 und Abb. 19). Diese Beobachtungen korrelieren mit reduziertem Zell-Zell-Kontakt, der auf molekularer Ebene mit einer Translokation des E-Cadherin-Proteins von der Zellmembran in das Zytoplasma einherging (vgl. Abb. 16). Die Eigenschaften der BSSP-exprimierenden Keratinozyten wiesen deutliche Gemeinsamkeiten mit dem Phänomen der EMT (epitheliale mesenchymale Transition) auf (Kap. 3.3.3). Epithelzellen verlieren bei der EMT ihre Polarität und ihre Zell-Zell-Kontakte, wobei es gleichzeitig zu einer Expression mesenchymaler Marker sowie zu einer Reorganisation des Zytoskeletts verbunden mit der Manifestation eines migratorischen Phänotyps kommt (Kang and Massague, 2004). Dieser transiente Prozess stellt ein zentrales Ereignis der Tumorentstehung dar (Thiery, 2002). Für das Mitglied der Kallikreinfamilie hK3 wurde bereits eine direkte Beteiligung an der Induktion der EMT postuliert, da es über die Aktivierung der latenten, komplexierten Form des Wachstumsfaktors TGF- β eine EMT auslösen kann (Killian et al., 1993). Die EMT zeichnet sich in den meisten Tumoren durch einen Verlust des funktionellen E-Cadherins durch Mutation, transkriptionelle Repression oder proteolytische Degradation aus (Christofori and Semb, 1999) (Kap. 1.1.3). Analog dazu konnte für die BSSP-exprimierenden Keratinozyten eine Umverteilung des E-Cadherin-Proteins beobachtet werden (Abb. 16 und Abb. 17). Die Konsequenz der Translokation besteht ebenfalls in einem Funktionsverlust von E-Cadherin, da die Integrität des Cadherin-Catenin-Aktin-Komplexes nicht mehr gewährleistet ist (Nawrocki et al., 1998; Bongiorno et al., 1995). Eine solche Verlagerung von E-Cadherin ins Zytoplasma konnte *in vitro* beispielsweise auch in Gegenwart von HGF (*hepatocyte growth factor*) bei Pankreaskarzinomzellen und *in vivo* in einigen malignen PEK der Haut nachgewiesen werden (Lyakhovitsky et al., 2004; Paciucci et al., 1998). Um zu klären, ob es sich bei der veränderten E-Cadherin Lokalisation in transfizierten Keratinozyten um einen direkten oder indirekten Effekt der BSSP-Expression handelt, müssen sich weitere Untersuchungen anschliessen.

An dieser Stelle ist zu betonen, dass der Funktionsverlust von E-Cadherin auf DNA- und Proteinebene zwar einen Marker für die EMT darstellt, jedoch das Ereignis selbst nicht hinreichend ist, um eine EMT herbeizuführen (Kang and Massague, 2004; Thiery, 2002). Ferner war die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin und des epithelialen Markers Keratin 10, deren Induktion bzw. Repression als weitere Anhaltspunkte für die EMT gelten, unverändert (Daten nicht gezeigt). Demzufolge trägt BSSP in Keratinozyten zur Ausprägung maligner Eigenschaften bei, allerdings werden für eine vollständige EMT vermutlich weitere Faktoren benötigt. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass die Expression von BSSP/hK6 von Ras abhängt (Ignatenko et al., 2004) (vgl. Kap. 4.3). An der Auslösung einer EMT ist Ras in Kooperation mit TGF- β entscheidend beteiligt (Thiery, 2003). Tatsächlich wurde in der vorliegenden Arbeit belegt, dass BSSP in der Keratinozytenzelllinie MCA3D/AT3 Ras-abhängig exprimiert wird. Auch diese maligne Keratinozytenlinie, die tumorigene Eigenschaften *in vivo* aufweist (Quintanilla et al., 1991), zeigt, ebenso wie die BSSP-transfizierte MCA3D-Zelllinie, eine zytoplasmatische Lokalisation von E-Cadherin bei konstanter E-Cadherin-Proteinmenge (vgl. Abb. 16; Abb. 17) und ebenfalls keine Veränderung epithelialer oder mesenchymaler Marker (Daten nicht gezeigt). Ob die durch BSSP induzierten Veränderungen zu einer Tumorigenität *in vivo* führt, müssen Untersuchungen mit Nacktmäusen zeigen, denen BSSP-transfizierte Keratinozyten injiziert werden.

4.4.2 Die Rolle von BSSP/hK6 in der epithelialen Karzinogenese und der Wundheilung

Eine Vielzahl von genetischen Programmen, die mit Proliferation, Migration, Invasion, Gewebeumbau und Angiogenese verbunden sind, laufen beständig während der Tumorgenese und transient im Verlauf der Wundheilung ab (vgl. Kap. 1.1.5). Sowohl für den Wundheilungsprozess als auch für die Tumorgenese stellen Zellwachstum und Migration grundlegende Mechanismen dar. Beide Vorgänge werden durch BSSP massgeblich beeinflusst (Kap. 3.3).

Die Familie der Kallikreine wurde bis zum Beginn dieser Arbeit noch nicht mit der Karzinogenese der Haut in Verbindung gebracht. Mittlerweile existieren Untersuchungen, die eine erhöhte Expression von *KLK8* in PEK, nicht aber in BZK (Basalzellkarzinomen) beschreiben (Kitayoshi et al., 1999; Kuwae et al., 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen erstmals deutlich, dass auch andere Mitglieder der Kallikreinfamilie wie BSSP/hK6 und Rik1200016C12/hK9 in Hauttumoren und verschiedenen anderen epithelialen Tumoren induziert werden. Frühe Stadien der Tumorgenese sind im Wesentlichen durch Proliferation und späte Stadien zusätzlich durch Migration und Invasion gekennzeichnet (Compagni and Christofori, 2000). Da BSSP *in vitro* das Wachstum von Keratinozyten positiv beeinflusst (Abb. 18) und bereits in benignen

Tumoren exprimiert wird (Abb. 9 und Abb. 10), deuten die Befunde auf eine Beteiligung von BSSP/hK6 hinsichtlich des verstärkten Wachstums von Tumorzellen in frühen Stadien hin. Dagegen legt die gesteigerte Motilität der BSSP-exprimierenden Keratinozyten (Abb. 19) sowie die beobachtete Induktion von BSSP/hK6 in späteren, malignen Tumorstadien (Abb. 8, Abb. 9 und Abb. 10) eine unterstützende Wirkung bei der Migration und der Invasion im Rahmen der Metastasierung nahe.

Auch in der Wundheilung konnte eine Expression von BSSP/hK6 (Abb. 19 und Abb. 20) und Rik1200016C12/hK9 (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden. Erfolgt eine Verletzung der Haut, wandern die Keratinozyten der Wundränder in das Wundbett ein, um die Wunde zu verschliessen (Jacinto et al., 2001). Gleichzeitig beginnen die Keratinozyten direkt hinter der wandernden Zellfront mit einer verstärkten Proliferation, damit zusätzliche Zellen für den Verschluss der Wunde zur Verfügung stehen (Singer and Clark, 1999). Proliferation und Migration finden etwa von Tag 1 bis 3 nach der Verwundung statt, zeitgleich mit einer Induktion von BSSP (Abb. 20). Hinweise auf eine Beteiligung von BSSP an den Migrations- und Proliferationsprozessen während der Wundheilung liefern sowohl die *in vitro*-Analysen dieser Arbeit (Kap. 3.3) als auch die Detektion des BSSP-Proteins auf Gewebeschnitten von Wunden, in denen die Serinprotease im Bereich der mitotisch aktiven Keratinozyten des Wundrandes und in den in das Wundbett einwandernden Keratinozyten detektiert werden konnte (Abb. 21). Die suprabasale Expression von BSSP/hK6 in Tumoren (Abb. 9 und Abb. 10) und in der Wunde (Abb. 21) lässt vermuten, dass BSSP/hK6 dabei seine Funktion über einen parakrinen Mechanismus auf die basalen Keratinozyten geltend macht.

Bei der Betrachtung der BSSP-Expression im Verlauf der Wundheilung fällt weiterhin auf, dass BSSP auf mRNA- und Proteinebene auch nach Abschluss des Reepithelialisierungsprozesses in der bereits mit neuem Epithel bedeckten Wundfläche noch exprimiert ist (Abb. 21; Tag 5). Die späten Stadien der Wundheilung zeichnen sich durch epidermale Hyperplasie, Ausbildung des Granulationsgewebes und der Wiederherstellung des Differenzierungsstatus der regenerierenden epithelialen Zellen aus (Martin, 1997). Für hK8, das ebenfalls eine Expression in der Wundheilung zeigt, wurde postuliert, dass es aufgrund des zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters wahrscheinlich nicht an Proliferations- und Migrationsvorgängen, sondern an der Differenzierung der neu gebildeten Epidermis mitwirken kann (Kitayoshi et al., 1999). Auf eine Beteiligung an der Differenzierung deutete auch die Analyse von hK8-defizienten Mäusen (Kiriara et al., 2003b) sowie *in vitro*-Experimente hin, bei denen die Kalzium-vermittelte Differenzierung von Keratinozyten mit einer verstärkten Expression von *KLK8* verbunden war (Kuwaie et al., 2002). Analog zu diesen Daten zeigen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass auch BSSP in späten Stadien der Wundheilung in der geschlossenen Wunde am Differenzierungsprozess mitwirken könnte. Unterstützt wird

diese Vermutung durch vorläufige Daten, die auf eine erhöhte Loricrin-Expression in BSSP-transfizierten Keratinozyten gegenüber den Kontrollen deuten.

Im Wundheilungs- und Karzinogeneseprozess übernehmen MMPs zentrale Aufgaben, indem sie für die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und den Abbau der ECM sorgen (Parks, 1999; Singer and Clark, 1999). Dadurch dass die Aktivierung der Pro-MMPs oftmals durch Serinproteasen erfolgt, ist eine Spaltung der Pro-MMPs durch BSSP/hK6 denkbar. Eine Verbindung zwischen Kallikrein-Proteasen und MMPs konnte bereits hergestellt werden, da hK1 in der Lage ist, Gelatinase A/MMP-2 zu aktivieren (Desrivieres et al., 1993). Diese Hypothese wird weiterhin dadurch unterstützt, dass Trypsin 2, zu dem hK6 auf Aminosäureebene eine signifikante Sequenzidentität von 44% aufweist, Pro-Gelatinase A/MMP-2 und Pro-Gelatinase B/MMP-9 spalten kann (Nyberg et al., 2002; Sorsa et al., 1997). Beide MMPs sind nicht nur entscheidend am Prozess der Wundheilung beteiligt, sondern auch an Invasion und Metastasenbildung im Verlauf der Tumorprogression (Juarez et al., 1993; Aglund et al., 2004; Itoh et al., 1998b; Itoh et al., 1999). Vorläufige Ergebnisse zeigen allerdings, dass die zymographisch analysierten Mengen an aktivem MMP-2 und MMP-9 in BSSP-transfizierten Fibrosarkom-Zellen gegenüber der Kontrolle unverändert sind (Daten nicht gezeigt). Ob dies auch für BSSP-transfizierte Keratinozyten gilt, konnte bisher noch nicht eindeutig gezeigt werden.

Desweiteren besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Kallikreinen und der Aktivierung von Wachstumsfaktoren. So aktiviert hK3 TGF- β (vgl. Kap. 4.4.1), welches wiederum die Expression von Integrin-Untereinheiten induziert, die die Wanderung von Keratinozyten bei der Wundheilung ermöglicht (Gailit et al., 1994). In der Tumorgenese kann die TGF- β induzierte Signaltransduktion in Synergismus mit dem aktivierten Ras-Signalweg die Invasion und Metastasierung fördern (Oft et al., 1998; Derynck et al., 2001). Damit könnte in Keratinozyten mit onkogenem Ras, die hohe Mengen an BSSP exprimieren (MCA3D/AT3), durch BSSP aktiviertes TGF- β die Ausprägung des malignen Phänotyps unterstützen. Bei sAPP (*soluble amyloid precursor protein*) handelt es sich um einen weiteren Faktor, der die Proliferation und die Motilität von Keratinozyten stimuliert und in der Wundheilung sowie in Psoriasis exprimiert wird (Derynck et al., 2001; Hoffmann et al., 2000; Kirfel et al., 2002; Derynck et al., 2001; Kummer et al., 2002; Siemes et al., 2004). sAPP entsteht aus APP (*amyloid precursor protein*) durch proteolytische Spaltung an der α -Sekretase-Schnittstelle (Schmitz et al., 2002), die interessanterweise auch für die Degradation von APP durch hK6 beschrieben wurde (Magklara et al., 2003). Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob die beobachteten Effekte von BSSP auf die Migration und das Wachstum der Zellen auf eine verstärkte sAPP-Freisetzung zurückgehen.

Biochemische Studien der enzymatischen Aktivität von BSSP/hK6 *in vitro* belegen, dass Fibronectin zu seinen potentiellen Substraten zählt (Magklara et al., 2003; Matsui et al., 2000). Während der Wundheilung dient Fibronectin als provisorische Matrix für die migrierenden Keratinozyten, die den Fibronectin-Rezeptor $\alpha v\beta 6$ -Integrin exprimieren (Woodley, 2004; Breuss et al., 1995). Möglicherweise spaltet BSSP, das von den ins Wundbett einwandernden Keratinozyten sezerniert wird (Abb. 21) das Fibronectin der provisorischen Matrix und ermöglicht auf diese Weise die Fortbewegung der Zellen. Ein analoger Mechanismus könnte auch der verstärkten Motilität *in vitro* zugrunde liegen, da Keratinozyten auch in Zellkultursystemen ihre ECM u.a. aus Fibronectin aufbauen (Clark et al., 1985).

Zusammenfassend deutet das Expressionsmuster in Tumoren und Wunden, die beobachteten *in vitro*-Eigenschaften und das Spektrum an unterschiedlichen, potentiellen Substraten darauf hin, dass die Funktion von BSSP/hK6 in pathophysiologischen Prozessen der Wundheilung und der Tumorgenese über die terminale Differenzierung hinausgeht und mit Motilität und Wachstum der Zellen in Zusammenhang steht.

Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass die Serinprotease BSSP/hK6 sowohl im Verlauf der Hautkarzinogenese als auch der Wundheilung eine erhöhte Expression zeigt. Ausserdem konnte nachgewiesen werden, dass BSSP/hK6 möglicherweise an beiden Prozessen funktionell beteiligt ist, indem die Protease das Zellwachstum und die Motilität von Keratinozyten fördert. Weiterführende Analysen mit einer grösseren Anzahl von Tumorbiopsien werden klären, ob eine Korrelation zwischen einer hK6-Expression und dem Grad der Malignität sowie der Prognose für den Patienten hergestellt werden kann. Außerdem soll überprüft werden, ob eine Übertragung der *in vitro* beobachteten Effekte von BSSP auch auf die *in vivo*-Situation möglich ist. Demgemäss ist die Tranplantation oder die subkutane Injektion der BSSP-überexprimierenden Keratinozyten in Nacktmäusen notwendig, um eine Aussage über den Einfluss von BSSP auf die Tumorigenität und das invasive Wachstum machen zu können. Darüberhinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit die Herstellung transgener Mäuse initiiert, die Aufschluss über die Funktion von BSSP *in vivo* in der Haut und in anderen Epithelien geben wird. Von besonderem Interesse ist dabei, wie sich die BSSP-Überexpression auswirkt, wenn die Haut durch TPA oder durch Verwundung stimuliert wird.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Expression von Genen, die bisher nicht mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht wurden, liefert die Basis für deren funktionelle Charakterisierung im epithelialen Karzinogeneseprozess. Die neu erworbenen Kenntnisse über die Funktion von BSSP/hK6 leisten einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des bislang kaum untersuchten, zellbiologischen Mechanismus, über den Kallikrein-Proteasen Tumor-relevante Prozesse und Wundheilung beeinflussen. Die in dieser Arbeit etablierten Zelllinien und die begonnene Generierung von Mausmodellen ermöglichen erstmals eine Überprüfung spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität dieser Protease. Damit kann unter Umständen eine entscheidende Grundlage für die therapeutische Intervention epithelialer Krebsformen geschaffen werden.

Literaturnachweis

- Abrahamsson,P.A., Lilja,H., Falkmer,S., and Wadstrom,L.B. (1988). Immunohistochemical distribution of the three predominant secretory proteins in the parenchyma of hyperplastic and neoplastic prostate glands. *Prostate 12*, 39-46.
- Aglund,K., Rauvala,M., Puistola,U., Angstrom,T., Turpeenniemi-Hujanen,T., Zackrisson,B., and Stendahl,U. (2004). Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer-MMP-9 correlates to the grade and the stage. *Gynecol. Oncol. 94*, 699-704.
- Aldaz,C.M., Trono,D., Larcher,F., Slaga,T.J., and Conti,C.J. (1989). Sequential trisomization of chromosomes 6 and 7 in mouse skin premalignant lesions. *Mol. Carcinog. 2*, 22-26.
- Ananthaswamy,H.N., Loughlin,S.M., Cox,P., Evans,R.L., Ullrich,S.E., and Kripke,M.L. (1997). Sunlight and skin cancer: inhibition of p53 mutations in UV-irradiated mouse skin by sunscreens. *Nat. Med. 3*, 510-514.
- Ananthaswamy,H.N., Loughlin,S.M., Ullrich,S.E., and Kripke,M.L. (1998). Inhibition of UV-induced p53 mutations by sunscreens: implications for skin cancer prevention. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 3*, 52-56.
- Ananthaswamy,H.N., Price,J.E., Goldberg,L.H., and Bales,E.S. (1988). Detection and identification of activated oncogenes in human skin cancers occurring on sun-exposed body sites. *Cancer Res. 48*, 3341-3346.
- Andreasen,P.A., Kjoller,L., Christensen,L., and Duffy,M.J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer 72*, 1-22.
- Angel,P., Imagawa,M., Chiu,R., Stein,B., Imbra,R.J., Rahmsdorf,H.J., Jonat,C., Herrlich,P., and Karin,M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell 49*, 729-739.
- Angel,P. and Karin,M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta 1072*, 129-157.
- Angel,P. and Szabowski,A. (2002). Function of AP-1 target genes in mesenchymal-epithelial cross-talk in skin. *Biochem. Pharmacol. 64*, 949-956.
- Angel,P., Szabowski,A., and Schorpp-Kistner,M. (2001). Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene 20*, 2413-2423.
- Anisowicz,A., Sotiropoulou,G., Stenman,G., Mok,S.C., and Sager,R. (1996). A novel protease homolog differentially expressed in breast and ovarian cancer. *Mol. Med. 2*, 624-636.
- Aoki,S., Shimamura,T., Shibata,T., Nakanishi,Y., Moriya,Y., Sato,Y., Kitajima,M., Sakamoto,M., and Hirohashi,S. (2003). Prognostic significance of dysadherin expression in advanced colorectal carcinoma. *Br. J. Cancer 88*, 726-732.

- Aronheim,A., Engelberg,D., Li,N., al Alawi,N., Schlessinger,J., and Karin,M. (1994). Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* 78, 949-961.
- Ashcroft,G.S., Lei,K., Jin,W., Longenecker,G., Kulkarni,A.B., Greenwell-Wild,T., Hale-Donze,H., McGrady,G., Song,X.Y., and Wahl,S.M. (2000). Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat. Med.* 6, 1147-1153.
- Baker,A.H., Edwards,D.R., and Murphy,G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* 115, 3719-3727.
- Balbin,M., Fueyo,A., Tester,A.M., Pendas,A.M., Pitiot,A.S., Astudillo,A., Overall,C.M., Shapiro,S.D., and Lopez-Otin,C. (2003). Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat. Genet.* 35, 252-257.
- Barbacid,M. (1990). ras oncogenes: their role in neoplasia. *Eur. J. Clin. Invest* 20, 225-235.
- Bechtel,M.J., Reinartz,J., Rox,J.M., Inndorf,S., Schaefer,B.M., and Kramer,M.D. (1996). Upregulation of cell-surface-associated plasminogen activation in cultured keratinocytes by interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Exp. Cell Res.* 223, 395-404.
- Bernett,M.J., Blaber,S.I., Scarisbrick,I.A., Dhanarajan,P., Thompson,S.M., and Blaber,M. (2002). Crystal structure and biochemical characterization of human kallikrein 6 reveals that a trypsin-like kallikrein is expressed in the central nervous system. *J. Biol. Chem.* 277, 24562-24570.
- Bernstein,L.R., Bravo,R., and Colburn,N.H. (1992). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate--induced levels of AP-1 proteins: a 46-kDa protein immunoprecipitated by anti-fra-1 and induced in promotion-resistant but not promotion-sensitive JB6 cells. *Mol. Carcinog.* 6, 221-229.
- Bernstein,L.R. and Colburn,N.H. (1989). AP1/jun function is differentially induced in promotion-sensitive and resistant JB6 cells. *Science* 244, 566-569.
- Berridge,M.J., Brown,K.D., Irvine,R.F., and Heslop,J.P. (1985). Phosphoinositides and cell proliferation. *J. Cell Sci. Suppl* 3, 187-198.
- Blaber,S.I., Scarisbrick,I.A., Bernett,M.J., Dhanarajan,P., Seavy,M.A., Jin,Y., Schwartz,M.A., Rodriguez,M., and Blaber,M. (2002). Enzymatic properties of rat myelencephalon-specific protease. *Biochemistry* 41, 1165-1173.
- Bongiorno,P.F., al Kasspooles,M., Lee,S.W., Rachwal,W.J., Moore,J.H., Whyte,R.I., Orringer,M.B., and Beer,D.G. (1995). E-cadherin expression in primary and metastatic thoracic neoplasms and in Barrett's oesophagus. *Br. J. Cancer* 71, 166-172.
- Borgono,C.A. and Diamandis,E.P. (2004a). The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 876-890.
- Borgono,C.A. and Diamandis,E.P. (2004b). The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 876-890.

- Borgono,C.A., Fracchioli,S., Yousef,G.M., Rigault de la Longrais IA, Luo,L.Y., Soosaipillai,A., Puopolo,M., Grass,L., Scorilas,A., Diamandis,E.P., and Katsaros,D. (2003). Favorable prognostic value of tissue human kallikrein 11 (hK11) in patients with ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* 106, 605-610.
- Boukamp,P., Tilgen,W., Dzarlieva,R.T., Breitkreutz,D., Haag,D., Riehl,R.K., Bohnert,A., and Fusenig,N.E. (1982). Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from a squamous cell carcinoma of human skin. *J. Natl. Cancer Inst.* 68, 415-427.
- Brash,D.E. (1997). Sunlight and the onset of skin cancer. *Trends Genet.* 13, 410-414.
- Brash,D.E., Rudolph,J.A., Simon,J.A., Lin,A., McKenna,G.J., Baden,H.P., Halperin,A.J., and Ponten,J. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 10124-10128.
- Brash,D.E., Ziegler,A., Jonason,A.S., Simon,J.A., Kunala,S., and Leffell,D.J. (1996). Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 1, 136-142.
- Bratt,T. (2000). Lipocalins and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 318-326.
- Brattsand,M. and Egelrud,T. (1999). Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J. Biol. Chem.* 274, 30033-30040.
- Breitenbach,U., Tuckermann,J.P., Gebhardt,C., Richter,K.H., Furstenberger,G., Christofori,G., and Angel,P. (2001). Keratinocyte-specific onset of serine protease BSSP expression in experimental carcinogenesis. *J. Invest Dermatol.* 117, 634-640.
- Breivik,J., Meling,G.I., Spurkland,A., Rognum,T.O., and Gaudernack,G. (1994). K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br. J. Cancer* 69, 367-371.
- Breuss,J.M., Gallo,J., DeLisser,H.M., Klimanskaya,I.V., Folkesson,H.G., Pittet,J.F., Nishimura,S.L., Aldape,K., Landers,D.V., Carpenter,W., and . (1995). Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 6), 2241-2251.
- Brown,K., Quintanilla,M., Ramsden,M., Kerr,I.B., Young,S., and Balmain,A. (1986). v-ras genes from Harvey and BALB murine sarcoma viruses can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cell* 46, 447-456.
- Burns,P.A., Kemp,C.J., Gannon,J.V., Lane,D.P., Bremner,R., and Balmain,A. (1991). Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene* 6, 2363-2369.
- Campbell,P.M. and Der,C.J. (2004). Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 14, 105-114.
- Castagna,M., Takai,Y., Kaibuchi,K., Sano,K., Kikkawa,U., and Nishizuka,Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257, 7847-7851.

- Chen,H., Paradies,N.E., Fedor-Chaikin,M., and Brackenbury,R. (1997). E-cadherin mediates adhesion and suppresses cell motility via distinct mechanisms. *J. Cell Sci.* *110* (Pt 3), 345-356.
- Chen,N., Nomura,M., She,Q.B., Ma,W.Y., Bode,A.M., Wang,L., Flavell,R.A., and Dong,Z. (2001). Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH(2)-terminal kinase-2-deficient mice. *Cancer Res.* *61*, 3908-3912.
- Cheng,S.C., Prakash,A.S., Pigott,M.A., Hilton,B.D., Lee,H., Harvey,R.G., and Dipple,A. (1988). A metabolite of the carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene that reacts predominantly with adenine residues in DNA. *Carcinogenesis* *9*, 1721-1723.
- Christofori,G. and Semb,H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 73-76.
- Clark,R.A., Nielsen,L.D., Howell,S.E., and Folkvord,J.M. (1985). Human keratinocytes that have not terminally differentiated synthesize laminin and fibronectin but deposit only fibronectin in the pericellular matrix. *J. Cell Biochem.* *28*, 127-141.
- Clausen,O.P., Beigi,M., Bolund,L., Kolvraa,S., Gjersvik,P.J., Mork,G., and de Angelis,P.M. (2002). Keratoacanthomas frequently show chromosomal aberrations as assessed by comparative genomic hybridization. *J. Invest Dermatol.* *119*, 1367-1372.
- Colburn,N.H., Former,B.F., Nelson,K.A., and Yuspa,S.H. (1979). Tumour promoter induces anchorage independence irreversibly. *Nature* *281*, 589-591.
- Colburn,N.H., Wendel,E., and Srinivas,L. (1982). Responses of preneoplastic epidermal cells to tumor promoters and growth factors: use of promoter-resistant variants for mechanism studies. *J. Cell Biochem.* *18*, 261-270.
- Compagni,A. and Christofori,G. (2000). Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br. J. Cancer* *83*, 1-5.
- Cooper,S.J., MacGowan,J., Ranger-Moore,J., Young,M.R., Colburn,N.H., and Bowden,G.T. (2003). Expression of dominant negative c-jun inhibits ultraviolet B-induced squamous cell carcinoma number and size in an SKH-1 hairless mouse model. *Mol. Cancer Res.* *1*, 848-854.
- Cornelius,L.A., Nehring,L.C., Harding,E., Bolanowski,M., Welgus,H.G., Kobayashi,D.K., Pierce,R.A., and Shapiro,S.D. (1998). Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J. Immunol.* *161*, 6845-6852.
- Coussens,L.M., Fingleton,B., and Matrisian,L.M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* *295*, 2387-2392.
- Coussens,L.M., Raymond,W.W., Bergers,G., Laig-Webster,M., Behrendtsen,O., Werb,Z., Coughley,G.H., and Hanahan,D. (1999). Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev.* *13*, 1382-1397.
- Dano,K., Romer,J., Nielsen,B.S., Bjorn,S., Pyke,C., Rygaard,J., and Lund,L.R. (1999). Cancer invasion and tissue remodeling--cooperation of protease systems and cell types. *APMIS* *107*, 120-127.

- Denning,M.F., Dlugosz,A.A., Threadgill,D.W., Magnuson,T., and Yuspa,S.H. (1996). Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. *J. Biol. Chem.* 271, 5325-5331.
- Derynck,R., Akhurst,R.J., and Balmain,A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* 29, 117-129.
- Desrivieres,S., Lu,H., Peyri,N., Soria,C., Legrand,Y., and Menashi,S. (1993). Activation of the 92 kDa type IV collagenase by tissue kallikrein. *J. Cell Physiol* 157, 587-593.
- Dhar,A., Young,M.R., and Colburn,N.H. (2002). The role of AP-1, NF-kappaB and ROS/NOS in skin carcinogenesis: the JB6 model is predictive. *Mol. Cell Biochem.* 234-235, 185-193.
- Diamandis,E.P. (1998). Prostate-specific antigen-its usefulness in clinical medicine. *Trends Endocrinol Metab* 9, 310-316.
- Diamandis,E.P., Okui,A., Mitsui,S., Luo,L.Y., Soosaipillai,A., Grass,L., Nakamura,T., Howarth,D.J., and Yamaguchi,N. (2002). Human kallikrein 11: a new biomarker of prostate and ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 62, 295-300.
- Diamandis,E.P., Yousef,G.M., Soosaipillai,A.R., and Bunting,P. (2000a). Human kallikrein 6 (zyme/protease M/neurosin): a new serum biomarker of ovarian carcinoma. *Clin. Biochem.* 33, 579-583.
- Diamandis,E.P., Yousef,G.M., Soosaipillai,A.R., Grass,L., Porter,A., Little,S., and Sotiropoulou,G. (2000b). Immunofluorometric assay of human kallikrein 6 (zyme/protease M/neurosin) and preliminary clinical applications. *Clin. Biochem.* 33, 369-375.
- Dickson,M.A., Hahn,W.C., Ino,Y., Ronfard,V., Wu,J.Y., Weinberg,R.A., Louis,D.N., Li,F.P., and Rheinwald,J.G. (2000). Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol. Cell Biol.* 20, 1436-1447.
- DiGiovanni,J. (1992). Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol. Ther.* 54, 63-128.
- Djukanovic,D., Hofmann,U., Sucker,A., Rittgen,W., and Schadendorf,D. (2000). Comparison of S100 protein and MIA protein as serum marker for malignant melanoma. *Anticancer Res.* 20, 2203-2207.
- Dong,Z., Kumar,R., Yang,X., and Fidler,I.J. (1997). Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 88, 801-810.
- Donovan,M., Olofsson,B., Gustafson,A.L., Dencker,L., and Eriksson,U. (1995). The cellular retinoic acid binding proteins. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 459-465.
- Dvorak,H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 315, 1650-1659.
- Eckert,R.L., Broome,A.M., Ruse,M., Robinson,N., Ryan,D., and Lee,K. (2004). S100 proteins in the epidermis. *J. Invest Dermatol.* 123, 23-33.

- Eeckhout, Y. and Vaes, G. (1977). Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem. J.* *166*, 21-31.
- Egeblad, M. and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 161-174.
- Egeli, U., Ozkan, L., Tunca, B., Kahraman, S., Cecener, G., Ergul, E., and Engin, K. (2000). The relationship between genetic susceptibility to head and neck cancer with the expression of common fragile sites. *Head Neck* *22*, 591-598.
- Eckholm, E. and Egelrud, T. (1999). Stratum corneum chymotryptic enzyme in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* *291*, 195-200.
- Esteve, P.O., Tremblay, P., Houde, M., St Pierre, Y., and Mandeville, R. (1998). In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. *Biochim. Biophys. Acta* *1403*, 85-96.
- Eto, K., Puzon-McLaughlin, W., Sheppard, D., Sehara-Fujisawa, A., Zhang, X.P., and Takada, Y. (2000). RGD-independent binding of integrin alpha9beta1 to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. *J. Biol. Chem.* *275*, 34922-34930.
- Fang, J., Shing, Y., Wiederschain, D., Yan, L., Butterfield, C., Jackson, G., Harper, J., Tamvakopoulos, G., and Moses, M.A. (2000). Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 3884-3889.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* *132*, 6-13.
- Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., Olsen, B.R., and Delaisse, J. (2000). Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett.* *486*, 247-251.
- Fidler, J.L. and Johnson, C.D. (2001). Imaging of neuroendocrine tumors of the pancreas. *Int. J. Gastrointest. Cancer* *30*, 73-85.
- Fingleton, B.M., Heppner Goss, K.J., Crawford, H.C., and Matrisian, L.M. (1999). Matrilysin in early stage intestinal tumorigenesis. *APMIS* *107*, 102-110.
- Fischer, O.M., Hart, S., Gschwind, A., and Ullrich, A. (2003). EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 1203-1208.
- Flower, D.R. (1994). The lipocalin protein family: a role in cell regulation. *FEBS Lett.* *354*, 7-11.
- Fuchs, E. (1990a). Epidermal differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *2*, 1028-1035.
- Fuchs, E. (1990b). Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell Biol.* *111*, 2807-2814.

- Furstenberger,G. and Kopp-Schneider,A. (1995). Malignant progression of papillomas induced by the initiation--promotion protocol in NMRI mouse skin. *Carcinogenesis* 16, 61-69.
- Furstenberger,G., Rogers,M., Schnapke,R., Bauer,G., Hofler,P., and Marks,F. (1989). Stimulatory role of transforming growth factors in multistage skin carcinogenesis: possible explanation for the tumor-inducing effect of wounding in initiated NMRI mouse skin. *Int. J. Cancer* 43, 915-921.
- Fusenig,N.E., Amer,S.M., Boukamp,P., and Worst,P.K. (1978). Characteristics of chemically transformed mouse epidermal cells in vitro and in vivo. *Bull. Cancer* 65, 271-279.
- Fusenig,N.E., Dzarlieva-Petrusevska,R.T., and Breitkreutz,D. (1985). Phenotypic and cytogenetic characteristics of different stages during spontaneous transformation of mouse keratinocytes in vitro. *Carcinog. Compr. Surv.* 9, 293-326.
- Gagne,D., Balaguer,P., Demirpence,E., Chabret,C., Trousse,F., Nicolas,J.C., and Pons,M. (1994). Stable luciferase transfected cells for studying steroid receptor biological activity. *J. Biolumin. Chemilumin.* 9, 201-209.
- Gailit,J., Welch,M.P., and Clark,R.A. (1994). TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *J. Invest Dermatol.* 103, 221-227.
- Gan,L., Lee,I., Smith,R., Argonza-Barrett,R., Lei,H., McCuaig,J., Moss,P., Paeper,B., and Wang,K. (2000). Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q13 region. *Gene* 257, 119-130.
- Gebhardt,C., Breitenbach,U., Tuckermann,J.P., Dittrich,B.T., Richter,K.H., and Angel,P. (2002). Calgranulins S100A8 and S100A9 are negatively regulated by glucocorticoids in a c-Fos-dependent manner and overexpressed throughout skin carcinogenesis. *Oncogene* 21, 4266-4276.
- Grady,W.M. and Markowitz,S.D. (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3, 101-128.
- Grzesiak,A., Helland,R., Smalas,A.O., Krowarsch,D., Dadlez,M., and Otlewski,J. (2000). Substitutions at the P(1) position in BPTI strongly affect the association energy with serine proteinases. *J. Mol. Biol.* 301, 205-217.
- Gschwind,A., Hart,S., Fischer,O.M., and Ullrich,A. (2003). TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J.* 22, 2411-2421.
- Guo,H., Li,R., Zucker,S., and Toole,B.P. (2000). EMMPRIN (CD147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface. *Cancer Res.* 60, 888-891.
- Hakalahti,L., Vihko,P., Henttu,P., Autio-Harmainen,H., Soini,Y., and Vihko,R. (1993). Evaluation of PAP and PSA gene expression in prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma using northern-blot analyses, in situ hybridization and immunohistochemical stainings with monoclonal and bispecific antibodies. *Int. J. Cancer* 55, 590-597.

- Handschuh,G., Candidus,S., Lubber,B., Reich,U., Schott,C., Oswald,S., Becke,H., Hutzler,P., Birchmeier,W., Hofler,H., and Becker,K.F. (1999). Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* 18, 4301-4312.
- Hazan,R.B., Qiao,R., Keren,R., Badano,I., and Suyama,K. (2004). Cadherin switch in tumor progression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014, 155-163.
- Heizmann,C.W., Fritz,G., and Schafer,B.W. (2002). S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci.* 7, d1356-d1368.
- Hernandez-Barrantes,S., Toth,M., Bernardo,M.M., Yurkova,M., Gervasi,D.C., Raz,Y., Sang,Q.A., and Fridman,R. (2000). Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J. Biol. Chem.* 275, 12080-12089.
- Hirohashi,S. and Kanai,Y. (2003). Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci.* 94, 575-581.
- Hivnor,C., Williams,N., Singh,F., Vanvoorhees,A., Dzubow,L., Baldwin,D., and Seykora,J. (2004). Gene expression profiling of psoriasis demonstrates similarities with psoriasis. *J. Cutan. Pathol.* 31, 657-664.
- Hoffman,B.R., Katsaros,D., Scorilas,A., Diamandis,P., Fracchioli,S., Rigault de la Longrais IA, Colgan,T., Puopolo,M., Giardina,G., Massobrio,M., and Diamandis,E.P. (2002). Immunofluorometric quantitation and histochemical localisation of kallikrein 6 protein in ovarian cancer tissue: a new independent unfavourable prognostic biomarker. *Br. J. Cancer* 87, 763-771.
- Hoffmann,J., Twiesselmann,C., Kummer,M.P., Romagnoli,P., and Herzog,V. (2000). A possible role for the Alzheimer amyloid precursor protein in the regulation of epidermal basal cell proliferation. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 905-914.
- Hummerich,L., Mueller,R., van der Sanden,M., Hess,J.K.F.H.M.F.G., Mauch,C., Lichter,P., and Angel,P. (2004a). Involvement of distinct S100 Family Members in Squamous Skin Carcinogenesis. Manuscript in preparation.
- Hummerich,L., Müller,R., Hess,J., Kokocinski,F., Hahn,M., Fürstenberger,G., Mauch,C., Lichter,P., and Angel,P. (2004b). Identification of novel tumor-associated genes during the process of squamous cell cancer development. submitted.
- Iba,K., Albrechtsen,R., Gilpin,B.J., Loechel,F., and Wewer,U.M. (1999). Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. *Am. J. Pathol.* 154, 1489-1501.
- Ignatenko,N.A., Zhang,H., Watts,G.S., Skovan,B.A., Stringer,D.E., and Gerner,E.W. (2004). The chemopreventive agent alpha-difluoromethylornithine blocks Ki-ras-dependent tumor formation and specific gene expression in Caco-2 cells. *Mol. Carcinog.* 39, 221-233.
- Ino,Y., Gotoh,M., Sakamoto,M., Tsukagoshi,K., and Hirohashi,S. (2002). Dysadherin, a cancer-associated cell membrane glycoprotein, down-regulates E-cadherin and promotes metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 365-370.

- Itoh,T., Tanioka,M., Matsuda,H., Nishimoto,H., Yoshioka,T., Suzuki,R., and Uehira,M. (1999). Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin. Exp. Metastasis* 17, 177-181.
- Itoh,T., Tanioka,M., Yoshida,H., Yoshioka,T., Nishimoto,H., and Itohara,S. (1998b). Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res.* 58, 1048-1051.
- Itoh,T., Tanioka,M., Yoshida,H., Yoshioka,T., Nishimoto,H., and Itohara,S. (1998a). Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res.* 58, 1048-1051.
- Ivaska,J. and Heino,J. (2000). Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol. Life Sci.* 57, 16-24.
- Jacinto,A., Martinez-Arias,A., and Martin,P. (2001). Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat. Cell Biol.* 3, E117-E123.
- Johansson,N., Airola,K., Grenman,R., Kariniemi,A.L., Saarialho-Kere,U., and Kahari,V.M. (1997). Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Am. J. Pathol.* 151, 499-508.
- Johnsen,M., Lund,L.R., Romer,J., Almholt,K., and Dano,K. (1998). Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 667-671.
- Jonason,A.S., Kunala,S., Price,G.J., Restifo,R.J., Spinelli,H.M., Persing,J.A., Leffell,D.J., Tarone,R.E., and Brash,D.E. (1996). Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 14025-14029.
- Juarez,J., Clayman,G., Nakajima,M., Tanabe,K.K., Saya,H., Nicolson,G.L., and Boyd,D. (1993). Role and regulation of expression of 92-kDa type-IV collagenase (MMP-9) in 2 invasive squamous-cell-carcinoma cell lines of the oral cavity. *Int. J. Cancer* 55, 10-18.
- Kang,Y. and Massague,J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118, 277-279.
- Kerkela,E., Ala-aho,R., Lohi,J., Grenman,R., Kahari,V., and Saarialho-Kere,U. (2001). Differential patterns of stromelysin-2 (MMP-10) and MT1-MMP (MMP-14) expression in epithelial skin cancers. *Br. J. Cancer* 84, 659-669.
- Kerkela,E. and Saarialho-Kere,U. (2003). Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp. Dermatol.* 12, 109-125.
- Kerr,L.D., Magun,B.E., and Matrisian,L.M. (1992). The role of C-Fos in growth factor regulation of stromelysin/transin gene expression. *Matrix Suppl* 1, 176-183.
- Killian,C.S., Corral,D.A., Kawinski,E., and Constantine,R.I. (1993). Mitogenic response of osteoblast cells to prostate-specific antigen suggests an activation of latent TGF-beta and a proteolytic modulation of cell adhesion receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 940-947.

- Kim,H., Scorilas,A., Katsaros,D., Yousef,G.M., Massobrio,M., Fracchioli,S., Piccinno,R., Gordini,G., and Diamandis,E.P. (2001). Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression is an indicator of poor prognosis in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 84, 643-650.
- Kinoshita,T., Sato,H., Okada,A., Ohuchi,E., Imai,K., Okada,Y., and Seiki,M. (1998). TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J. Biol. Chem.* 273, 16098-16103.
- Kirfel,G., Borm,B., Rigort,A., and Herzog,V. (2002). The secretory beta-amyloid precursor protein is a motogen for human epidermal keratinocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 664-676.
- Kirihara,T., Matsumoto-Miyai,K., Nakamura,Y., Sadayama,T., Yoshida,S., and Shiosaka,S. (2003b). Prolonged recovery of ultraviolet B-irradiated skin in neuropsin (KLK8)-deficient mice. *Br. J. Dermatol.* 149, 700-706.
- Kirihara,T., Matsumoto-Miyai,K., Nakamura,Y., Sadayama,T., Yoshida,S., and Shiosaka,S. (2003a). Prolonged recovery of ultraviolet B-irradiated skin in neuropsin (KLK8)-deficient mice. *Br. J. Dermatol.* 149, 700-706.
- Kitayoshi,H., Inoue,N., Kuwae,K., Chen,Z.L., Sato,H., Ohta,T., Hosokawa,K., Itami,S., Yoshikawa,K., Yoshida,S., and Shiosaka,S. (1999). Effect of 12-O-tetradecanoyl-phorbol ester and incisional wounding on neuropsin mRNA and its protein expression in murine skin. *Arch. Dermatol. Res.* 291, 333-338.
- Koblinski,J.E., Ahram,M., and Sloane,B.F. (2000). Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin. Chim. Acta* 291, 113-135.
- Komatsu,N., Takata,M., Otsuki,N., Toyama,T., Ohka,R., Takehara,K., and Saijoh,K. (2003). Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages. *J. Invest Dermatol.* 121, 542-549.
- Krieg,P., Finch,J., Fustenberger,G., Melber,K., Matrisian,L.M., and Bowden,G.T. (1988). Tumor promoters induce a transient expression of tumor-associated genes in both basal and differentiated cells of the mouse epidermis. *Carcinogenesis* 9, 95-100.
- Kulesz-Martin,M., Kilkenny,A.E., Holbrook,K.A., Digernes,V., and Yuspa,S.H. (1983). Properties of carcinogen altered mouse epidermal cells resistant to calcium-induced terminal differentiation. *Carcinogenesis* 4, 1367-1377.
- Kummer,C., Wehner,S., Quast,T., Werner,S., and Herzog,V. (2002). Expression and potential function of beta-amyloid precursor proteins during cutaneous wound repair. *Exp. Cell Res.* 280, 222-232.
- Kuwae,K., Matsumoto-Miyai,K., Yoshida,S., Sadayama,T., Yoshikawa,K., Hosokawa,K., and Shiosaka,S. (2002). Epidermal expression of serine protease, neuropsin (KLK8) in normal and pathological skin samples. *Mol. Pathol.* 55, 235-241.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee,E., Punnonen,K., Cheng,C., Glick,A., Dlugosz,A., and Yuspa,S.H. (1992). Analysis of phospholipid metabolism in murine keratinocytes transformed by the v-ras oncogene:

relationship of phosphatidylinositol turnover and cytokine stimulation to the transformed phenotype. *Carcinogenesis* 13, 2367-2373.

Lengauer,C., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.

Levings,P.P. and Bungert,J. (2002). The human beta-globin locus control region. *Eur. J. Biochem.* 269, 1589-1599.

Li,J.J., Dong,Z., Dawson,M.I., and Colburn,N.H. (1996). Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress AP-1 without transactivating retinoic acid response element. *Cancer Res.* 56, 483-489.

Li,W.Y., Chong,S.S., Huang,E.Y., and Tuan,T.L. (2003). Plasminogen activator/plasmin system: a major player in wound healing? *Wound. Repair Regen.* 11, 239-247.

Lieu,F.M., Yamanishi,K., Konishi,K., Kishimoto,S., and Yasuno,H. (1991). Low incidence of Ha-ras oncogene mutations in human epidermal tumors. *Cancer Lett.* 59, 231-235.

Liotta,L.A. and Stetler-Stevenson,W.G. (1991). Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.* 51, 5054s-5059s.

Lochter,A., Galosy,S., Muschler,J., Freedman,N., Werb,Z., and Bissell,M.J. (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* 139, 1861-1872.

Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L.A.A.L., RANDALL,R.J., and . (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Lu,J., Liu,Z., Xiong,M., Wang,Q., Wang,X., Yang,G., Zhao,L., Qiu,Z., Zhou,C., and Wu,M. (2001). Gene expression profile changes in initiation and progression of squamous cell carcinoma of esophagus. *Int. J. Cancer* 91, 288-294.

Luo,L.Y., Bunting,P., Scorilas,A., and Diamandis,E.P. (2001a). Human kallikrein 10: a novel tumor marker for ovarian carcinoma? *Clin. Chim. Acta* 306, 111-118.

Luo,L.Y., Katsaros,D., Scorilas,A., Fracchioli,S., Piccinno,R., Rigault de la Longrais IA, Howarth,D.J., and Diamandis,E.P. (2001b). Prognostic value of human kallikrein 10 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7, 2372-2379.

Luo,L. and Diamandis,E. (2000). Down-regulation of the normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene is associated with unfavourable outcome of prostate cancer., pp. 233-237.

Lyakhovitsky,A., Barzilai,A., Fogel,M., Trau,H., and Huszar,M. (2004). Expression of e-cadherin and beta-catenin in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursors. *Am. J. Dermatopathol.* 26, 372-378.

Macfarlane,S.R., Seatter,M.J., Kanke,T., Hunter,G.D., and Plevin,R. (2001). Proteinase-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 53, 245-282.

Magklara,A., Mellati,A.A., Wasney,G.A., Little,S.P., Sotiropoulou,G., Becker,G.W., and Diamandis,E.P. (2003). Characterization of the enzymatic activity of human kallikrein 6:

Autoactivation, substrate specificity, and regulation by inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 948-955.

Magklara,A., Scorilas,A., Catalona,W.J., and Diamandis,E.P. (1999). The combination of human glandular kallikrein and free prostate-specific antigen (PSA) enhances discrimination between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in patients with moderately increased total PSA. *Clin. Chem.* 45, 1960-1966.

Magklara,A., Scorilas,A., Katsaros,D., Massobrio,M., Yousef,G.M., Fracchioli,S., Danese,S., and Diamandis,E.P. (2001). The human KLK8 (neuropsin/ovasin) gene: identification of two novel splice variants and its prognostic value in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 806-811.

Magklara,A., Scorilas,A., Stephan,C., Kristiansen,G.O., Hauptmann,S., Jung,K., and Diamandis,E.P. (2000). Decreased concentrations of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in malignant versus nonmalignant prostatic tissue. *Urology* 56, 527-532.

Mallbris,L., O'Brien,K.P., Hulthen,A., Sandstedt,B., Cowland,J.B., Borregaard,N., and Stahle-Backdahl,M. (2002). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a marker for dysregulated keratinocyte differentiation in human skin. *Exp. Dermatol.* 11, 584-591.

Marks,F. and Furstenberger,G. (1990). The conversion stage of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11, 2085-2092.

Marks,F. and Furstenberger,G. (1995). Tumor promotion in skin. In *Chemical Induction of Cancer*, (Boston: Birkhäuser), pp. 125-160.

Marks,F. and Furstenberger,G. (2000). Cancer chemoprevention through interruption of multistage carcinogenesis. The lessons learnt by comparing mouse skin carcinogenesis and human large bowel cancer. *Eur. J. Cancer* 36, 314-329.

Marks,R. (1996). Squamous cell carcinoma. *Lancet* 347, 735-738.

Marks,R., Rennie,G., and Selwood,T.S. (1988). Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma. *Lancet* 1, 795-797.

Martin,P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.

Matsui,H., Kimura,A., Yamashiki,N., Moriyama,A., Kaya,M., Yoshida,I., Takagi,N., and Takahashi,T. (2000). Molecular and biochemical characterization of a serine proteinase predominantly expressed in the medulla oblongata and cerebellar white matter of mouse brain. *J. Biol. Chem.* 275, 11050-11057.

Meier,N., Dear,T.N., and Boehm,T. (1999). A novel serine protease overexpressed in the hair follicles of nude mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 374-378.

Mignatti,P. and Rifkin,D.B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73, 161-195.

Mitelman,F. (1994). Chromosomes, genes, and cancer. *CA Cancer J. Clin.* 44, 133-135.

- Mukhtar,H., M.A.M, and Agarwal,R. (2004). Skin cancer: mechanisms and human relevance. Hasan Mukhtar, ed. (Boca Raton: CRC Press), pp. 3-8.
- Murphy,G., Ward,R., Gavrilovic,J., and Atkinson,S. (1992). Physiological mechanisms for metalloproteinase activation. *Matrix Suppl 1*, 224-230.
- Nawrocki,B., Polette,M., Van Hengel,J., Tournier,J.M., Van Roy,F., and Birembault,P. (1998). Cytoplasmic redistribution of E-cadherin-catenin adhesion complex is associated with down-regulated tyrosine phosphorylation of E-cadherin in human bronchopulmonary carcinomas. *Am. J. Pathol.* 153, 1521-1530.
- Nelson,M.A., Einspahr,J.G., Alberts,D.S., Balfour,C.A., Wymer,J.A., Welch,K.L., Salasche,S.J., Bangert,J.L., Grogan,T.M., and Bozzo,P.O. (1994). Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett.* 85, 23-29.
- Ni,X., Zhang,W., Huang,K.C., Wang,Y., Ng,S.K., Mok,S.C., Berkowitz,R.S., and Ng,S.W. (2004). Characterisation of human kallikrein 6/protease M expression in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 91, 725-731.
- Nishizuka,Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233, 305-312.
- Nishizuka,Y. (1989). Studies and prospectives of the protein kinase c family for cellular regulation. *Cancer* 63, 1892-1903.
- Nishizuka,Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9, 484-496.
- Noel,A., Gilles,C., Bajou,K., Devy,L., Kebers,F., Lewalle,J.M., Maquoi,E., Munaut,C., Remacle,A., and Foidart,J.M. (1997). Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis* 17, 221-239.
- Nyberg,P., Moilanen,M., Paju,A., Sarin,A., Stenman,U.H., Sorsa,T., and Salo,T. (2002). MMP-9 activation by tumor trypsin-2 enhances in vivo invasion of human tongue carcinoma cells. *J. Dent. Res.* 81, 831-835.
- Nylander-Lundqvist,E., Back,O., and Egelrud,T. (1996). IL-1 beta activation in human epidermis. *J. Immunol.* 157, 1699-1704.
- Nylander-Lundqvist,E. and Egelrud,T. (1997). Formation of active IL-1 beta from pro-IL-1 beta catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme in vitro. *Acta Derm. Venereol.* 77, 203-206.
- Obiezu,C.V., Scorilas,A., Katsaros,D., Massobrio,M., Yousef,G.M., Fracchioli,S., Rigault de la Longrais IA, Arisio,R., and Diamandis,E.P. (2001). Higher human kallikrein gene 4 (KLK4) expression indicates poor prognosis of ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 7, 2380-2386.
- Oft,M., Heider,K.H., and Beug,H. (1998). TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr. Biol.* 8, 1243-1252.

- Ohtani,H. (1998). Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. *Pathol. Int.* 48, 1-9.
- Overall,C.M. and Lopez-Otin,C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer* 2, 657-672.
- Paciucci,R., Vila,M.R., Adell,T., Diaz,V.M., Tora,M., Nakamura,T., and Real,F.X. (1998). Activation of the urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor system and redistribution of E-cadherin are associated with hepatocyte growth factor-induced motility of pancreas tumor cells overexpressing Met. *Am. J. Pathol.* 153, 201-212.
- Parks,W.C. (1999). Matrix metalloproteinases in repair. *Wound. Repair Regen.* 7, 423-432.
- Patterson,B.C. and Sang,Q.A. (1997). Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J. Biol. Chem.* 272, 28823-28825.
- Pedersen,T.X., Leethanakul,C., Patel,V., Mitola,D., Lund,L.R., Dano,K., Johnsen,M., Gutkind,J.S., and Bugge,T.H. (2003). Laser capture microdissection-based in vivo genomic profiling of wound keratinocytes identifies similarities and differences to squamous cell carcinoma. *Oncogene* 22, 3964-3976.
- Perona,J.J. and Craik,C.S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* 4, 337-360.
- Petersen,S., Aninat-Meyer,M., Schluns,K., Gellert,K., Dietel,M., and Petersen,I. (2000). Chromosomal alterations in the clonal evolution to the metastatic stage of squamous cell carcinomas of the lung. *Br. J. Cancer* 82, 65-73.
- Petraki,C.D., Gregorakis,A.K., Papanastasiou,P.A., Karavana,V.N., Luo,L.Y., and Diamandis,E.P. (2003). Immunohistochemical localization of human kallikreins 6, 10 and 13 in benign and malignant prostatic tissues. *Prostate Cancer Prostatic. Dis.* 6, 223-227.
- Pierceall,W.E., Goldberg,L.H., Tainsky,M.A., Mukhopadhyay,T., and Ananthaswamy,H.N. (1991). Ras gene mutation and amplification in human nonmelanoma skin cancers. *Mol. Carcinog.* 4, 196-202.
- Pierceall,W.E., Kripke,M.L., and Ananthaswamy,H.N. (1992). N-ras mutation in ultraviolet radiation-induced murine skin cancers. *Cancer Res.* 52, 3946-3951.
- Pretlow,T.G., Pretlow,T.P., Yang,B., Kaetzel,C.S., Delmoro,C.M., Kamis,S.M., Bodner,D.R., Kursh,E., Resnick,M.I., and Bradley,E.L., Jr. (1991). Tissue concentrations of prostate-specific antigen in prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Int. J. Cancer* 49, 645-649.
- Quintanilla,M., Haddow,S., Jonas,D., Jaffe,D., Bowden,G.T., and Balmain,A. (1991). Comparison of ras activation during epidermal carcinogenesis in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 12, 1875-1881.

- Rasheed,S., Nelson-Rees,W.A., Toth,E.M., Arnstein,P., and Gardner,M.B. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33, 1027-1033.
- Rennecke,J., Rehberger,P.A., Furstenberger,G., Johannes,F.J., Stohr,M., Marks,F., and Richter,K.H. (1999). Protein-kinase-Cmu expression correlates with enhanced keratinocyte proliferation in normal and neoplastic mouse epidermis and in cell culture. *Int. J. Cancer* 80, 98-103.
- Rheinwald,J.G., Hahn,W.C., Ramsey,M.R., Wu,J.Y., Guo,Z., Tsao,H., De Luca,M., Catricala,C., and O'Toole,K.M. (2002). A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol. Cell Biol.* 22, 5157-5172.
- Rittenhouse,H.G., Finlay, J.A., Mikolajczyk,S.D., and and Partin,A.W. (1998). Human kallikrein 2 (hK2) and prostate-specific antigen (PSA): two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 35, 275-368.
- Rodenhuis,S. (1992). ras and human tumors. *Semin. Cancer Biol.* 3, 241-247.
- Rodriguez-Puebla,M.L., Robles,A.I., and Conti,C.J. (1999). ras activity and cyclin D1 expression: an essential mechanism of mouse skin tumor development. *Mol. Carcinog.* 24, 1-6.
- Roop,D.R., Lowy,D.R., Tambourin,P.E., Strickland,J., Harper,J.R., Balaschak,M., Spangler,E.F., and Yuspa,S.H. (1986). An activated Harvey ras oncogene produces benign tumours on mouse epidermal tissue. *Nature* 323, 822-824.
- Rubin,G.M., Yandell,M.D., Wortman,J.R., Gabor Miklos,G.L., Nelson,C.R., Hariharan,I.K., Fortini,M.E., Li,P.W., Apweiler,R., Fleischmann,W., Cherry,J.M., Henikoff,S., Skupski,M.P., Misra,S., Ashburner,M., Birney,E., Boguski,M.S., Brody,T., Brokstein,P., Celniker,S.E., Chervitz,S.A., Coates,D., Cravchik,A., Gabrielian,A., Galle,R.F., Gelbart,W.M., George,R.A., Goldstein,L.S., Gong,F., Guan,P., Harris,N.L., Hay,B.A., Hoskins,R.A., Li,J., Li,Z., Hynes,R.O., Jones,S.J., Kuehl,P.M., Lemaitre,B., Littleton,J.T., Morrison,D.K., Mungall,C., O'Farrell,P.H., Pickeral,O.K., Shue,C., Vossball,L.B., Zhang,J., Zhao,Q., Zheng,X.H., and Lewis,S. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204-2215.
- Saez,E., Rutberg,S.E., Mueller,E., Oppenheim,H., Smoluk,J., Yuspa,S.H., and Spiegelman,B.M. (1995). c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* 82, 721-732.
- Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.
- Scarlsbrick,I.A., Towner,M.D., and Isackson,P.J. (1997). Nervous system-specific expression of a novel serine protease: regulation in the adult rat spinal cord by excitotoxic injury. *J. Neurosci.* 17, 8156-8168.
- Schafer,B.W., Wicki,R., Engelkamp,D., Mattei,M.G., and Heizmann,C.W. (1995). Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 25, 638-643.

- Schlingemann, J., Hess, J., Wrobel, G., Breitenbach, U., Gebhardt, C., Steinlein, P., Kramer, H., Furstenberger, G., Hahn, M., Angel, P., and Lichter, P. (2003). Profile of gene expression induced by the tumour promotor TPA in murine epithelial cells. *Int. J. Cancer* *104*, 699-708.
- Schlomann, U., Wildeboer, D., Webster, A., Antropova, O., Zeuschner, D., Knight, C.G., Docherty, A.J., Lambert, M., Skelton, L., Jockusch, H., and Bartsch, J.W. (2002). The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* *277*, 48210-48219.
- Schmitz, A., Tikkanen, R., Kirfel, G., and Herzog, V. (2002). The biological role of the Alzheimer amyloid precursor protein in epithelial cells. *Histochem. Cell Biol.* *117*, 171-180.
- Seals, D.F. and Courtneidge, S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* *17*, 7-30.
- She, Q.B., Chen, N., Bode, A.M., Flavell, R.A., and Dong, Z. (2002). Deficiency of c-Jun-NH(2)-terminal kinase-1 in mice enhances skin tumor development by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* *62*, 1343-1348.
- Shimamura, T., Sakamoto, M., Ino, Y., Sato, Y., Shimada, K., Kosuge, T., Sekihara, H., and Hirohashi, S. (2003). Dysadherin overexpression in pancreatic ductal adenocarcinoma reflects tumor aggressiveness: relationship to e-cadherin expression. *J. Clin. Oncol.* *21*, 659-667.
- Sibilia, M., Fleischmann, A., Behrens, A., Stingl, L., Carroll, J., Watt, F.M., Schlessinger, J., and Wagner, E.F. (2000). The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell* *102*, 211-220.
- Siemes, C., Quast, T., Klein, E., Bieber, T., Hooper, N.M., and Herzog, V. (2004). Normalized proliferation of normal and psoriatic keratinocytes by suppression of sAPPalpha-release. *J. Invest Dermatol.* *123*, 556-563.
- Silverthorn, D.U. (2004). *Human Physiology. An integrated approach.* (New Jersey, USA: Prentice Hall).
- Singer, A.J. and Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* *341*, 738-746.
- Smith, M.S., Lechago, J., Wines, D.R., MacDonald, R.J., and Hammer, R.E. (1992). Tissue-specific expression of kallikrein family transgenes in mice and rats. *DNA Cell Biol.* *11*, 345-358.
- Snow, S.N., Sahl, W., Lo, J.S., Mohs, F.E., Warner, T., Dekkinga, J.A., and Feyzi, J. (1994). Metastatic basal cell carcinoma. Report of five cases. *Cancer* *73*, 328-335.
- Sorsa, T., Salo, T., Koivunen, E., Tynnela, J., Konttinen, Y.T., Bergmann, U., Tuuttila, A., Niemi, E., Teronen, O., Heikkila, P., Tschesche, H., Leinonen, J., Osman, S., and Stenman, U.H. (1997). Activation of type IV procollagenases by human tumor-associated trypsin-2. *J. Biol. Chem.* *272*, 21067-21074.

- Speicher,M.R., Howe,C., Crotty,P., du,M.S., Costa,J., and Ward,D.C. (1995). Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 55, 1010-1013.
- Stephan,C., Yousef,G.M., Scorilas,A., Jung,K., Jung,M., Kristiansen,G., Hauptmann,S., Bharaj,B.S., Nakamura,T., Loening,S.A., and Diamandis,E.P. (2003). Quantitative analysis of kallikrein 15 gene expression in prostate tissue. *J. Urol.* 169, 361-364.
- Stern,M.C., Duran,H.A., McKenna,E.A., and Conti,C.J. (1997). Increased apoptosis during papilloma development in mice susceptible to tumor progression. *Mol. Carcinog.* 20, 137-142.
- Stetler-Stevenson,W.G. (2001). The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 10, 383-92, x.
- Strongin,A.Y., Collier,I., Bannikov,G., Marmer,B.L., Grant,G.A., and Goldberg,G.I. (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 270, 5331-5338.
- Szabowski,A., Maas-Szabowski,N., Andrecht,S., Kolbus,A., Schorpp-Kistner,M., Fusenig,N.E., and Angel,P. (2000). c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell* 103, 745-755.
- Taguchi,M., Watanabe,S., Yashima,K., Murakami,Y., Sekiya,T., and Ikeda,S. (1994). Aberrations of the tumor suppressor p53 gene and p53 protein in solar keratosis in human skin. *J. Invest Dermatol.* 103, 500-503.
- Taipale,J. and Keski-Oja,J. (1997). Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 11, 51-59.
- Takayama,T.K., Carter,C.A., and Deng,T. (2001a). Activation of prostate-specific antigen precursor (pro-PSA) by prostin, a novel human prostatic serine protease identified by degenerate PCR. *Biochemistry* 40, 1679-1687.
- Takayama,T.K., Fujikawa,K., and Davie,E.W. (1997). Characterization of the precursor of prostate-specific antigen. Activation by trypsin and by human glandular kallikrein. *J. Biol. Chem.* 272, 21582-21588.
- Takayama,T.K., McMullen,B.A., Nelson,P.S., Matsumura,M., and Fujikawa,K. (2001b). Characterization of hK4 (prostase), a prostate-specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry* 40, 15341-15348.
- Tanimoto,H., Underwood,L.J., Shigemasa,K., Parmley,T.H., and O'Brien,T.J. (2001). Increased expression of protease M in ovarian tumors. *Tumour. Biol.* 22, 11-18.
- Tanimoto,H., Underwood,L.J., Shigemasa,K., Yan Yan,M.S., Clarke,J., Parmley,T.H., and O'Brien,T.J. (1999). The stratum corneum chymotryptic enzyme that mediates shedding and desquamation of skin cells is highly overexpressed in ovarian tumor cells. *Cancer* 86, 2074-2082.

- Thiery,J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442-454.
- Thiery,J.P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 740-746.
- Threadgill,D.W., Dlugosz,A.A., Hansen,L.A., Tennenbaum,T., Lichti,U., Yee,D., LaMantia,C., Mourton,T., Herrup,K., Harris,R.C., and . (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269, 230-234.
- Tilgen,W., Boukamp,P., Breitkreutz,D., Dzarlieva,R.T., Engstner,M., Haag,D., and Fusenig,N.E. (1983). Preservation of morphological, functional, and karyotypic traits during long-term culture and in vivo passage of two human skin squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 43, 5995-6011.
- Underwood,L.J., Tanimoto,H., Wang,Y., Shigemasa,K., Parmley,T.H., and O'Brien,T.J. (1999). Cloning of tumor-associated differentially expressed gene-14, a novel serine protease overexpressed by ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 59, 4435-4439.
- Uria,J.A., Stahle-Backdahl,M., Seiki,M., Fueyo,A., and Lopez-Otin,C. (1997). Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Res.* 57, 4882-4888.
- Vahlquist,A., Andersson,E., Coble,B.I., Rollman,O., and Torma,H. (1996). Increased concentrations of 3,4-didehydroretinol and retinoic acid-binding protein (CRABP II) in human squamous cell carcinoma and keratoacanthoma but not in basal cell carcinoma of the skin. *J. Invest Dermatol.* 106, 1070-1074.
- van den Hooff,A. (1988). Stromal involvement in malignant growth. *Adv. Cancer Res.* 50, 159-196.
- van der Schroeff,J.G., Evers,L.M., Boot,A.J., and Bos,J.L. (1990). Ras oncogene mutations in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin. *J. Invest Dermatol.* 94, 423-425.
- Vaporciyan,A.A., Putnam,J.B., Jr., and Smythe,W.R. (2004). The potential role of aprotinin in the perioperative management of malignant tumors. *J. Am. Coll. Surg.* 198, 266-278.
- Vizirianakis,I.S., Chen,Y.Q., Kantak,S.S., Tsiftoglou,A.S., and Kramer,R.H. (2002). Dominant-negative E-cadherin alters adhesion and reverses contact inhibition of growth in breast carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 21, 135-144.
- Vogelstein,B. and Kinzler,K.W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* 70, 523-526.
- Wagner,E.F. (2001). AP-1--Introductory remarks. *Oncogene* 20, 2334-2335.
- Ward,P.A. and Lentsch,A.B. (2002). Endogenous regulation of the acute inflammatory response. *Mol. Cell Biochem.* 234-235, 225-228.
- Whitelock,J.M., Murdoch,A.D., Iozzo,R.V., and Underwood,P.A. (1996). The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth

- factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J. Biol. Chem.* 271, 10079-10086.
- Wilkinson,D.G. and Green,J. (2004). In situ hybridisation and three-dimensional reconstruction of serial sections. (New York: Oxford University Press), pp. 155-171.
- Williams,R.R., Broad,S., Sheer,D., and Ragoussis,J. (2002). Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei. *Exp. Cell Res.* 272, 163-175.
- Wilson,C.L., Heppner,K.J., Labosky,P.A., Hogan,B.L., and Matrisian,L.M. (1997). Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 1402-1407.
- Woodley,D.T. (2004). Reepithelialisation. In *The molecular and cellular biology of wound repair.*, Plenum Press, ed. (New York: pp. 339-354.
- Xue,M., Thompson,P., Kelso,I., and Jackson,C. (2004). Activated protein C stimulates proliferation, migration and wound closure, inhibits apoptosis and upregulates MMP-2 activity in cultured human keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 299, 119-127.
- Yamanaka,H., He,X., Matsumoto,K., Shiosaka,S., and Yoshida,S. (1999). Protease M/neurosin mRNA is expressed in mature oligodendrocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 71, 217-224.
- Yamashiro,K., Tsuruoka,N., Kodama,S., Tsujimoto,M., Yamamura,Y., Tanaka,T., Nakazato,H., and Yamaguchi,N. (1997). Molecular cloning of a novel trypsin-like serine protease (neurosin) preferentially expressed in brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1350, 11-14.
- Yokota,J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21, 497-503.
- Young,M.R., Yang,H.S., and Colburn,N.H. (2003). Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-kappa B and Pdcd4. *Trends Mol. Med.* 9, 36-41.
- Yousef,G.M., Chang,A., and Diamandis,E.P. (2000a). Identification and characterization of KLK-L4, a new kallikrein-like gene that appears to be down-regulated in breast cancer tissues. *J. Biol. Chem.* 275, 11891-11898.
- Yousef,G.M. and Diamandis,E.P. (2001). The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr. Rev.* 22, 184-204.
- Yousef,G.M. and Diamandis,E.P. (2002). Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway? *Biol. Chem.* 383, 1045-1057.
- Yousef,G.M. and Diamandis,E.P. (2003a). An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumour markers. *Clin. Biochem.* 36, 443-452.
- Yousef,G.M. and Diamandis,E.P. (2003b). Tissue kallikreins: new players in normal and abnormal cell growth? *Thromb. Haemost.* 90, 7-16.
- Yousef,G.M., Fracchioli,S., Scorilas,A., Borgono,C.A., Iskander,L., Puopolo,M., Massobrio,M., Diamandis,E.P., and Katsaros,D. (2003a). Steroid hormone regulation and

prognostic value of the human kallikrein gene 14 in ovarian cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* *119*, 346-355.

Yousef,G.M., Kyriakopoulou,L.G., Scorilas,A., Fracchioli,S., Ghiringhello,B., Zarghooni,M., Chang,A., Diamandis,M., Giardina,G., Hartwick,W.J., Richiardi,G., Massobrio,M., Diamandis,E.P., and Katsaros,D. (2001a). Quantitative expression of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in ovarian cancer: a new independent and favorable prognostic marker. *Cancer Res.* *61*, 7811-7818.

Yousef,G.M., Luo,L.Y., Scherer,S.W., Sotiropoulou,G., and Diamandis,E.P. (1999). Molecular characterization of zyme/protease M/neurosin (PRSS9), a hormonally regulated kallikrein-like serine protease. *Genomics* *62*, 251-259.

Yousef,G.M., Magklara,A., Chang,A., Jung,K., Katsaros,D., and Diamandis,E.P. (2001b). Cloning of a new member of the human kallikrein gene family, KLK14, which is down-regulated in different malignancies. *Cancer Res.* *61*, 3425-3431.

Yousef,G.M., Magklara,A., and Diamandis,E.P. (2000b). KLK12 is a novel serine protease and a new member of the human kallikrein gene family-differential expression in breast cancer. *Genomics* *69*, 331-341.

Yousef,G.M., Obiezu,C.V., Jung,K., Stephan,C., Scorilas,A., and Diamandis,E.P. (2002a). Differential expression of Kallikrein gene 5 in cancerous and normal testicular tissues. *Urology* *60*, 714-718.

Yousef,G.M., Polymeris,M.E., Yacoub,G.M., Scorilas,A., Soosaipillai,A., Popalis,C., Fracchioli,S., Katsaros,D., and Diamandis,E.P. (2003b). Parallel overexpression of seven kallikrein genes in ovarian cancer. *Cancer Res.* *63*, 2223-2227.

Yousef,G.M., Scorilas,A., Chang,A., Rendl,L., Diamandis,M., Jung,K., and Diamandis,E.P. (2002b). Down-regulation of the human kallikrein gene 5 (KLK5) in prostate cancer tissues. *Prostate* *51*, 126-132.

Yousef,G.M., Scorilas,A., Kyriakopoulou,L.G., Rendl,L., Diamandis,M., Ponzzone,R., Biglia,N., Giai,M., Roagna,R., Sismondi,P., and Diamandis,E.P. (2002c). Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression by quantitative PCR: an independent indicator of poor prognosis in breast cancer. *Clin. Chem.* *48*, 1241-1250.

Yousef,G.M., Scorilas,A., Magklara,A., Memari,N., Ponzzone,R., Sismondi,P., Biglia,N., Abd,E.M., and Diamandis,E.P. (2002d). The androgen-regulated gene human kallikrein 15 (KLK15) is an independent and favourable prognostic marker for breast cancer. *Br. J. Cancer* *87*, 1294-1300.

Yousef,G.M., Scorilas,A., Nakamura,T., Ellatif,M.A., Ponzzone,R., Biglia,N., Maggiorotto,F., Roagna,R., Sismondi,P., and Diamandis,E.P. (2003c). The prognostic value of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *78*, 149-158.

Yousef,G.M., Stephan,C., Scorilas,A., Ellatif,M.A., Jung,K., Kristiansen,G., Jung,M., Polymeris,M.E., and Diamandis,E.P. (2003d). Differential expression of the human kallikrein gene 14 (KLK14) in normal and cancerous prostatic tissues. *Prostate* *56*, 287-292.

- Yousef,G.M., Yacoub,G.M., Polymeris,M.E., Popalis,C., Soosaipillai,A., and Diamandis,E.P. (2004). Kallikrein gene downregulation in breast cancer. *Br. J. Cancer* 90, 167-172.
- Yuspa,S.H. (1998). The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis. *J. Dermatol. Sci.* 17, 1-7.
- Yuspa,S.H., Kulesz-Martin,M., Ben,T., and Hennings,H. (1983). Transformation of epidermal cells in culture. *J. Invest Dermatol.* 81, 162s-168s.
- Zenz,R., Scheuch,H., Martin,P., Frank,C., Eferl,R., Kenner,L., Sibilina,M., and Wagner,E.F. (2003). c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling. *Dev. Cell* 4, 879-889.
- Zhang,X.P., Kamata,T., Yokoyama,K., Puzon-McLaughlin,W., and Takada,Y. (1998). Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin alphavbeta3. *J. Biol. Chem.* 273, 7345-7350.
- Ziegler,A., Jonason,A.S., Leffell,D.J., Simon,J.A., Sharma,H.W., Kimmelman,J., Remington,L., Jacks,T., and Brash,D.E. (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372, 773-776.
- Zoumpourlis,V., Papassava,P., Linardopoulos,S., Gillespie,D., Balmain,A., and Pintzas,A. (2000). High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model. *Oncogene* 19, 4011-4021.
- Zu,X.L. and Guppy,M. (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 459-465.

A.1 Anhang

A.1 Tabelle 7

Tab. 7: Induzierte Gene in murinen Plattenepithelkarzinomen.

Die Tabelle zeigt die 25 am stärksten induzierten Gene, die durch die *Microarray*-Analyse in murinen Plattenepithelkarzinomen identifiziert worden sind. Zu dem jeweiligen Gensymbol und dem Gennamen ist die Kennummer der *Lokus Link*-Datenbank sowie die Expressionsdaten der einzelnen Gene in den Stadien der TPA-behandelten Haut (TPA), im Papillom (Pap) sowie im Plattenepithelkarzinom (PEK) angegeben.

<i>Lokus Link</i>	<i>Gensymbol</i>	<i>Gen</i>	<i>TPA</i>	<i>Pap</i>	<i>PEK</i>
20202	<i>s100a9</i>	S100 Kalzium bindendes Protein A9	4,72	8,79	6,40
14873	<i>gstol</i>	Glutathion-S-Transferase Ω 1	-0,16	4,62	6,37
16666	<i>krt1-16</i>	Keratin Komplex 1, sauer, gene 16	4,88	4,75	5,71
1480	<i>gsta4</i>	Glutathion-S-Transferase α 4	1,05	4,37	5,60
56212	<i>arhg</i>	<i>ras</i> Homolog Gene Familie, Mitglied G	4,61	4,84	5,35
20568	<i>slpi</i>	<i>secretory leukocyte protease inhibitor</i>	7,20	8,43	4,9
13601	<i>ecm1</i>	Extrazelluläres Matrix Protein 1	0,52	0,94	4,10
76509	<i>1600029D21Rik</i>	RIKEN cDNA 1600029D21 Gen	1,89	0,82	4,02
17002	<i>ltf</i>	Laktotransferin	0,04	0,53	3,75
15130	<i>hhh-b2</i>	<i>Hämoglobin, α adult minor chain</i>	0,73	1,74	3,75
12443	<i>ccnd1</i>	Zyclin D1	-1,56	1,26	3,44
15122	<i>hba-a1</i>	<i>Hämoglobin α, adult chain 1</i>	0,93	1,04	3,35
72690	<i>2810043G13Rik</i>	RIKEN cDNA 2810043G13 Gen	0,95	0,25	3,35
12822	<i>col18a1</i>	Prokollagen Typ XVIII, α 1	-0,33	0,51	3,19
12843	<i>colla2</i>	Prokollagen Typ I, α 2	-1,1	-0,69	3,18
12842	<i>colla1</i>	Prokollagen Typ I, α 1	-1,3	-0,12	3,12
19240	<i>tmsb10</i>	Thymosin β 10	-0,4	-0,26	3,10
22271	<i>upp1</i>	Uridin Phosphorylase 1	-0,28	0,89	3,05
30940	<i>usp25</i>	Ubiquitin spezifische Protease 25	3,27	5,09	2,93
16668	<i>krt1-18</i>	Keratin Komplex 1, sauer, Gen 18	0,21	0,81	2,92
106258	<i>AI790442</i>	EST AI790442	0,41	1,95	2,89
20755	<i>sprp2a</i>	<i>small proline-rich protein 2A</i>	1,81	5,69	2,85
21841	<i>tia1</i>	zytotox. Granula-assoz. RNA bind. Protein 1	-0,43	0,88	2,79
20201	<i>s100a8</i>	S100 Kalzium bindendes Protein A8	2,59	5,05	2,70
20692	<i>sparc</i>	<i>secreted acidic cysteine rich glycoprotein</i>	-0,68	-0,76	2,69

A.1 Tabelle 8

Tab. 8: Reprimierte Gene in murinen Plattenepithelkarzinomen.

Die Tabelle zeigt die 25 am stärksten reprimierten Gene, die im Rahmen der Microarray-Analyse in murinen Plattenepithelkarzinomen identifiziert wurden. Zu dem jeweiligen Gensymbol und dem Gennamen ist die Kennnummer der Locus Link-Datenbank sowie die Expressionsdaten der einzelnen Gene in den Stadien der TPA-behandelten Haut (TPA), im Papillom (Pap) sowie im Plattenepithelkarzinom (PEK) angegeben.

<i>Locus Link</i>	<i>Gensymbol</i>	<i>Gen</i>	<i>TPA</i>	<i>Pap</i>	<i>PEK</i>
12971	<i>crym</i>	Kristallin, mu	-5,55	-4,50	-3,41
56615	<i>mgst1</i>	mikrosomale Glutathion-S-Transferase 1	0,27	-2,04	-3,53
80888	<i>hspb8</i>	Hitzeschock 27 kDa Protein 8	-0,46	-4,30	-3,57
20197	<i>s100a3</i>	S100 Kalzium bindendes Protein A3	-6,67	-6,91	-3,57
57390	<i>Psors1c2</i>	<i>psoriasis susceptibility 1 candidate 2</i>	-2,71	-2,59	-3,79
227753	<i>gsn</i>	Gelsolin	0,16	-3,24	-3,98
20249	<i>scd1</i>	Stearoyl-Koenzym A Desaturase 1	-0,38	-5,78	-4,01
17901	<i>myl1</i>	Myosin, schweres Polypeptid 1	-0,10	-3,06	-4,04
18642	<i>pfkm</i>	Phosphofruktokinase, Muskel	-0,20	-3,24	-4,09
17882	<i>myh2</i>	Myosin, schweres Polypeptide 2	-0,43	-7,13	-4,25
76933	<i>2310061N23Rik</i>	RIKEN cDNA 2310061N23 Gen	0,17	-3,73	-4,29
21957	<i>tnnt3</i>	Troponin T3	0,26	-5,94	-4,49
17885	<i>myh8</i>	Myosin, schweres Polypeptid 8	-0,21	-7,80	-4,52
11537	<i>adn</i>	Adipsin	-0,24	-5,97	-4,74
17882	<i>myh2</i>	Myosin, schweres Polypeptid 2	-0,25	-6,68	-4,76
57262	<i>retnl</i>	Resistin-ähnlich α	0,17	-4,54	-4,76
19018	<i>scand1</i>	<i>SCAN domain-containing 1</i>	0,44	-3,41	-4,83
12350	<i>car3</i>	<i>carbonic anhydrase 3</i>	0,03	-3,03	-5,05
20301	<i>ccl27</i>	Chemokin (C-C Motiv) Ligand 2	-1,88	-3,42	-5,29
76561	<i>snx7</i>	sorting nexin 7	0,62	-2,10	-5,40
12862	<i>cox6a2</i>	Zytochrom C Oxidase, UE VI a, Polypeptid 2	0,24	-6,50	-5,49
17355	<i>mlt2h</i>	Homolog zum humanen MLLT2 Gen	0,50	-6,84	-5,49
21953	<i>tnni2</i>	Troponin I 2	0,72	-8,39	-5,53
11937	<i>atp2a1</i>	ATPase, Ca ²⁺ Transport, Herzmuskel	-0,10	-8,37	-5,64
140570	<i>plxnb2</i>	Plexin B2	-1,16	-7,51	-5,75

A.1 Tabelle 9

Tab. 9: Nachweis von Kallikreinen auf Nukleinsäure- (KLK) oder Proteinebene (hK) in verschiedenen humanen Tumoren und deren mögliche klinische Anwendung.
(modifiziert nach Yousef und Diamandis, 2003)

<i>Kallikrein</i>	<i>Nachweis</i>	<i>Tumor</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Literaturnachweis</i>
hK2	Serum, Gewebe	Prostata, Brust	Diagnose, Prognose, „Monitoring“	(Magklara et al., 1999)
hK3 (PSA)	Serum, Gewebe	Prostata Brust	Diagnose, Prognose, „Monitoring“	(Rittenhouse et al., 1998)
<i>KLK4</i>	Gewebe	Ovar	neg. Prognose	(Obiezu et al., 2001)
<i>KLK5</i>	Gewebe	Ovar	neg. Prognose	(Kim et al., 2001)
	Cytosol	Brust	neg. Prognose	(Yousef et al., 2002c)
	Gewebe	Prostata	reduzierte Expression in aggressiveren Tumoren	(Yousef et al., 2002b)
	Gewebe	Hoden	Abnahme der Expression in späteren Tumorstadien	(Yousef et al., 2002a)
hK6	Serum	Ovar	Diagnose, Prognose, „Monitoring“	(Diamandis et al., 2000a)
	Cytosol	Brust	Prognose: Assoziation mit Hormonrezeptoren	(Yousef and Diamandis, 2003a)
<i>KLK6</i>	mRNA	Ovar	erhöhte Expression im Tumorgewebe	(Tanimoto et al., 2001)
<i>KLK7</i>	mRNA	Ovar	erhöhte Expression im Tumorgewebe	(Tanimoto et al., 1999)
<i>KLK8</i>	mRNA	Ovar	pos. Prognose	(Magklara et al., 2001)
	mRNA	Ovar	erhöhte Expression im Tumorgewebe	(Underwood et al., 1999)
<i>KLK9</i>	mRNA	Ovar	pos. Prognose	(Yousef et al., 2001a)
	mRNA	Brust	pos. Prognose	(Yousef et al., 2003c)
hK10	Serum	Ovar	Diagnose, „Monitoring“	(Luo et al., 2001b; Luo et al., 2001a)
	Cytosol	Ovar	neg. Prognose bei hohen Konzentrationen	(Yousef and Diamandis, 2003a)
hK11	Serum	Ovar	Diagnose, Prognose	(Diamandis et al., 2002)
<i>KLK12</i>	mRNA	Brust	reduzierte Expression im Tumorgewebe	(Yousef et al., 2000b)
<i>KLK13</i>	mRNA	Brust	reduzierte Expression in einigen Tumorgeweben	(Yousef et al., 2000a)
<i>KLK14</i>	mRNA	Ovar	pos. Prognose	(Yousef et al., 2003a)
	mRNA	Brust	reduzierte Expression im Tumorgewebe	(Yousef et al., 2001b)
	mRNA	Hoden	reduzierte Expression im Tumorgewebe	(Yousef et al., 2001b)
<i>KLK15</i>	mRNA	Ovar	neg. Prognose	(Yousef and Diamandis, 2003a)
	mRNA	Brust	pos. Prognose	(Yousef et al., 2002d)
	Gewebe	verschiedene	pos. Prognose	(Yousef and Diamandis, 2003a)

A.2 Abkürzungen

Allgemein

a	Adenin
Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
BSSP	<i>brain and skin serine protease</i>
BZK	Basalzellkarzinom
c	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CMV	Zytomegalovirus
cpm	<i>counts per minute</i>
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
dH ₂ O	steriles destilliertes Wasser
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles's Medium</i>
DMBA	7,12-Dimethylbenzanthracen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonalentwicklung
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i> -Lösung
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötale Kälberserum
g	Guanin/Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat Dehydrogenase

GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
hK	humanes Kallikrein Protein
k	kilo
KA	Keratoakathom
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
KLK	humanes Kallikrein Gen
NMSC	<i>non-melanoma skin cancer</i>
M	molar (Mol/Liter)
MBq	Megabequerel
min	Minute(n)
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
OD	optische Dichte
p.a.	Analyse-rein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pap	Papillom
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEK	Plattenepithelkarzinom
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSA	Prostata-spezifisches Antigen (<i>KLK3</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde(n)
SSC	<i>standard saline citrate</i>
SSH	<i>suppression subtractive hybridisation</i>
Std.	Stunde(n)
T	Thymin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
U	Enzymeinheit (<i>unit</i>)

UE	Untereinheit
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolette Strahlung
v/v	Volumen-Volumenverhältnis
w/v	Gewichts-Volumenverhältnis

Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

A.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. P. Angel danke ich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in seiner Abteilung durchführen zu können. Desweiteren möchte ich mich für seine stetige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und für die zahlreichen Gelegenheiten, mein Projekt auf Kongressen präsentieren zu können, bedanken.

Frau Priv.-Doz. Dr. R. Nischt danke ich für die Betreuung, die Übernahme des Erstgutachtens und für ihr beständiges Interesse am Fortschritt dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. J. Brüning und Herrn Prof. Dr. S. Roth bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr. J. Hess gilt mein Dank für die Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit, seine Geduld und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. B. Hartenstein und Frau S. Teurich danke ich für Ihre Unterstützung bei der Zucht der transgenen Mäuse.

Bei Herrn Dr. G. Fürstenberger bedanke ich mich für die Bereitstellung des murinen und bei Frau Prof. Dr. C. Mauch für die Bereitstellung des humanen Tumormaterials und der SCL-Zelllinien sowie für ihre Hilfsbereitschaft bei technischen Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. M. Blaber danke ich dafür, dass er mir den anti-MSP-Antikörper zur Verfügung gestellt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Lichter und bei Lars Hummerich möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Hautkarzinogenese-Projekt bedanken.

Frau I. Vogt gilt mein Dank für die technische Unterstützung.

Lore Florin und Dr. B. Dittrich danke ich für die Bereitstellung der Wundkinetik-cDNAs und der Kryo-Wundheilungsschnitte.

Für die kritische und konstruktive Durchsicht dieses Manuskriptes gilt mein Dank Dr. J. Hess, Lore Florin und Verena Proft. Ausserdem möchte ich Lore Florin für ihre wertvolle Hilfe bei Computerproblemen danken.

Allen Doktoranden und Diplomanden unserer Abteilung danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung sowie für die angenehme Atmosphäre im Labor.

Letztlich gilt mein allergrößter Dank meiner Mutter und Dirk.

A.4 Lebenslauf

Zur Person

Name: Regina Susanne Müller
Adresse: Wörthstr. 3, 69115 Heidelberg
Geburtsdatum: 11. August 1976
Geburtsort: Köln
Staatsangehörigkeit: deutsch

Hochschulbildung

Nov. 2001–Jan. 2005 Durchführung des experimentellen Teils der Doktorarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg in der Abteilung „Signaltransduktion und Wachstumskontrolle“ von Prof. Dr. P. Angel;
Betreuung durch Frau Priv.-Doz. Dr. R. Nischt, Institut für Genetik, Universität zu Köln

Nov. 2000–Sept. 2001 Diplomarbeit am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät bei Prof. Dr. M. Paulsson

Okt. 1996–Sept. 2001 Studium der Biologie an der Universität zu Köln

Schulbildung

1987–1996 Liebfrauenschule (erzbischöfl. Gymnasium), Köln

1983–1987 kath. Grundschule Berrenrather Str., Köln

A.5 Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Priv.-Doz. Dr. R. Nischt betreut worden.

Köln, den 30. November 2004

Regina Müller

Teilpublikationen:

Hummerich, L.*, Müller, R.*, Hess, J., Kokocinszki, F., Hahn, M., Fürstenberger, G., Mauch, C., Lichter, P., Angel, P. (2004). *Identification of novel tumor-associated genes during the process of squamous cell cancer development*. (Manuskript eingereicht)

Hummerich, L.*, Müller, R.*, van der Sanden, M., Kokocinszki, F., Hahn, M., Fürstenberger, G., Mauch, C., Lichter, P., Angel, P., Hess, J. (2004): *Involvement of S100 family members in nonmelanoma skin carcinogenesis*. (Manuskript in Vorbereitung)

* *Both authors contributed equally to this work.*

