

Halschirurgie der Philipps-Universität Marburg
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner)

DIE S19 mRNA-EXPRESSION IN
PLATTENEPIHELKARZINOMEN DES OBEREN
AERODIGESTIVTRAKTES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Verena Sengpiel, geb. Pyritz

aus Bielefeld

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 02.06.2005,
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. J. A. Werner

Correferent: Prof. Dr. F. Czubayko

für Aenne

1. INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | INHALTSVERZEICHNIS..... | 4 |
| 2. | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 5 |
| 3. | EINLEITUNG | 6 |
| 4. | FRAGESTELLUNG | 8 |
| 5. | MATERIAL UND METHODEN | 9 |
| 5.1. | Geräte | 9 |
| 5.2. | Herkunft der Gewebeproben und Zelllinien..... | 10 |
| 5.3. | Etablierung und Kultivierung der Referenzzelllinien | 11 |
| 5.4. | Subkultivierung der Karzinomzelllinien..... | 12 |
| 5.5. | Extraktion der Gesamt-RNS | 12 |
| 5.6. | Messung der RNS-Konzentration | 13 |
| 5.7. | Kontrolle der RNS-Qualität | 14 |
| 5.8. | Reverse Transkription der mRNS | 14 |
| 5.9. | Polymerasekettenreaktion | 15 |
| 5.10. | Agarosegelelektrophorese | 16 |
| 5.11. | Sequenzierung der amplifizierten DNS..... | 17 |
| 5.12. | Dokumentation und Auswertung | 18 |
| 6. | ERGEBNISSE..... | 19 |
| 6.1. | Amplifikation der S19, S6, S14 und β Aktin Genfragmente..... | 19 |
| 6.2. | Sequenzierungsergebnisse und Datenbankvergleich | 22 |
| 6.3. | Analyse und Auswertung der gewonnenen Daten | 23 |
| 6.3.1. | Zusammenhang zwischen der Expression der untersuchten mRNS- Moleküle und klinischen Parametern | 27 |
| 6.3.2. | Vergleich zwischen der S19, S6 und S14 mRNS-Expression | 28 |
| 7. | DISKUSSION | 29 |
| 7.1. | Lokalisation und Struktur des S19 | 29 |
| 7.2. | Funktion der RP und des S19 im Besonderen | 30 |
| 7.2.1. | Ribosomale Funktionen | 30 |
| 7.2.2. | Extraribosomale Funktionen | 31 |
| 7.3. | Das S19 Expressionsmuster bei verschiedenen malignen Erkrankungen..... | 33 |
| 7.4. | Vergleich zwischen der S19, S6 und S14 mRNS-Expression | 36 |
| 7.4.1. | Regulation der RP in gesunden Zellen..... | 36 |
| 7.4.2. | Expression der S6 und S14 mRNS in den HNSCC Proben | 38 |
| 7.5. | Ausblick | 39 |
| 8. | ZUSAMMENFASSUNG..... | 41 |
| 9. | ANHANG | 42 |
| 10. | LITERATURVERZEICHNIS | 44 |
| 11. | DANKSAGUNG | 56 |
| 12. | VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER | 57 |
| 13. | EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG | 58 |

2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------|--|
| cDNS | <i>Copy</i> Desoxyribonukleinsäure |
| CUP | <i>Carcinoma of Unknown Primary</i> |
| DBA | <i>Diamond-Blackfan Anaemia</i> |
| DDRT-PCR | <i>Differential Display</i> RT-PCR |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i> |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamin-Tetraacetat |
| FCS | <i>Fetal Calf Serum</i> |
| HNSCC | <i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i> |
| KeraSFM | <i>Keratinocytes-Serum-Free-Medium</i> |
| mRNS | <i>Messenger</i> Ribonukleinsäure |
| O.D. | Optische Dichte |
| ORF | <i>Open Reading Frame</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| REE | Relative Expressions-Einheiten |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| RP | Ribosomales Protein |
| rRNS | Ribosomale Ribonukleinsäure |
| RT | Reverse Transkription |
| S19, S6, S14, S29 | Ribosomales Protein S19, S6, S14, S29 |
| SCC | <i>Squamous Cell Carcinoma</i> |
| TAE | Tris (Hydroxymethylaminomethan)-Azetat-EDTA |
| TNM | Tumor, Nodi lymphatici, Metastase (internationales System zur Einteilung der klinischen Stadien einer malignen Erkrankung) |
| tRNS | Transfer-Ribonukleinsäure |
| UMSCC | <i>University of Michigan Squamous Cell Carcinoma</i> |
| UTSCC | <i>University of Turku Squamous Cell Carcinoma</i> |
| UTR | <i>Untranslated Region</i> |

3. EINLEITUNG

Maligne Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes stellen einen Anteil von 6% der jährlich neu auftretenden malignen Erkrankungen [Parkin et al., 1999]. Unter den verschiedenen Tumorentitäten überwiegen die Plattenepithelkarzinome (*Squamous Cell Carcinoma*, SCC) mit etwa 90% [Ferlito et al., 1995]. Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr, wobei Männer zurzeit noch dreimal so häufig betroffen sind wie Frauen [Lewin et al., 1998; Sankaranarayanan et al., 1998; Parkin et al., 1999; Pisani et al., 1999]. Neben genetischen [Copper et al., 1995; Foulkes et al., 1996] spielen exogene Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von *Head And Neck Squamous Cell Carcinoma* (HNSCC). Als Risikofaktoren gelten der Tabak- und übermäßiger Alkoholkonsum - besonders in Kombination -, das Kauen von Betelnüssen, eine schlechte Mundhygiene, das Trinken von Mate-Tee sowie der häufige Verzehr von auf Holzkohle gegrillten Speisen, wohingegen karotinreichem Gemüse und Zitrusfrüchten protektiver Charakter zugeschrieben wird [Moore C, 1971; Franco et al., 1989; Pintos et al., 1994; Fracchiolla et al., 1995; Foulkes et al., 1996; Lewin et al., 1998; Sankaranarayanan et al., 1998; Parkin et al., 1999; Pisani et al., 1999]. Während die 5-Jahres-Überlebensrate für lokalisierte Larynxkarzinome bei über 80% liegt, überleben weniger als 20% der Patienten mit einem Hypopharynxkarzinom diesen Zeitraum. Diese teilweise schlechte Prognose lässt sich auf die hohe Metastasierungstendenz, die ausgeprägte Rezidivneigung sowie das häufige Auftreten von Zweitkarzinomen zurückführen [Werner et al., 1997; Sankaranarayanan et al., 1998; Pisani et al., 1999]. Gerade HNSCC sind für Betroffene stark belastende Erkrankungen, welche die Nahrungsaufnahme und das Sprechvermögen beeinträchtigen und zu stigmatisierenden Entstellungen im Kopf-Hals-Bereich führen können [Foulkes et al., 1996]. Dementsprechend besteht großes Interesse, Ätiologie und Karzinogenese der HNSCC zu erforschen, sowie neue Möglichkeiten der Diagnose- und Prognosestellung zu finden, die bei der Auswahl individueller Therapieschemata behilflich sein können. Es hat sich gezeigt, dass rein histopathologische Techniken nicht ausreichend zwischen den verschiedenen Krankheitsformen und -stadien zu differenzieren vermögen [Fracchiolla et al., 1995; Masuda et al., 1996; Unal et al., 1999]. Die Molekularbiologie

eröffnet hier neue Möglichkeiten: Die Entwicklung eines Karzinoms beruht auf einer Akkumulation von genetischen Veränderungen in einem Zellklon, welche mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden nachgewiesen werden können [Bishop JM, 1987; Weinberg RA, 1989; Hunter T, 1991]. Neben Prognose und Diagnose besteht zudem Hoffnung auf die Möglichkeit therapeutischer Intervention durch das Aufspüren von sogenannten *Target Genes*.

Eine Möglichkeit, das aktuelle Genexpressionsmuster einer Zelle zu erfassen, liegt in der Untersuchung der *messenger* Ribonukleinsäuren (mRNS) einer Zelle. Für HNSCC wurde mittels Differential Display RT-PCR (DDRT-PCR) ein verändert exprimiertes mRNS-Fragment gefunden, welches als Teil des ribosomalen Proteins (RP) S19 (S19) identifiziert werden konnte [Rathcke et al., 2000]. Als Baustein der Ribosomen ist das S19 an der Proteinsynthese beteiligt [Capel et al., 1987]. Zudem besitzt dieses Protein wie auch andere RP verschiedene extraribosomale Funktionen [Wool IG, 1996]. Veränderte S19 und S19 mRNS-Level wurden bisher für SCC des menschlichen Gastrointestinaltraktes [Kondoh et al., 1992], Leiomyome des Uterus, Zystadenokarzinome der Parotis, Pankreas- und Mammakarzinome [Li et al., 2002] sowie für Neoplasien der Gonaden bei der Seemuschel *Mya arenaria* nachgewiesen [Rhodes et Van Beneden, 1997]. Ob die veränderte S19 Expression in Malignomen Ursache oder Folge der Karzinogenese ist, konnte bisher ebenso wenig geklärt werden wie die Frage, ob die veränderten Expressionslevel im Zusammenhang mit den ribosomalen oder extraribosomalen Funktionen des S19 stehen.

In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob sich die Ergebnisse der DDRT-PCR-Voruntersuchungen für HNSCC in einer größeren Probenanzahl bestätigen lassen. Hierzu wurden die S19 mRNS-Level in 18 HNSCC- im Vergleich zu 17 benignen Keratinozytenzelllinien sowie 30 HNSCC- im Vergleich zu 8 Referenzgewebeproben anhand von reverse Transkription-PCR (RT-PCR) mit spezifischen S19 *Primern* untersucht. Um herauszufinden, ob isoliert die S19 mRNS-Expression betroffen ist oder ob die Veränderung mehrere RP - als gemeinsame Bausteine der Ribosomen - betrifft, wurden zwei weitere RP-mRNS-Moleküle mit derselben Methodik untersucht. Korrelationen mit Krankheits- und Patientenparametern wurden berechnet, um die S19 mRNS-Expression auf ihre Zuverlässigkeit als Tumormarker für HNSCC zu testen.

4. FRAGESTELLUNG

Dieser Arbeit liegen folgende Fragestellungen zugrunde:

1. Kann die mittels DDRT-PCR nachgewiesene veränderte S19 mRNA-Expression in zwei HNSCC Zelllinien im Vergleich zu zwei benignen Keratinozytenzelllinien [Rathcke et al., 2000] in RT-PCR-Untersuchungen mit spezifischen S19 *Primern* in einer größeren Anzahl von HNSCC Zelllinien bestätigt werden?
2. Lassen sich die für die Zelllinien erhobenen Expressionsunterschiede auch in HNSCC Gewebeproben von Malignom-Patienten nachweisen?
3. In welchem Ausmaß ist die Expression der S19 mRNA in HNSCC Zelllinien und Gewebeproben im Vergleich zu Proben aus benignen Epithelzellen und Schleimhautbiopsaten verändert?
4. Gibt es Korrelationen zwischen dem S19 mRNA-Expressionsgrad in HNSCC Zelllinien/Geweben und klinisch-pathologischen Daten der Patienten?
5. Ist die veränderte Expression der S19 mRNA lediglich auf eine veränderte Ribosomenanzahl zurückzuführen oder wurde das S19 aus der normalerweise streng koordinierten Regulation der ribosomalen Bestandteile entkoppelt?

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Geräte

| | |
|-----------------------------|---|
| Automatische Pipettierhilfe | Pipetus Akku, Hirschmann Laborgeräte, Nunc TM Brand Products, Wiesbaden, Deutschland, |
| Begasungsbrutschrank | BB16, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland, |
| Biophotometer | Eppendorf, Hamburg, Deutschland, |
| Dokumentationssystem | Gel Doc 2000, Biorad, Hercules, CA, USA, |
| Eismaschine | Ziegra, Bergneustadt, Deutschland, |
| Elektrophoresezelle | Eastman Kodak Company, New Haven, CT, USA, |
| Gefrierkühltruhe | Nuaire (-85°C Ultralow Freezer), ZAPF Instruments, Sarstedt, Deutschland, |
| Kühlschränke | Liebherr Glass Line (+4°C), Bieberach, Deutschland, Liebherr Öko Super (-28°C), |
| Lichtmikroskop | Telaval 31, Zeiss, Göttingen, Deutschland, |
| Mikrowelle | Philips Space CUBE 50, M734, Hamburg, Deutschland, |
| Mörser und Stößel | Haldenwanger, Berlin, Deutschland, |
| Rührgerät | Heidolph MR 2002, Schwabach, Deutschland, |
| Sicherheitswerkbank | Köttermann 8581, Uetze, Deutschland, |
| Thermal Printer | DPU-414 Seiko Instruments Inc., Neu-Isenberg, Deutschland, |
| Thermal Cycler | HYBAID Omni Gene, Heidelberg, Deutschland, |
| UV-Lampe | Roth Chemikalien Laborbedarf, Karlsruhe, Deutschland, |
| Voltmeter | BioMax MBP 300, Kodak, New Haven, CT, USA, |
| Vortexer | Heidolph REAX 2000, |
| Wasserbad | Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland, |
| Digitalwaage | Sartorius handy, Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland, |
| Zentrifugen | Labofuge 400 R, Heraeus Instruments, CHRIST Medifuge, Heraeus Instruments. |

5.2. Herkunft der Gewebeproben und Zelllinien

Es wurden sowohl HNSCC und benigne Keratinozytenzelllinien als auch HNSCC und benigne Gewebeproben untersucht. Die Lagerung und Untersuchung der Proben geschah mit dem Einverständnis der Patienten gemäß einer von der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg empfohlenen mündlichen und schriftlichen Patientenaufklärung.

Die Gewebebiopsate wurden zwischen April 1998 und Oktober 2000 während diagnostischer und therapeutischer Eingriffe an der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Philipps-Universität Marburg entnommen und sofort bei -84°C tiefgefroren. Insgesamt wurden 30 Karzinomproben im Vergleich mit 8 Referenzproben untersucht. Nähere Angaben zu den einzelnen Proben wie Alter und Geschlecht des Patienten, Entnahmeort, TNM *Stage* der Erkrankung sowie zum histopathologischen *Grading* finden sich in Tabelle 1 im Anhang. Die Diagnosestellung SCC einschließlich des histologischen *Gradings* erfolgte am Medizinischen Zentrum für Pathologie der Philipps-Universität Marburg (Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Moll). Das *Staging* basierte auf der TNM-Klassifikation der *International Union Against Cancer* [TNM-Atlas, 4. Auflage 1998].

Es wurden 17 Keratinozytenzelllinien aus gesunder Schleimhaut des Nasenrachenraums, sowie insgesamt 18 HNSCC Zelllinien untersucht. Die zu den benignen Keratinozytenzelllinien sowie der Zelllinie SCC 745 gehörenden Gewebeproben wurden während therapeutischer und diagnostischer Eingriffe an der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Philipps-Universität Marburg gewonnen und in der Zellkultur des Onkologischen Labors etabliert. Die übrigen Karzinomzelllinien wurden freundlicherweise von der *University of Michigan*, USA (UMSCC: *University of Michigan Squamous Cell Carcinoma*, Dr. TE Carey) und der *University of Turku*, Finnland (UTSCC: *University of Turku Squamous Cell Carcinoma*, Dr. R Grénman) zur Verfügung gestellt. Die klinisch-pathologischen Daten zu den untersuchten Zelllinien gehen ebenfalls aus Tabelle 1 im Anhang hervor.

5.3. Etablierung und Kultivierung der Referenzzelllinien

Die frisch gewonnenen Biopsate wurden in *Keratinocyte-Serum-Free-Medium* (KeraSFM, GibcoBRL life technologies, Eggenstein, Deutschland) überführt. Dieses bestand bei einem Gesamtvolumen von 500 ml aus:

500 µg Amphotericin B (Squibb-von Heyden GmbH, München, Deutschland),
1 ng *Mycoplasma Removal Agent* (ICN Biomedicals, Meckenheim, Deutschland),
2,5 ml 10.000 U/ml Penicillin (Grünenthal GmbH, Stolberg, Deutschland),
0,625 g Streptomycin (Fatol Arzneimittel GmbH, Schiffweiler, Deutschland) sowie
Supplements für Kera Medium (GibcoBRL life technology) bestehend aus
2,5 µg *Epidermal Growth Factor* (GibcoBRL life technology) und
25 mg *Bovine Pituitary Extract* (GibcoBRL life technology).

Die weiteren Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank mit gerichteter steriler Luftstromeinrichtung. In einer Petrischale von 10 cm Durchmesser (Nunc TM Brand Products) wurden die Schleimhautbiopsate zunächst mit einem Skalpell zerkleinert und mehrere Male mit 1 x *Phosphate Buffered Saline*-Lösung (PBS, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) gewaschen. Nach Zugabe von 3 ml 2,4 U/ml Dispase (*Bacillus polymyxa*, Grade II, Boehringer Mannheim/Roche, Mannheim, Deutschland), 3,75 µl 10.000 U/ml Penicillin und 9,375 µg Streptomycin wurden die Proben 1 h bei 37°C inkubiert, um die *Lamina epithelialis mucosae* von der *Lamina propria mucosae* zu lösen. Die abgelöste *Lamina epithelialis mucosae* wurde nochmals mit 5 ml 1 x PBS gewaschen, in ein Falcon-Röhrchen (Nunc TM Brand Products) appliziert und mit 3 ml 0,02-0,05%igem Trypsin (Biochrom KG) bei 37°C für 20 - 30 min inkubiert. Um das verbliebene Trypsin zu inaktivieren, wurde zweimal mit *Fetal Calf Serum* (FCS 3154, Biochrom KG) gewaschen. Die Zellen wurden für 5 min bei 800 UpM abzentrifugiert. Das FCS wurde verworfen und das Zellpellet mit 5 ml KeraSFM resuspendiert. Die Keratinozyten wurden inklusive des Nährmediums in eine Petrischale von 10 cm Durchmesser überführt. Die Kultivierung erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei konstant 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit in 5% CO₂-gesättigter Atmosphäre. Ein Wechsel des Nährmediums erfolgte in Abhängigkeit von

der Wachstumsgeschwindigkeit alle zwei bis vier Tage. Die Zellkulturen wurden täglich unter dem Lichtmikroskop auf Wachstum und Kontamination hin kontrolliert.

5.4. Subkultivierung der Karzinomzelllinien

Die bei -70°C in flüssigem Stickstoff gelagerten Karzinomzelllinien wurden zügig bei Körpertemperatur aufgetaut. Um das Frostschutzmittel Dimethyl-Sulfoxid (Merck, Darmstadt, Deutschland) zu entfernen, wurde die Zellsuspension zunächst in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dieses wurde mit *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* (DMEM, Bio Whittaker, Verviers, Belgien) auf ein Volumen von 10 ml angefüllt und bei 800 UpM für 5 min zentrifugiert. Dabei enthielten 500 ml DMEM:

56 ml FCS,

2,5 ml 10.000 U/ml Penicillin,

0,625 g Streptomycin,

5 ml 200 mM alpha-Glutamin (Bio Whittaker, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership),

2,5 ng *Mycoplasma Removal Agent*,

500 μg Amphotericin B sowie

20 mg Gentamycin (Merck).

Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 10 ml DMEM resuspendiert und in eine Petrischale von 10 cm Durchmesser appliziert. Die Inkubation und die Wachstumskontrolle erfolgten entsprechend des Anzuchtprotokolls für Keratinozyten.

5.5. Extraktion der Gesamt-RNS

Die Petrischalen wurden aus dem Brutschrank entnommen, sobald sich ein dichter *Monolayer* gebildet hatte. Das Kulturmedium wurde mit Hilfe einer automatischen

Pipettierhilfe entfernt und der *Monolayer* zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 600 µl eines 100:1-Gemisches aus RLT Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) und β-Mercaptoethanol (Merck) gelöst. Um das Lysat zu homogenisieren, wurde die Mixtur auf eine „*QIAshredder Spin Column*“ (QIAshredder, Qiagen) gegeben und bei 13.000 UpM für 2 min zentrifugiert. Insgesamt 600 µl 70%igen Ethanol (32205, Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland) wurden hinzugefügt. Die RNS-Extraktion erfolgte mit Hilfe des „*RNeasy Mini Kits*“ (Qiagen) entsprechend der Anweisungen des Herstellers.

Die gefrorenen Gewebeproben wurden mit Mörser und Stößel unter permanentem Kühlen mit flüssigem Stickstoff pulverisiert. Bis zu 30 mg des Gewebepulvers wurden mit 600 µl eines 100:1 Gemisches aus RLT Puffer und β-Mercaptoethanol versetzt. Maximal 700 µl dieser Suspension wurden auf eine *QIAshredder Spin Column* gegeben und durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 13.000 UpM homogenisiert. Nach weiterem Zentrifugieren bei 13.000 UpM für 3 min wurden etwaige Präzipitate verworfen und der Überstand mit 600 µl 70%igen Ethanol versetzt. Die weitere Vorgehensweise entsprach der Extraktion der Gesamt-RNS aus den Zelllinien.

5.6. Messung der RNS-Konzentration

Der RNS-Gehalt des gewonnenen Eluats wurde mit Hilfe eines Photometers ermittelt. Eine Eichung des Photometers wurde vor jeder Messreihe mit Aqua dest. vorgenommen. Die Messungen erfolgten bei Wellenlängen von 260 nm, 280 nm und 320 nm, jeweils für eine 1:400 und eine 1:200 Verdünnung der Probe. Hierbei wurden Präzisionsküvetten mit 10 mm Seitenlänge (UVette 220-1600 nm, Eppendorf) verwendet, welche vor jeder einzelnen Messung mehrmals mit Aqua dest. gespült und mit Pressluft getrocknet wurden. Die RNS-Konzentration c (in µg/µl) wurde gemäß des Lambertschen Gesetzes bestimmt: $c = A \times f$ (A = Absorption), wobei das Photometer mit einem Umrechnungsfaktor von $f = 0,4 \text{ µg/µl}$ rechnete. Eine optische Dichte $(O.D.)_{260}$ von 1 entspricht dabei einer RNS-Konzentration von 40 µg/ml. Die RNS-Konzentration der Proben wurde aus dem Mittelwert der Messungen berechnet.

5.7. Kontrolle der RNS-Qualität

Um die Qualität der RNS-Proben zu prüfen, wurden von jeder Probe 10 µg Gesamt-RNS in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und auf das Auftreten der 18S und 28S ribosomale Ribonukleinsäure (rRNS) Banden hin untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein 2%iges Agarosegel gegossen: 2 g Agarose (Serva, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg, Deutschland) wurden in 100 ml 1 x Tris (Hydroxymethylaminomethan)-Azetat-EDTA-Lösung (TAE-Lösung) aufgekocht:

4,84 g Trisbase (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Carl Roth GmbH & Co),

1,14 ml Eisessig (Merck),

0,74 g Ethylendiamin-Tetraazetkacid (EDTA Na²⁺, Paesel + Lori GmbH & Co, Frankfurt, Deutschland) und

Aqua dest., bis zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml.

Nach dem Verteilen von 10 µl Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH & Co) in der Pfanne schloss sich eine 40minütige Aushärtungszeit bei Raumtemperatur an. Als Elektrophoresepuffer wurde eine 1-fache TAE-Lösung eingesetzt. Es wurden 10 µl eines *RNA Ladders* (New England Biolabs Inc., Schwalbach/Taunus, Deutschland) als Größenmaßstab aufgetragen. Die Laufzeit betrug 1,5 h bei 110 V.

5.8. Reverse Transkription der mRNS

Ein Mastermix wurde erstellt, wobei pro Probe folgende Mengen berechnet wurden:

2 µl 10 x *Reaction Buffer*,

4 µl 25 mM MgCl₂,

2 µl 40 mM Deoxynukleotid Mix,

2 µl 0,02 A₂₆₀ Oligo-p(dT)15-*Primer*,

1 µl (40-50 U) *RNAse Inhibitor* sowie

0,8 µl > 20 x 10³ U/ml AMV Reverse Transkriptase.

Die verwendeten Chemikalien entstammten dem „1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ (Boehringer-Mannheim/Roche). Das Probenvolumen wurde so gewählt, dass sich im Ansatz 1 µg RNS befand. Mit sterilem Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die *Primer*-Anlagerung erfolgte während einer 10minütigen Inkubationsphase bei 25°C, die RT während einer 60minütigen Inkubation bei 42°C, die abschließende Denaturierung der Enzyme und Matrizen-RNS bei 99°C für 5 min. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20°C verwahrt.

5.9. Polymerasekettenreaktion

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) wurde mit spezifischen S19 [Yamamoto, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 2-2-1 Honjo, Kumamoto 860, Japan, persönliche Kommunikation], RP S6 und S14 (S6 und S14) *Primern* [Ferrari et al., 1990] sowie *Primern* für humanes β Aktin [Ponte et al., 1984] durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten *Primer* gehen aus Tabelle 2 hervor.

| <i>Primer</i> | Sequenz |
|--------------------------|---|
| S19 <i>sense</i> | 5'-AGG CCG CAC GAT GCC TGG AGT TAC TGT AAA AGA-3' |
| S19 <i>antisense</i> | 5'-GCC AAC AAG AAG CAT TAG AAC AAA CCA TGC-3' |
| S6 <i>sense</i> | 5'-CTG AAC ATC TCC TTC CCA GCC-3' |
| S6 <i>antisense</i> | 5'-CGC CGC CTG GGC CCC AAA AGA-3' |
| S14 <i>sense</i> | 5'-ATG GCA CCT CGA AAG GGG AAG-3' |
| S14 <i>antisense</i> | 5'-CTC CGG GCC ACA GGA GGA AAT-3' |
| β Aktin <i>sense</i> | 5'-GAT GAT GAT ATC GCC GCG CTC GTC GTC-3' |
| β Aktin <i>antisense</i> | 5'-TGA GCG GTT CCG CTG CCC TGA GGC AC-3' |

Tabelle 2 *Primer*sequenzen für S19, S6, S14 und humanes β Aktin.

Die *Primer* wurden von ARK Scientific (Darmstadt, Deutschland) bezogen und entsprechend der Anweisungen des Herstellers in Diethyl-Pyrocabonate-Aqua dest.

(Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gelöst. Die Amplifikation erfolgte in 100 µl Ansätzen:

5 µl der in der RT-Reaktion erhaltenen *copy* Desoxyribonukleinsäure (cDNS),
10 µl 10 x *Reaction Buffer*,
1 µg Gelatine (beides aus dem *1st strand synthesis kit for RT-PCR (AMV)*),
50 pmol je *Primer*,
2,5 U Taq DNS Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) und
80,5 µl Diethyl-Pyrocabonate-Aqua dest..

Um ein Verdunsten der Probe während der Inkubationszyklen zu verhindern, wurde diese mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma) überschichtet. Die DNS wurde für 3 min bei 94°C denaturiert. Die Amplifikation erfolgte über 30 Zyklen nach folgenden Temperatur-Zeit-Zyklen:

DNS-Denaturierung bei 94°C für 60 sec,
Primer-Anlagerung bei 58°C für 60 sec und
Polymerisation der Ziel-DNS bei 72°C für 90 sec.

Zur vollständigen Synthese aller DNS-Stränge wurde am Ende eine 10minütige Inkubation bei 72°C durchgeführt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Amplifikationsprodukte bei 4°C verwahrt. Negativkontrollen wurden für alle vier *Primer*paare durchgeführt, indem eine PCR mit Aqua dest. anstelle des RT-Produktes durchgeführt wurde.

5.10. Agarosegelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte wurde ein 2%iges TAE-Agarosegel, wie unter 5.7. beschrieben, gegossen. Je 15 µl der PCR-Proben wurden mit 3 µl 6 x Puffer versetzt, so dass eine Füllmenge von 18 µl pro Geltasche bereit stand. Um 10 ml des 6 x Puffers zu erstellen, wurden benötigt:

5 ml Glycerin (Carl Roth GmbH & Co),
40 mg Bromphenolblau (Carl Roth GmbH & Co),
40 mg Xylencyanol (Carl Roth GmbH & Co) und
3,7 mg EDTA.

Zur Größenbestimmung der Amplifikationsprodukte wurden 7 μ l 100 bp *DNA Ladder* (New England Biolabs Inc.) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 110 V für 1,5 h.

5.11. Sequenzierung der amplifizierten DNS

Für jeden der verwendeten *sense* und *antisense Primer* wurde eine Sequenzierung der PCR Produkte mit dem „LI-COR 4200 System“ bei MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Pro *Primerpaar* wurde eine PCR mit drei Karzinomzelllinien, einer Keratinozytenzelllinie, einer Karzinomgewebeprobe und einer Referenzgewebeprobe durchgeführt. Aus jedem einzelnen PCR Ansatz wurden 12 μ l entnommen, so dass pro *Primerpaar* ein Probenvolumen von 72 μ l zur Verfügung stand. Dieses wurde mit 14 μ l des 6 x Puffers versetzt. Das Agarosegel wurde, wie unter 5.7. beschrieben, präpariert und mit den Proben beschickt. Die Laufzeit betrug 75 min bei 110 V. Die Banden wurden unter UV-Beleuchtung mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNS wurde mit Hilfe des „GFXTM PCR and Gel Band Purification Kits“ (Pharmacia Biotech) entsprechend der Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Eine photometrische Bestimmung der cDNS Konzentration wurde wie unter 5.6. beschrieben durchgeführt. Für doppelsträngige DNS entspricht eine O.D.₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50 μ g/ml. Für die Sequenzierung der PCR Produkte wurde eine Mindestmenge von 20 ng/100 bp benötigt. Für S6, S14 und S19 wurden *Double Strand Reads* durchgeführt. Aufgrund der Länge des Amplifikats von 778 bp wurden für das humane β Aktin *Single Strand Reads* von beiden Seiten ausgewählt.

5.12. Dokumentation und Auswertung

Über das interkalierende Ethidiumbromid konnte die DNS unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgte mit dem Dokumentationssystem „Gel Doc 2000“. Die Auswertung wurde mit Hilfe der Software „*The Discovery Series, Quantity One*“ (Biorad) vorgenommen, welche für jede Bande die Farbintensität berechnete. Die jeweilige Farbintensität der S19, S6 sowie S14 Banden wurde mit derjenigen der β Aktin Bande ins Verhältnis gesetzt. Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurden die Daten auf Normalverteilung getestet. Der Whitney-Mann u-Test wurde für den Vergleich zwischen HNSCC und Referenzproben eingesetzt. Für die Korrelationen wurde der Spearman-Rho Korrelationskoeffizient mit einem zweiseitigen 5%igen Signifikanzniveau berechnet. Sämtliche statistischen Operationen wurden mit Hilfe der „EXCEL“ (*Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA*) sowie „SPSS“ (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*)“ Software durchgeführt.

6. ERGEBNISSE

6.1. Amplifikation der S19, S6, S14 und β Aktin Genfragmente

Um die Amplifizierbarkeit der untersuchten Proben zu überprüfen, wurden die Ethidiumbromid-gefärbten rRNS-Einheiten im Agarosegel bei UV-Licht betrachtet. Aus Abbildung 1 ist ersichtlich, dass im Falle einer nicht degradierten Gesamt-RNS-Probe die 28S sowie 18S rRNS-Einheiten in Form distinkter Banden auftreten.

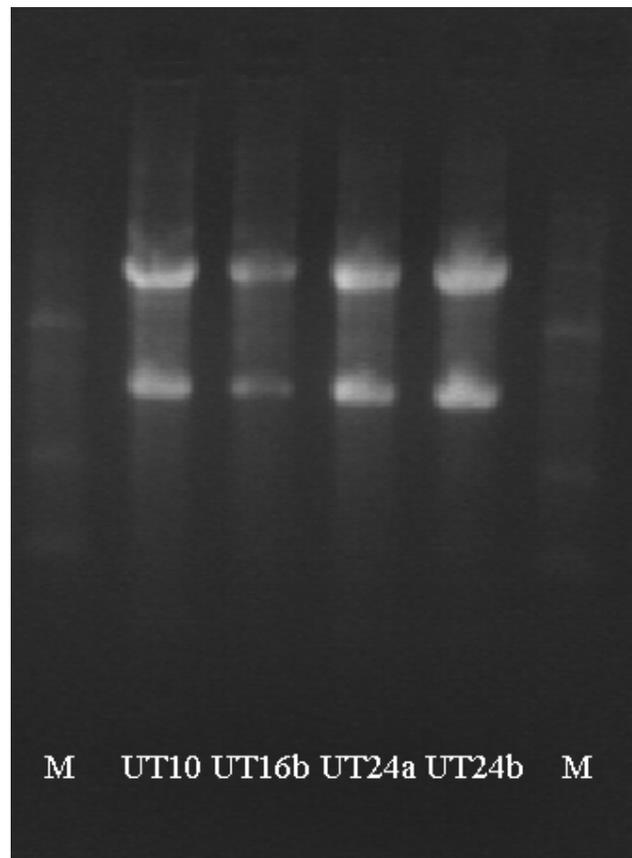


Abbildung 1 RNS-Qualitätskontrolle: Dieses 2%ige Agarosegel zeigt als Beispiel die aufgetrennte Gesamtzell-RNS folgender Proben: UTSCC 10, UTSCC 16b, UTSCC 24a, UTSCC 24b, M = Marker. In jeder Bahn sind zwei deutlich abgrenzbare Banden in den erwarteten Positionen der 28S und 18S rRNS zu sehen. In keiner der Bahnen sind weitere Banden zu erkennen, was bedeutet, dass die RNS während der Extraktion weder denaturiert noch mit anderen Nukleinsäuren kontaminiert wurde.

In der darauffolgenden PCR wurde ein 460 bp Fragment der S19 mRNA (siehe Abbildung 2), ein 405 bp Fragment der S6 mRNA, ein 309 bp Fragment der S14 mRNA sowie ein 778 bp Fragment der mRNA des humanen β Aktins amplifiziert.

| | | | | | | |
|-----|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | ctggcagcgc | <u>ggaggccgca</u> | <u>cgatgcctgg</u> | <u>agttactgta</u> | <u>aaagacgtga</u> | accagcagga |
| 61 | gttcgtcaga | gctctggcag | cctcctcaa | aaagtccggg | aagctgaaag | tccccgaatg |
| 121 | ggtggafacc | gtcaagctgg | ccaagcacia | agagcttct | ccctacgatg | agaactggtt |
| 181 | ctacacgcga | gctgctcca | cagcgcggca | cctgtacctc | cggggtggcg | ctggggttgg |
| 241 | ctccatgacc | aagatctatg | ggggacgtca | gagaaacggc | gtcatccca | gccacttcag |
| 301 | ccgaggctcc | aagagtgtgg | cccgccgggt | cctccaagcc | ctggaggggc | tgaaaatggt |
| 361 | ggaaaaggac | caagatggcg | gccgcaaact | gacacctcag | ggacaaagag | atctggacag |
| 421 | aatcgccgga | caggtggcag | <u>ctgccaacia</u> | <u>gaagcattag</u> | <u>aacaacctat</u> | <u>gctgggttaa</u> |
| 481 | taaattgcct | cattcgtaaa | aaaaaaaaa | | | |

Abbildung 2 Sequenz der S19 mRNA inklusive der verwendeten *Primer*: Die als *Primer* verwendeten Sequenzen sind unterstrichen und in Fettdruck präsentiert.

Für sämtliche *Primerpaare* wurden Negativkontrollen durchgeführt. Dass sich die *Primer* nicht gegenseitig amplifizierten, wird aus Abbildung 3 ersichtlich.

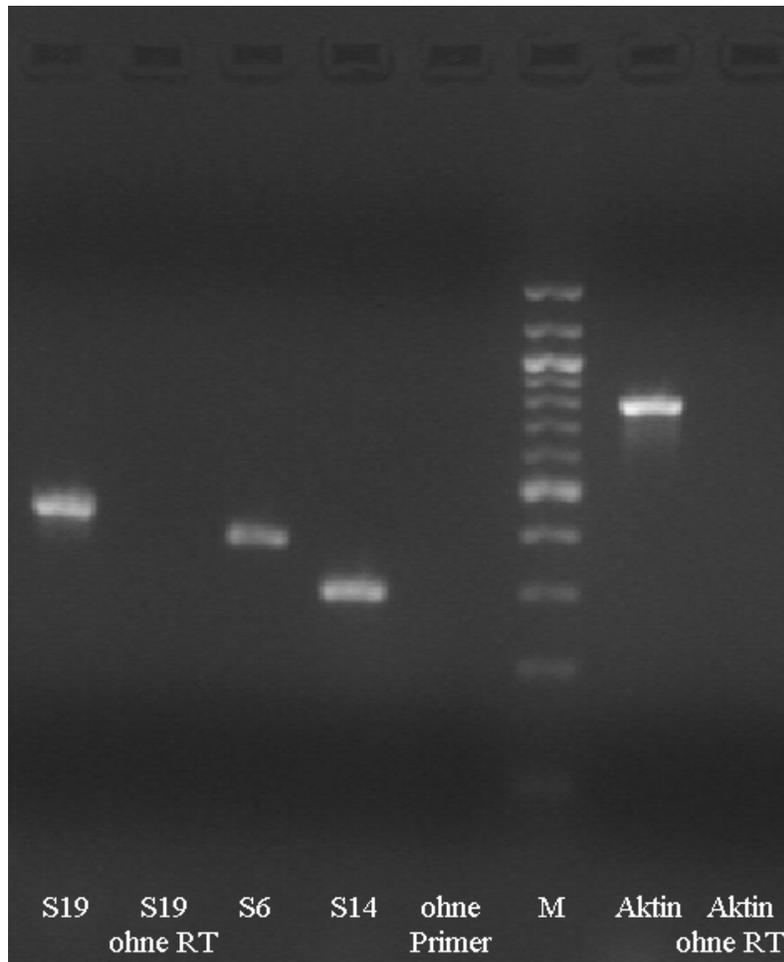


Abbildung 3 Negativkontrollen für die gewählten Primer: Dieses 2%ige Agarosegel zeigt das Elektrophorese-Ergebnis für die Keratinozytenzelllinie K80. Die S19 (460 bp), S6 (405 bp), S14 (309 bp) sowie β Aktin- (778 bp) Banden finden sich jeweils an der erwarteten Stelle. In den Bahnen 2 und 8 wurden PCR Produkte mit den angegebenen *Primern* aufgetragen. Allerdings war der PCR kein RT Produkt beigefügt worden, um auszuschließen, dass sich die *Primer* gegenseitig amplifizieren. In Bahn 5 wurde das PCR Produkt aufgetragen, ohne dass der PCR ein *Primer* beigesezt worden war, um etwaige Kontamination zu erkennen. M = Marker.

6.2. Sequenzierungsergebnisse und Datenbankvergleich

Um die Spezifität der *Primer* und der damit erhaltenen Banden zu bestätigen, wurden einige der Proben nach der Elektrophorese aufgereinigt und einer Sequenzanalyse unterworfen. Die Ergebnisse zeigten exakte Homologie mit den in der humanen Genbank veröffentlichten S19, S6, S14 bzw. β Aktin Sequenzen, so dass die Spezifität der *Primer* und die Identität der Amplifikate gesichert sind. Ein Beispiel für den S19 *sense Primer* zeigt Abbildung 4.

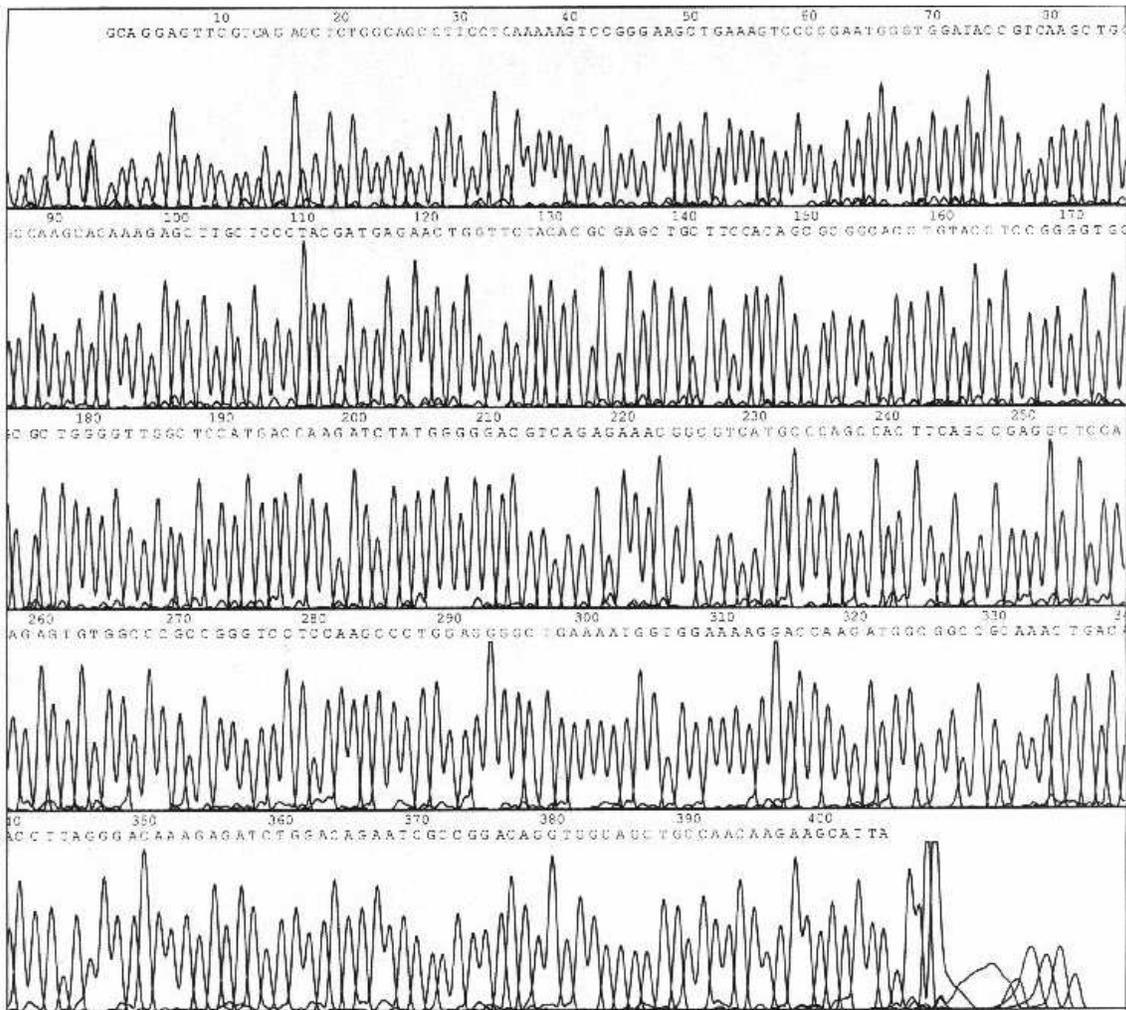


Abbildung 4 Ergebnisse der Sequenzierung für den S19 *sense Primer*: Der Datenbankvergleich zeigte exakte Homologie mit der veröffentlichten S19-Sequenz.

6.3. Analyse und Auswertung der gewonnenen Daten

Die PCR-Produkte wurden in einer Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abbildung 5).

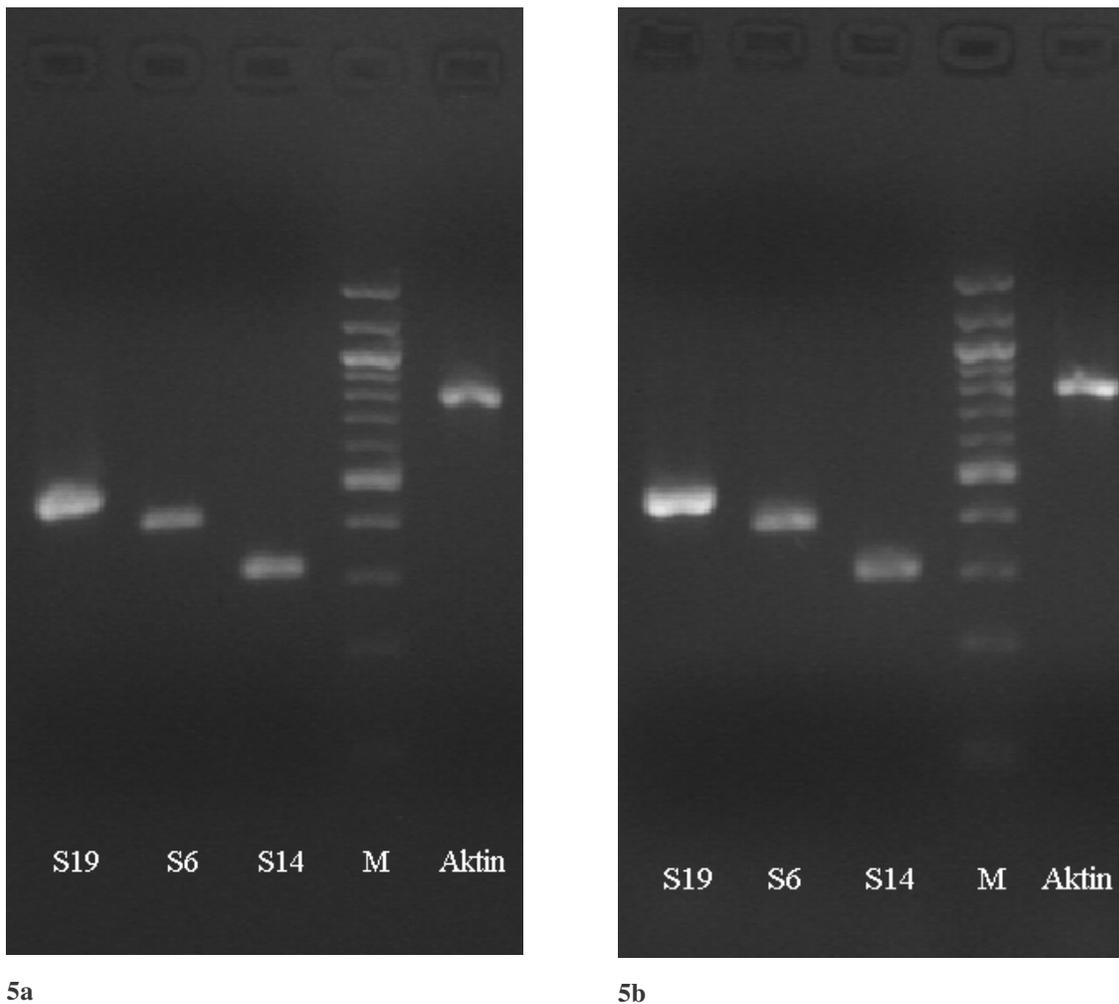


Abbildung 5 Die 2%igen Agarosegele zeigen die repräsentativen Elektrophorese-Ergebnisse für die HNSCC Zelllinien UMSCC 27 (5a) und die HNSCC Gewebeprobe 621 (5b): Die S19 (460 bp), S6 (405 bp), S14 (309 bp) sowie β Aktin (778 bp) Banden finden sich jeweils an der erwarteten Stelle. Pro Bahn ist nur eine Bande sichtbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass weder Denaturierung noch Kontamination stattgefunden haben. M = Marker.

Für jede Probe wurde mithilfe der Software „*The Discovery Series, Quantity One*“ die Farbintensität der zugehörigen Bande berechnet. Aus den erhaltenen Werten wurde die relative S19, S6 sowie S14 mRNA-Expression im Vergleich zur β Aktin mRNA-Expression als internem Standard ermittelt. Die Ergebnisse der mRNA-Expression werden im folgenden in REE (relativen Expressions-Einheiten) angegeben. Die Expressions-Ergebnisse der Karzinomproben wurden entsprechend ihrer Differenz mit dem jeweiligen Expressions-Median der Referenzproben in vier Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 1): stark erniedrigt ($x < -0,5$ REE), leicht erniedrigt ($-0,5 = x < 0$ REE), leicht erhöht ($0 = x < 0,5$ REE) sowie stark erhöht ($x = 0,5$ REE).

Der Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung zeigte, dass die ermittelten Daten nicht normalverteilt sind. Daher wurden Wertebereich, Median und die Perzentilen Q_{25} und Q_{75} gewählt, um die Ergebnisse statistisch aufzuarbeiten (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 a Statistik der HNSCC Zelllinien.

| | Wertebereich | Median | Q_{25} | Q_{75} |
|-----|--------------|--------|----------|----------|
| S19 | 0.25-18.7 | 0.7000 | 0.4850 | 1.2375 |
| S6 | 0.08-0.89 | 0.3600 | 0.2950 | 0.5600 |
| S14 | 0.11-0.69 | 0.2400 | 0.1500 | 0.5150 |

Tabelle 3 b Statistik der benignen Keratinozyten Zelllinien.

| | Wertebereich | Median | Q_{25} | Q_{75} |
|-----|--------------|--------|----------|----------|
| S19 | 0.54-9.24 | 1.0900 | 0.8500 | 2.6750 |
| S6 | 0.25-8.91 | 0.7600 | 0.5950 | 1.6550 |
| S14 | 0.13-4.83 | 0.6800 | 0.3600 | 1.1500 |

Tabelle 3 c Statistik der HNSCC Gewebeproben.

| | Wertebereich | Median | Q_{25} | Q_{75} |
|-----|--------------|--------|----------|----------|
| S19 | 0.23-8.47 | 1.2900 | 0.6175 | 2.6550 |
| S6 | 0.29-7.8 | 0.5800 | 0.4450 | 1.0275 |
| S14 | 0.13-4.36 | 0.4250 | 0.2800 | 0.6400 |

Tabelle 3 d Statistik der benignen Gewebeproben.

| | Wertebereich | Median | Q_{25} | Q_{75} |
|-----|--------------|--------|----------|----------|
| S19 | 0.35-8.63 | 0.9350 | 0.4400 | 2.4475 |
| S6 | 0.49-11.68 | 0.6750 | 0.5875 | 1.2375 |
| S14 | 0.13-3.36 | 0.5000 | 0.2600 | 1.1200 |

Tabelle 3 a - d Deskriptive Statistik der mRNA-Expressionsergebnisse: Da die gewonnenen Ergebnisse nicht normalverteilt sind, wurden Wertebereich, Median und die Perzentilen Q_{25} und Q_{75} gewählt, um die Daten zu präsentieren. Die Ergebnisse sind in relative Expressions-Einheiten (REE) angegeben.

Um die S19, S6 und S14 mRNS-Expressionslevel der Karzinomproben mit denen der Referenzproben zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney u-Test durchgeführt. Die ermittelten Z-Werte für den Vergleich der Karzinomzelllinien mit den Referenzzelllinien sowie der Karzinomgewebeproben mit den Referenzgewebeproben gehen aus Tabelle 4 hervor.

| | Zelllinien | Gewebeproben |
|-----|------------------------|------------------------|
| S19 | Z = -2,295 (p = 0,022) | Z = -0,859 (p = 0,390) |
| S6 | Z = -3,118 (p = 0,002) | Z = -1,119 (p = 0,263) |
| S14 | Z = -2,597 (p = 0,009) | Z = -0,509 (p = 0,611) |

Tabelle 4 Ergebnisse des Mann-Whitney u-Test: In Klammern findet sich das jeweils zugehörige Signifikanzniveau p.

Die Ergebnisse des Mann-Whitney u-Tests zeigten für die Zelllinien eine signifikante mRNA-Repression aller drei RPs in den Karzinomproben im Vergleich zu den Referenzproben. Für die Gewebeproben zeichnete sich Ähnliches ab, die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 6).

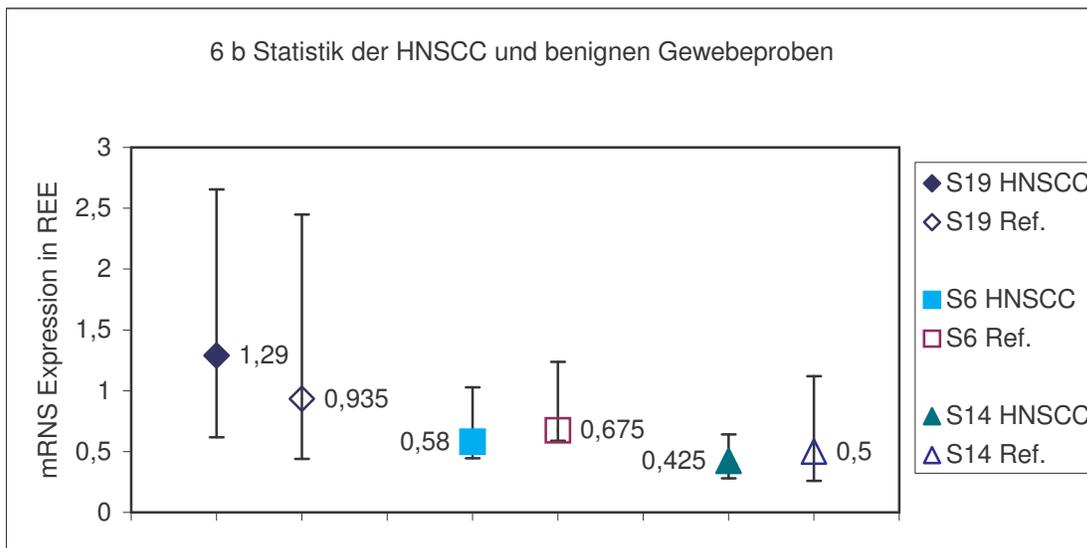
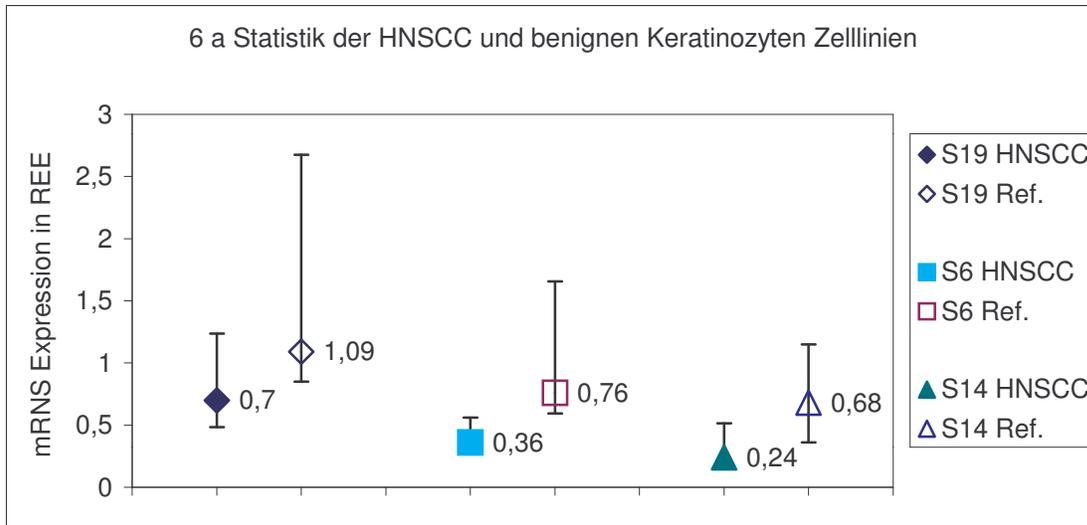


Abbildung 6 Vergleich der S19, S6 und S14 mRNA-Expression in HNSCC Proben und Referenzproben (6a: Zelllinien, 6b Gewebe): Median, Q25 and Q75 werden jeweils für die HNSCC sowie die Referenzproben dargestellt, da der Kolmogorov-Smirnov Test zeigte, dass die Daten nicht normalverteilt sind. Die Ergebnisse werden in relativen Expressions-Einheiten präsentiert (REE).

Auch für das Oropharynxkarzinom 745, von dem sowohl eine Gewebeprobe als auch die zugehörige Karzinomzelllinie untersucht wurde, lag die S19 mRNA-Expression unter dem jeweils ermittelten Referenzwert. Entsprechend verhielten sich die S6 und S14 mRNA-Expressionswerte, wobei der Expressionsunterschied für die Zelllinie SCC 745 stärker ausfiel als für die Gewebeprobe 745 (siehe Tabelle 5).

| | S19 | S6 | S14 |
|---------|------|------|------|
| SCC 745 | 0,46 | 0,43 | 0,17 |
| 745 | 0,6 | 0,57 | 0,44 |

Tabelle 5 Die mRNA-Expression des Oropharynxkarzinom 745 (in REE), zu dem sowohl eine Karzinomzelllinie (SCC 745) als auch eine Gewebeprobe (745) untersucht wurden. Zum Vergleich der Median der S19 mRNA-Expression für die Referenzzelllinien (1,09 REE) und die Referenzgewebeproben (0,93 REE).

6.3.1. Zusammenhang zwischen der Expression der untersuchten mRNA-Moleküle und klinischen Parametern

Nach Berechnung der Korrelationen zwischen den mRNA-Expressions-Leveln für S19, S6 und S14 einerseits sowie den Parametern *Stage*, T, N, M und *Grading* andererseits zeigten sich in der Gruppe der HNSCC Zelllinien signifikante Korrelationen zwischen den ermittelten Werten für S19 ($r = -0,651$, $p = 0,003$) und S14 ($r = -0,670$, $p = 0,012$) und dem histopathologischen *Grading*: Sinkende S19 und S14 Level korrelierten mit höheren *Grading* Leveln. Eine signifikante ($p = 0,048$) negative Korrelation ($r = -0,371$) fand sich in der Gruppe der Karzinomgewebe zwischen S19 und dem T-Level der malignen Erkrankung. Dies bedeutet, dass sich bei höheren T-Leveln niedrigere S19 Werte fanden. Für alle weiteren Ergebnisse konnten keine Signifikanzen nachgewiesen werden. Die Spearman-Rho Korrelation mit den Patienten-Parametern Geschlecht und Alter zeigte in keiner der vier Gruppen bedeutsame oder signifikante Zusammenhänge.

Einige der Zelllinien gehörten zu den selben Patienten in unterschiedlichen Stadien ihrer Erkrankung (siehe Tabelle 1). Die Zelllinien UMSCC 14a (Rezidiv: T1, *Grading* 2-3), 14b (Rezidiv: T1, *Grading* 3) und 14c (Rezidiv: T2, *Grading* 3) stammen von einer Patientin mit einem Mundhöhlenkarzinom. Die Dauer und Schwere ihrer Erkrankung nehmen von UMSCC 14a nach 14c zu, wohingegen die S19 Level von UMSCC 14a

nach 14c hin sanken (14a: 0,55 REE > 14b: 0,47 REE > 14c: 0,25 REE). Die Zelllinien UTSCC 16a (Primarius) und 16b (Halslymphknotenmetastase) stammen ebenfalls von einer Patientin mit einem Mundhöhlenkarzinom. Auch hier fanden sich höhere S19 Level in der Zelllinie des Primarius (16a: 0,82 REE > 16b: 0,42 REE). Die Zelllinien UTSCC 19a (Primarius) und 19b (persistierender Primarius) gehören zu einem Patienten mit einem Larynxkarzinom. Die *Staging*-Werte blieben die selben, die S19 mRNS-Expression nahm zu (19a: 0,52 REE < 19b: 18,7 REE). UTSCC 24a (Primarius) und 24b (Halslymphknotenmetastase) sind ein weiteres Zelllinienpaar von einem Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom (24a: 0,87 REE < 24b: 0,96 REE).

6.3.2. Vergleich zwischen der S19, S6 und S14 mRNS-Expression

Für die Korrelation zwischen der S19 und S6 ($r = 0,794$) sowie S19 und S14 ($r = 0,752$) als auch S6 und S14 ($r = 0,735$) mRNS-Expression lieferte die Berechnung nach Spearman-Rho hohe und dabei hochsignifikante ($p = 0.000$ in sämtlichen Fällen) Korrelationen - sowohl für die Zelllinien als auch für die Gewebeprobe.

7. DISKUSSION

Um Anhaltspunkte für die Ursache der in den HNSCC Proben gemessenen S19 mRNA-Repression zu erhalten, sollte die Funktion der RP und des S19 im Besonderen betrachtet werden. Die Bedeutung der hohen Korrelation zwischen der S19 sowie S6/S14 mRNA-Expression kann durch Kenntnis der RP-Regulation in benignen Zellen erfasst werden. Doch zunächst sollen Lage und Bau des S19 näher betrachtet werden.

7.1. Lokalisation und Struktur des S19

Ribosomen sind der Ort der Proteinsynthese. Diejenigen, die an der Produktion zellulärer Proteine beteiligt sind, liegen frei im Cytoplasma der Zelle, wohingegen Ribosomen, die Exportproteine produzieren, an das endoplasmatische Retikulum gebunden sind [Lewin B, 1994]. Da Costa et al. gelang es kürzlich, das S19 auf subzellulärer Ebene im Bereich der Nukleoli zu lokalisieren [Da Costa et al., 2003]. Ribosomen setzen sich aus einer großen und einer kleinen Untereinheit zusammen. Jede dieser Untereinheiten besteht aus verschiedenen RP und rRNS-Molekülen. Bei Eukaryonten sind dies 49 RP und drei rRNS-Moleküle für die große und 33 RP sowie eine rRNS für die kleine Untereinheit [Lake JA, 1985; Lewin B, 1994]. Die meisten RP, wie auch das S19, liegen pro Ribosom in einfacher Ausführung vor [Nomura et al., 1984; Lake JA, 1985; Capel et al., 1987; Sharp et al., 1990; Lewin B, 1994]. Das S19 konnte an der Oberfläche der kleinen Untereinheit lokalisiert werden, wo es sich in Nähe des Peptidyltransferasezentrums der großen Untereinheit befindet [Lake JA, 1976; Olson et al., 1988]. S19 ist dem S14 benachbart, welches in der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf seinen mRNA-Expressionsgrad hin untersucht wurde [Bode et al., 1974 a + b; Lake et Kahan, 1975; Lake JA, 1976; Lake JA, 1985].

Das humane S19 besteht aus 145 Aminosäuren, die sich zu einem 15,5 kd Protein zusammenlagern [Yamamoto et al., 1996; Draptchinskaia et al., 1999]. Eine Sequenzierung wurde für eine Reihe sehr verschiedener Spezies wie Archaeobakterien

[Kimura et al., 1988; Mankin AS, 1989], grampositive sowie gramnegative Eubakterien [Hirano et al., 1987; Davydova et al., 1997], Mycobakterien [Ohara et al., 1993], Pflanzenchloroplasten und -mitochondrien [Sugita et Sugiura, 1983; Zurawski et al., 1984; Conklin et Hanson, 1991; Schuster et Brennicke, 1991], Muscheln [Rhodes et Van Beneden, 1997], Insekten [Baumgartner et al., 1993], Amphibien [Amaldi et al., 1990] und Säugetiere einschließlich des *Homo sapiens sapiens* [Suzuki et al., 1990; Klein et al., 1990; Kondoh et al., 1992] vorgenommen. Weitgehende Sequenz-Homologien wurden gefunden. Dies spricht für einen starken Selektionsdruck gegen Mutationen des zugehörigen Gens und weist auf eine lebensnotwendige Funktion des S19 Genproduktes für die Zelle hin [Hirano et al., 1987; Kimura et al., 1988; Rhodes et Van Beneden, 1997; Matsson et al., 1999].

7.2. Funktion der RP und des S19 im Besonderen

Bei der Suche nach Ursachen für die S19 mRNA-Repression in HNSCC sollte zunächst die Funktion des S19 in der gesunden Zelle betrachtet werden. Für S19 sind wie für die meisten RP ribosomale sowie extraribosomale Funktionen bekannt.

7.2.1. Ribosomale Funktionen

Bei Ribosomen handelt es sich um *Template* dirigierte Polymerasen, welche Aminacyl-Transfer-Ribonukleinsäure (tRNA)-Moleküle als Substrat und mRNA-Moleküle als *Template* verwenden. Hier wird die zur mRNA umgeschriebene Erbinformation des Organismus im Prozess der Translation in Aminosäuren umgeschrieben [Capel et al., 1987]. Die Funktion der RP besteht darin, die spezielle Struktur des Ribosoms zu stabilisieren, so dass die verschiedenen reaktiven Zentren an den richtigen Stellen zu liegen kommen [Lewin B, 1994; Wool IG, 1996]. Das S19 ist während der Zusammenlagerung der kleinen Untereinheit an der Bindung der rRNA beteiligt [Bode et al., 1974 a+b; Dijk et al., 1977; Schwarzbauer et Craven, 1985; Weitzmann et al., 1991]. Zudem ist es für die Modifikation bestimmter Basen der rRNA verantwortlich, was Voraussetzung für die korrekte Zusammenlagerung der ribosomalen Untereinheiten

ist [Weitzmann et al., 1991; Lewin B, 1994]. Während der Initiation der Translation ist S19 an der Bindung der Initiationsfaktoren IF 1, 2 und 3 [Lake et Kahan, 1975; Lake JA, 1976; Bollen et al., 1975; Heimark et al., 1976; Langberg et al., 1977; Pon et al., 1982; Lake JA, 1985] und der Initiator-tRNS an der Peptidyl-Stelle beteiligt [Lelong et al., 1974; Lake JA, 1976; Shimizu et Craven, 1976; Rosen et al., 1993]. Während der Elongation hilft S19 bei der Bindung der tRNS in der Aminoacyl-Stelle [Lelong et al., 1974; Shimizu et Craven, 1976; Lin et al., 1984 a+b; Lake JA, 1985]. Da mit dem Binden einer bestimmte tRNS die nächste einzubauende Aminosäure festgelegt ist, könnten Fehler in der tRNS-Bindung die Primärsequenz der synthetisierten Proteine verändern [Capel et al., 1987]. Wären hiervon Tumorsuppressor- oder Onkogenen betroffen, könnte eine maligne Degeneration der Zelle begünstigt werden. Zusätzlich ist S19 zusammen mit sechs weiteren RP für die Genauigkeitskontrolle der Translation bei Eukaryonten verantwortlich [Dequard-Chablat et al., 1986]. Von Untersuchungen an Bakterien ist bekannt, dass Mutationen, welche die Genauigkeitskontrolle der Translation beeinflussen, häufig RP-Gene betreffen. Es zeigte sich, dass entsprechende Mutanten regelmäßig veränderte Wachstumsprogramme und eine veränderte Lebensdauer aufweisen [Dequard-Chablat et al., 1986]. Sämtliche Veränderungen, die Zellentwicklung und Lebensdauer betreffen, tragen potentiell zur malignen Entartung einer Zelle bei.

7.2.2. Extraribosomale Funktionen

Außer im Ribosom gebunden konnte S19 frei in der Zelle sowie im Serum des Menschen nachgewiesen werden - ein erster Hinweis darauf, dass die Rolle des S19 weit über seine ribosomalen Funktionen hinaus geht [Absi et al., 1989; Nishiura et al., 1996; Yamamoto et al., 1996; Draptchinskaia et al., 1999; Soulet et al., 2001].

Frei in der Zelle vorkommendes S19 konnte als intrazellulärer Ligand des *Fibroblast Growth Factor-2* nachgewiesen werden und spielt so eine Rolle in der Signaltransduktion dieses Wachstumsfaktors [Soulet et al., 2001]. Eine den Zellzyklus oder das Zellwachstum aktivierende Reaktion durch Beeinflussung der Regulationsmechanismen von Wachstumsfaktoren ist ein häufiges Charakteristikum

von maligne entarteten Zellen [Koliopoulos et al., 2002] und könnte damit eine Erklärung für die S19 mRNA-Repression in HNSCC sein.

Polymerisierung durch Plasmaglutaminase XIIIa oder zytosolische Transglutaminase verleiht dem S19 eine völlig neue Funktion. Der S19 Dimer ist ein stark chemotaktisch wirksamer Faktor, der sich durch Spezifität für Monozyten auszeichnet. Der S19 Dimer wird im Verlauf der Blutgerinnung gebildet, ist für die Monozyten dominierte Infiltration bei chronischen Entzündungen verantwortlich, spielt eine Rolle in der erworbenen Immunabwehr [Nishiura et al., 1996; Yamamoto et al., 1996; Nishiura et al., 1998; Nishiura et al., 1999; Shrestha et al., 1999; Shibuya et al., 2001; Shrestha et al., 2003] und wird von apoptotischen Zellen freigesetzt [Horino et al., 1998; Nishiura et al., 1998; Nishiura et al., 1999]. Shrestha et al. warfen die These auf, dass die Verteidigung des Organismus gegen maligne Zellen unter anderem auf einer Kopplung des Systems zum Abräumen apoptotischer Zellen mit dem System der erworbenen Immunität beruht. Das S19 ist - als Dimer - an diesem Prozess beteiligt, indem es zirkulierende Makrophagen an den Ort der Apoptose lockt [Shrestha et al., 1999]. Der Verlust der Apoptosefähigkeit ist ein Schritt im Prozess der malignen Transformation. Zwischen der Apoptoserate und dem metastatischen Potential eines malignen Tumors besteht eine entgegengesetzte Beziehung [Knight et al., 1991]. Dieses Modell könnte gut zur Erklärung verminderter S19 mRNA-Level in HNSCC herangezogen werden. Es wäre interessant zu wissen, ob sich die Anzahl der S19 Homodimere in gleicher Weise verändert wie die Anzahl der S19 mRNA-Moleküle. Seit 1999 sind Anti-S19-Kaninchen-Antikörper kommerziell erhältlich [Shrestha et al., 1999]. Zudem ist es Malygin et al. gelungen, rekombinantes humanes S19 herzustellen, welches somit für Forschungszwecke zur Verfügung steht [Malygin et al., 2003]. Da der Regulationsmechanismus der RP auf verschiedenen Ebenen abläuft und insbesondere auch posttranskriptionale Regulationsmechanismen existieren [Pierandrei-Amaldi et al., 1985; Amaldi et Pierandrei-Amaldi, 1990; Ferrari et al., 1990; Mariottini et Amaldi, 1990; Levy et al., 1991], wäre sogar denkbar, dass sich ein Abfall der mRNA-Level überhaupt nicht auf die Proteinebene auswirkt. Zudem würde dieses Modell keine Erklärung für den parallelen Abfall der S6 und S14 mRNA-Konzentrationen liefern.

Auch Mutationen im S19 Gen führen zu Fehlfunktionen, wie von der *Diamond Blackfan Anaemia* (DBA) bekannt [Gustavsson et al., 1997 a+b; Gustavsson et al., 1998; Draptchinskaia et al., 1999; Willig et al., 1999]. Bei dieser Anämie handelt es sich um die angeborene Form der *Pure Red Cell Anaemia*. Betroffene Kinder werden mit einer Knochenmarksinsuffizienz geboren und leiden häufig zusätzlich an somatischen Dysmorphien, was auf eine Rolle des S19 im Verlauf von Embryogenese und Hämatopoese hinweist [Draptchinskaia et al., 1999; Matsson et al., 1999; Hamaguchi et al., 2002; Hamaguchi et al., 2003; Matsson et al., 2004]. Das Wissen um die Rolle des S19 im Rahmen der DBA hat inzwischen erste therapeutische Ansätze ermöglicht: Das S19 Gen konnte mittels eines Vektors in Knochenmarkszellen betroffener Patienten eingeschleust werden, woraufhin die Anzahl der erythropoetischen Kolonien anstieg [Hamaguchi et al., 2002; Hamaguchi et al., 2003].

Nicht nur für den Menschen [Draptchinskaia et al., 1999] ist eine Rolle des S19 im Verlauf der Embryogenese bekannt, sondern auch für den Spulwurm *Ascaris lumbricoides* [Etter et al., 1994] und die Seemuschel *Mya arenaria* [Rhodes et Van Beneden, 1997]. Das Ausbilden der verschiedenen Gewebetypen während der Embryogenese wird durch ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Zelldifferenzierung, Apoptose und Zellteilung erreicht. Dieses Gleichgewicht ist in maligne transformierten Geweben verloren gegangen. Für DBA Patienten wurde bereits ein erhöhtes Risiko, maligne Erkrankungen des hämatologischen Systems zu entwickeln, beschrieben [Janov et al., 1996; Draptchinskaia et al., 1999].

7.3. Das S19 Expressionsmuster bei verschiedenen malignen Erkrankungen

Auch für maligne Erkrankungen anderer Gewebetypen konnte eine Veränderung des S19 Expressionsverhaltens nachgewiesen werden: In Voruntersuchungen ergaben sich Hinweise auf veränderte S19 mRNA-Level in HNSCC. DDRT-PCR-Untersuchungen an zwei HNSCC und zwei benignen Keratinozytenzelllinien aus dem oberen Aerodigestivtrakt lieferten unterschiedlich expremierte mRNA-Fragmente, von denen eines als Teil der S19 mRNA identifiziert werden konnte. Die DDRT-PCR-Ergebnisse

konnten durch Northern Hybridisierung untermauert werden [Rathcke et al., 2000]. In der vorliegenden – bisher größten - Arbeit zum S19 Expressionsverhalten im Zusammenhang mit Malignomen konnte eine signifikante S19 mRNA-Repression in HNSCC Zelllinien bestätigt werden. Die ermittelten mRNA-Expressionsunterschiede zwischen den Karzinom- und Referenzgewebeproben sind entsprechend des Mann-Whitney u-Testes nicht signifikant. Die signifikante negative Korrelation zwischen T-Level und S19 mRNA-Expression, fügt sich jedoch gut in das Bild, welches die Ergebnisse der Zelllinien liefern. Auch die Ergebnisse für das Oropharynxkarzinom 745, von dem sowohl eine Gewebeprobe als auch die zugehörige Karzinomzelllinie SCC 745 untersucht wurden, stützen das Resultat der Zelllinien. Die mRNA-Repression fällt für die Zelllinie SCC 745 jedoch stärker aus als für die Gewebeprobe 745, wie dies aufgrund der unterschiedlichen Signifikanzniveaus für Zelllinien und Gewebe zu erwarten wäre. Es ist denkbar, dass die Unterschiede bei den Geweben weniger stark ausfallen, da sich Gewebe stets aus verschiedenen Zelltypen zusammensetzen. Zudem steht dem Operateur bei Entnahme der Gewebeprobe nur der makroskopische Aspekt des Tumors zur Verfügung, um zwischen malignen und sicher benignen Bezirken zu unterscheiden. Diese Problematik entfällt bei der Untersuchung von Zelllinien, bei denen es sich ausschließlich um die vom Oberflächenepithel abstammenden Zellen, also die eigentlichen Karzinomzellen handelt. Die erhaltenen Ergebnisse legen somit nahe, dass die niedrigen S19 mRNA-Level auf eine verminderte Expression in den dem Epithel entstammenden Zellen zurückzuführen sind.

Auch für das dem oberen Aerodigestivtrakt verwandte kolorektale Gewebe liegen Untersuchungen zum S19 Expressionsverhalten in Malignomen vor. Allerdings wurden in den Karzinomproben signifikant höhere S19 Level nachgewiesen. Die gemessenen S19 Level ließen weder auf den Differenzierungsgrad noch das Wachstumsstadium der Zellen Rückschlüsse zu. Steigende S19 Level korrelierten in zwei der zwölf untersuchten Zelllinien mit der Progression der Erkrankung [Kondoh et al., 1992]. Auch in der vorliegenden Arbeit gehörten einige der Zelllinien zu den selben Patienten in unterschiedlichen Stadien ihrer Erkrankung. Die Ergebnisse decken sich jedoch nur teilweise mit denen von Kondoh et al.: Die S19 Level steigen in einigen Fällen mit der Karzinomprogression, in anderen sinken sie. Die Anzahl der Proben ist zu gering, um allgemeingültige und signifikante Aussagen formulieren zu können. Während Kondoh

et al. keine Expressionsunterschiede zwischen gut und schlecht differenzierten Zellen finden konnten, wurde in dieser Arbeit eine hoch signifikante negative Korrelation zwischen S19 mRNA-Expression und histopathologischem *Grading* ermittelt, d.h. mit zunehmender maligner Entartung fanden sich niedrigere S19 mRNA-Level. Diese Korrelation stützt das Ergebnis, dass die S19 mRNA in HNSCC Zellen schwächer exprimiert wird. Bisher war in sämtlichen untersuchten Malignomen eine S19 Überexpression (oder aber überhaupt keine Expressionsänderung) gefunden worden: Außer für kolorektale Karzinome [Kondoh et al., 1992] liegen entsprechende Daten für Leiomyome des menschlichen Uterus, Zystadenokarzinome der Parotis, Pankreas- sowie Mammakarzinome vor [Lin et al., 2002].

Nicht nur für den Menschen ließen sich veränderte S19 Level im Laufe maligner Degeneration nachweisen. Rhodes und Van Beneden identifizierten S19 in einem Expressionsscreen, bei dem normale und neoplastische Gonaden der Seemuschel *Mya arenaria* verglichen wurden [Rhodes et Van Beneden, 1997]. Obwohl diese Spezies zu den Invertebraten gehört, besitzt der S19 *Open Reading Frame* (ORF) 58% Identität mit humaner S19 mRNA. In dem Genom der Seemuschel wurden mehrere Kopien des S19 Gens gefunden - ein Charakteristikum von RP-Genen bei Vertebraten [Monk et al., 1981; Suzuki et al., 1990; Baumgartner et al., 1993; Rhodes et Van Beneden, 1997]. S19 spielt also sowohl beim Menschen wie auch bei diesem Invertebraten eine Rolle während der Embryogenese und dem Prozess der Zelldifferenzierung.

Dass S19 kein genereller Tumormarker ist, der unabhängig von der Gewebeart bei maligner Degeneration ansteigt, belegt die Arbeit von Shim et al.: Zwischen gesunden und maligne entarteten Zervixzellen konnten keine S19 mRNA-Expressionsunterschiede gemessen werden. Die S19 mRNA gehört in Zervixzellen des Menschen zu den am stärksten exprimierten mRNA-Molekülen, was Shim et al. auf die für dieses Gewebe typische hohe Proliferationsrate zurückführen [Shim et al., 1998].

7.4. Vergleich zwischen der S19, S6 und S14 mRNS-Expression

Da es sich bei S19 um einen Baustein des Ribosoms handelt, stellt sich die Frage, ob die S19 mRNS-Repression in HNSCC auf eine verminderte Ribosomenanzahl zurückzuführen ist oder ob S19 aus der normalerweise streng koordinierten Synthese der ribosomalen Komponenten entkoppelt wurde [Chester et al., 1989]. Um dieser Frage nachzugehen, wurde das Expressionsverhalten zweier weiterer RP untersucht. Die Wahl fiel auf S6 und S14, da es sich erstens ebenfalls um Proteine der kleinen Ribosomenuntereinheit handelt. Zudem ist von S14 bekannt, dass es im Ribosom in enger Nachbarschaft zu S19 lokalisiert ist [Bode et al., 1974 a+b; Expert-Bezancon et al., 1977; Olson et al., 1988]. Zweitens gilt S6 als eines der RP, über das die Kontrolle der gesamten RP-Produktion in der Zelle reguliert wird: Die Phosphorylierung von S6 als Antwort auf mitogene Signale ist ein Regulationsmechanismus der Translation bei Eukaryonten [Thomas et al., 1982; Chester et al., 1989; Erikson et Maller, 1989; Sharp et al., 1990; Sonnemann et al., 1991; Barnard et al., 1992]. So kann angenommen werden, dass sich ein veränderter Ribosomenbedarf und damit Bedarf an RP an diesem RP besonders genau und früh abzeichnen würde. Drittens ist von S6 und S14 bereits bekannt, dass ihr Expressionsquotient in leukämischen Blasten verändert ist. Zumindest bei dieser malignen Erkrankung scheint die sonst streng koordinierte Expression zweier RP, nämlich S6 und S14, demnach entkoppelt zu sein [Ferrari et al., 1990]. Doch zunächst sollen die Regulationsmechanismen der RP in gesunden Zellen genauer betrachtet werden.

7.4.1. Regulation der RP in gesunden Zellen

Unter physiologischen Bedingungen werden die verschiedenen RP streng koordiniert synthetisiert, da sie im Ribosom in stöchiometrischen Verhältnissen benötigt werden [Chester et al., 1989]. Zudem ist die Produktion der RP an die Menge verfügbarer rRNS-Moleküle gekoppelt [Monk et al., 1981; Bozzoni et al., 1981; Nomura et al., 1984; Kay et Jacobs-Lorena, 1985; Chester et al., 1989; Ferrari et al., 1990; Draptchinskaia et al., 1999]. Bei Säugern liegen die RP-Gene in multiplen Kopien vor, so dass um die 750 RP-Gene über das Genom verteilt sind. Dabei ist weder bekannt, ob

es sich bei sämtlichen Kopien um komplette funktionelle Gene handelt, noch, ob exakt identische Kopien oder Variationen vorliegen. [Monk et al., 1981; Suzuki et al., 1990; Baumgartner et al., 1993; Rhodes et Van Beneden, 1997]. Sollte die Lage im Genom eine Rolle für die Aktivität eines bestimmten RP spielen, könnte diese Genmultiplizität Ausdruck eines besonderen Regulationsmechanismus sein [Monk et al., 1981]. Allelotyp Analysen von HNSCC Proben zeigten einen *Loss of Heterozygosity* für den Genort 19q in 20% aller Fälle. Im Genom des Menschen ist das S19 auf Chromosom 19q13 lokalisiert. Ob allerdings der Genort des S19 mitbetroffen ist, wurde bisher noch nicht untersucht [Field et al., 1995; Scholes et Field, 1996]. So wäre jedenfalls denkbar, dass die S19 mRNS-Repression in HNSCC auf eine Veränderung des zugehörigen Gens zurückzuführen ist. Chester et al. warfen die These auf, dass eine Überexpression der RP Gene im Zusammenhang mit neoplastischem Wachstum auf die Aktivierung prozessierter Pseudogene zurückgehen könnte [Chester et al., 1989].

Bei Eukaryonten greifen Regulationsmechanismen nicht nur über Rückkopplungsmechanismen auf Transkriptionsebene [Tasheva et Roufa, 1995] sondern zusätzlich posttranskriptional und während der Translation: Durch Modulation des mRNS-*Processing* wird die Stabilität des Transkripts verändert [Caffarelli et al., 1987; Mariottini et al., 1988; Amaldi et Pierandrei-Amaldi, 1990]. Der wichtigste Mechanismus spielt sich jedoch auf Translationsebene ab. Durch eine entsprechende Verteilung der RP-mRNS-Moleküle auf Polysomen oder inaktive *messenger* Ribonukleoproteine wird die Verfügbarkeit der mRNS-Moleküle kontrolliert [Pierandrei-Amaldi et al., 1985; Amaldi et Pierandrei-Amaldi, 1990; Ferrari et al., 1990; Mariottini et Amaldi, 1990; Levy et al., 1991]. Die RP werden in equimolaren Mengen benötigt. Die *5' Untranslated Region* (UTR) weist bei den meisten RP eine homologe Sequenz auf, von der angenommen wird, dass sie als cis-regulatorisches Element bei der Koordination der RP-Expression dient [Zubay G, 1987; Mariottini et al., 1988; Amaldi et Pierandrei-Amaldi, 1990; Klein et al., 1990; Mariottini et Amaldi, 1990; Levy et al., 1991; Chen et al., 1992; Avni et al., 1994; Rhodes et Van Beneden, 1997; Draptchinskaia et al., 1999]. Auch von der S19 mRNS ist dieses Merkmal bekannt. Das S19 Gen hat eine Größe von 11 kb und umfasst sechs Exons. Die transkribierte RNS setzt sich zusammen aus einem 435 bp umfassenden ORF, einem 160 bp 5'UTR und einem 40 bp 3'UTR [Draptchinskaia et al., 1999].

7.4.2. Expression der S6 und S14 mRNS in den HNSCC Proben

Mehrfach wurde die These formuliert, dass der erhöhte Ribosomenbedarf in Karzinomzellen den Anstieg der RP-Transkripte bedingt und es sich daher bei RP wie dem S19 um universale Marker gesteigerten Zellwachstums handelt [Pogue-Geile et al., 1991; Li et al., 2002]. Allerdings müsste in diesem Fall stets ein gleichmäßiger Anstieg sämtlicher RP zu verzeichnen sein, was in verschiedenen Studien widerlegt werden konnte, beispielsweise in der weiter oben angeführten Arbeit zum Expressionsverhalten von S6 und S14 in leukämischen Blasten [Ferrari et al., 1990] und in den Untersuchungen an verschiedenen Malignomen des Gastrointestinaltraktes [Barnard et al., 1993]. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar gezeigt werden, dass die mRNS-Expression der drei RP sehr gut miteinander korreliert, allerdings wurde ein mRNS-Abfall - kein Zuwachs - in den Malignomproben verzeichnet. Dies stützt die Hypothese, dass die verminderten S19 mRNS-Level in HNSCC auf eine veränderte Ribosomenanzahl in der Zelle zurückzuführen sind. Der Vergleich der S6 und S14 mRNS-Level zwischen den HNSCC Zelllinien und Keratinozytenzelllinien liefert ähnliche Ergebnisse wie für S19: Die S6 und S14 mRNS sind in den HNSCC Zelllinien signifikant erniedrigt. Da die gemessenen Veränderungen in ähnlicher Weise alle drei untersuchten RP-mRNS-Moleküle betreffen, ist es wahrscheinlicher, dass die Abnahme in den HNSCC Zelllinien mit der ribosomalen Funktion des S19 zusammenhängt und nicht mit einer der zahlreichen extraribosomalen. Um hier Klarheit zu gewinnen, müssten weitere RP bezüglich ihres Expressionsverhaltens untersucht werden. Auch die Bestimmung der tatsächlichen Ribosomenanzahl würde weitere Hinweise liefern.

7.5. Ausblick

Bei dem angewandten Verfahren der RT-PCR handelt es sich um eine semiquantitative Methode. Die Messung erfolgt am Endpunkt der Untersuchung und ist somit anfällig für Störungen während der Amplifikationsphase. Die Bestimmung der Fragmentmenge über Agarosegelelektrophorese beruht auf der Größe und Farbintensität der erhaltenen Gelbanden, was die Sensitivität der Methode beeinträchtigt. Neuere Methoden wie die *Real-Time* PCR, bei der Fluoreszenzmission als Indikator für die Amplikon-Produktion in der exponentiellen Phase der Reaktion im geschlossenen *Tube* gemessen wird, sind weniger störanfällig und liefern sehr viel genauere Daten [Giulietti et al., 2001]. Der nächste Schritt wäre demnach eine Bestätigung der Ergebnisse dieser Arbeit und eine genaue Quantifizierung des gemessenen Expressionsunterschieds mit sensitiveren Methoden wie z.B. der schon erwähnten *Real-Time* PCR, der *Northern* Hybridisierung oder dem Ribonuklease *Protection Assay*.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen keine endgültige Aussage darüber zu, ob die S19 mRNA-Repression in HNSCC eine Folge der Karzinogenese oder ursächlich an deren Entstehung und Fortschreiten beteiligt ist. Ebenso bleibt zu untersuchen, ob diese mRNA-Repression mit den ribosomalen oder extraribosomalen Funktionen des S19 in Zusammenhang steht. Neben den bisher aufgezeigten Ansätzen, die helfen könnten, die Pathomechanismen der S19 mRNA-Repression in HNSCC zu klären, könnten Untersuchungen hinsichtlich der klinischen Einsatzmöglichkeit der Daten folgen. Moleküle, die sich durch ein verändertes Expressionsverhalten in maligne entarteten Zellen auszeichnen, bieten sich als Detektionstumormarker oder - bei entsprechender Korrelation, zur Verlaufskontrolle maligner Erkrankungen an. Um den Einsatz der S19 mRNA als Tumormarker zu überprüfen, müssten zunächst größere Studien durchgeführt werden. Sollte sich bestätigen, dass die S19 mRNA-Repression auch auf Proteinebene gegeben ist, könnten weitere Verfahren wie ELISA Analysen, *Western* Hybridisationen oder Antikörperuntersuchungen anderer Art getestet werden. Da S19 außer in sämtlichen Körperzellen auch im Serum nachgewiesen werden konnte [Absi et al., 1989; Nishiura et al., 1996; Yamamoto et al., 1996; Drapchinskaia et al., 1999], kommen neben Gewebe- auch Blutproben als Untersuchungsmaterial in Betracht.

Nicht zuletzt gilt das Interesse therapeutischen Interventionsmöglichkeiten, wie sie bereits für einige RP erforscht werden. So konnten Khanna et al. bei der Untersuchung verschiedener Zelllinien, u.a. aus Larynxkarzinomen, Gliomen und *non-small-cell Lungcancer*, zeigen, dass S29 die Apoptose in diesen Malignomen induziert und für Lungenkarzinome die Wirkung verschiedener Chemotherapeutiker deutlich verstärkt [Khanna et al., 2003]. Ein Zusammenhang mit der Apoptosefähigkeit von Zellen ist auch für das S19 beschrieben [Horino et al., 1998; Nishiura et al., 1998; Nishiura et al., 1999]. Sollte sich zeigen, dass die S19 mRNS-Repression kausal an der HNCSS Karzinogenese beteiligt ist, könnten entsprechende Therapieansätze auch für HNSCC erprobt werden. Zumal am Beispiel der DBA bereits erfolgreiche Ansätze für eine Gentherapie mit dem S19 Gen beschrieben wurden [Hamaguchi et al., 2002; Hamaguchi et al., 2003].

8. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Analyse von Ausmaß, Häufigkeit und Charakter der mRNA-Expression des ribosomalen Proteins S19 (S19) in *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma* (HNSCC). Als Methode wurde die Reverse Transkription-*Polymerase Chain Reaction* mit spezifischen S19 *Primern* gewählt. Untersucht wurden 18 HNSCC Zelllinien im Vergleich mit 17 benignen Keratinozytenzelllinien sowie 30 HNSCC Gewebeproben im Vergleich mit 8 Referenz-Gewebeproben.

Für den Vergleich der HNSCC Zelllinien mit den benignen Keratinozytenzelllinien konnten die DDRT-PCR Voruntersuchungen bestätigt werden: In den HNSCC Zelllinien fand sich eine signifikante S19 mRNA-Repression. Niedrige S19 mRNA-Level korrelierten mit einem stärker entdifferenzierten Zellbild. Für die Gewebe zeichnete sich eine ähnliche Tendenz ab - signifikante Ergebnisse konnten jedoch nicht ermittelt werden. Lediglich eine große Karzinomausbreitung korrelierte signifikant mit niedrigen S19 mRNA-Leveln, wodurch die für die Zelllinien gewonnenen Ergebnisse gestützt werden.

Um zu prüfen, ob die S19 mRNA-Repression lediglich auf veränderte Ribosomenzahlen zurückzuführen war, wurden zwei weiterer ribosomale Proteine, S6 und S14, mit derselben Methodik untersucht. Die mRNA-Expressionslevel aller drei ribosomalen Proteine zeigten hohe Korrelationen. Dies spricht für einen Zusammenhang der ribosomalen Rolle des S19 mit seiner mRNA-Repression in HNSCC.

Die Ursachen der S19 mRNA-Repression in HNSCC wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Ungeklärt bleibt die Frage, ob die S19 mRNA-Repression Ursache oder Folge der malignen Degeneration ist und ob ribosomale oder extraribosomale Funktionen des S19 betroffen sind. Weitere Untersuchungen sind nötig, um einen möglichen Einsatz des S19 als Tumormarker und Verlaufparameter oder aber Zielprotein für therapeutische Interventionen abzuklären.

9. ANHANG

| Nummer der Biopsate und Zelllinien | Alter und Geschlecht der Patienten | Lokalisation des Karzinoms | Primarius oder Metastase | TNM Stage | Grading | S19 mRNS-Expression | S6 mRNS-Expression | S14 mRNS-Expression |
|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------|---------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | | | | zum Diagnosezeitpunkt | | | | |
| 465 | 66/M | Oropharynx | Primarius | T4N0M0 | G4 | + | + | + |
| 466 | 52/M | CUP | Metastase | TxN2bM0 | | - | + | - |
| 477 | 61/M | Larynx | Primarius | T4N0M0 | G2 | - | - | - |
| 496 | 53/M | Oropharynx | Primarius | T3N0M0 | G2 | ++ | | |
| 503 | 61/F | Oropharynx | Primarius | T4N2aM0 | G2 | - | - | - |
| 524 | 45/M | Larynx | Primarius | T3N2cM0 | G3 | + | | |
| 542 | 50/M | Hypopharynx | Primarius | T4N2cM0 | G2 | - | - | - |
| 564 | 55/M | Larynx | Primarius | T1N0M0 | G2 | ++ | | |
| 576 | 57/M | Oropharynx | Primarius | T4N2bM0 | G1 | + | - | - |
| 609 | 63/M | Larynx | Primarius | T4N2cM0 | G2 | ++ | ++ | + |
| 619 | 63/M | Larynx | Primarius | T4N2cM0 | G2 | + | | |
| 620 | 50/F | Larynx | Primarius | T4N2cM0 | G2 | - | | |
| 621 | 37/M | Larynx | Primarius | T4N2cM0 | G3 | + | - | + |
| 657 | 61/M | Oropharynx | Primarius | T4N2cM0 | G2 | ++ | ++ | + |
| 662 | 63/M | Larynx | Primarius | T2N1M0 | G3 | ++ | + | + |
| 680 | 63/M | Unterlippe | Primarius | T2N0M0 | G1 | ++ | | |
| 683 | 53/M | Oropharynx | Primarius | T2N2cM0 | G2 | ++ | | |
| 693 | 52/M | Oropharynx | Primarius | T2N2aM0 | G3 | ++ | | |
| 700 | 58/M | Hypopharynx | Primarius | T3N0M0 | G3 | + | + | - |
| 708 | 47/M | Oropharynx | Metastase | T4N2cM0 | G3 | ++ | | |
| 745 | 48/M | Oropharynx | Primarius | T4N2bM0 | G2 | - | - | - |
| 747 | 51/M | Hypopharynx | Primarius | T3N0M0 | G3 | - | - | - |
| 772 | 71/M | Larynx | Primarius | T2N1M0 | G2 | ++ | ++ | ++ |
| 778 | 61/M | Larynx- Hypopharynx | Primarius | T4N3M0 | G3 | ++ | | |
| 783 | 42/M | Larynx | Primarius | T4N1M0 | G2 | ++ | ++ | + |
| 799 | 66/M | Hypopharynx | Primarius | T4N3M1 | G3 | - | - | - |
| 852 | 64/F | Hypopharynx- Ösophagus | Primarius | T4NxM0 | G2 | - | - | - |
| 854 | 79/F | Larynx | Primarius | T2N2cM0 | G2 | - | - | + |
| 858 | 59/M | Larynx | Primarius | T3N0M0 | G2 | - | - | + |
| 865 | 61/M | Oropharynx | Primarius | T4N2aM0 | G2 | -- | - | - |
| SCC 745 | 48/M | Oropharynx | Primarius | T4N2bM0 | G2 | -- | - | -- |
| UM 1 | 73/M | Mundboden | Rezidiv | T2N0M0 | G2 | -- | -- | -- |
| UM 3 | 73/F | Nasensinus | Metastase | T1N0M0 | G2 | -- | - | - |
| UM 9 | 71/F | Zunge | Metastase | T2N0M0 | G1-2 | + | | |
| UM 14a | 58/F | Mundboden | Rezidiv | T1N0M0 | G2-3 | -- | - | -- |
| UM 14b | 59/F | Mundboden | Rezidiv | T1N0M0 | G3 | -- | - | -- |
| UM 14c | 59/F | Mundboden | Rezidiv | T2N1M0 | G3 | -- | - | - |
| UM 19 | 67/M | Zunge | Primarius | T2N1M0 | G1-2 | -- | | |
| UM 22b | 58/F | Hypopharynx | Metastase | T2N1M0 | G1-2 | ++ | + | - |
| UM 27 | fehlt | Zunge | Primarius | T1N0M0 | G1-2 | + | - | + |
| UT 8 | 42/M | Larynx | Primarius | T2N0M0 | G1 | - | -- | - |
| UT 10 | 62/M | Zunge | Primarius | T1N0M0 | G2 | + | | |
| UT 16a | 77/F | Zunge | Primarius | T3N0M0 | G3 | - | - | -- |
| UT 16b | 77/F | Zunge | Metastase | T3N0M0 | G3 | -- | - | -- |
| UT 19a | 44/M | Larynx | Primarius | T4N0M0 | G2 | -- | - | - |
| UT 19b | 44/M | Larynx | Primarius | T4N0M0 | G2 | ++ | | |
| UT 24a | 41/M | Zunge | Primarius | T2N0M0 | G2 | - | + | - |
| UT 24b | 41/M | Zunge | Metastase | T2N0M0 | G2 | - | | |

Tabelle 1a Klinische Daten sowie S19, S6 und S14 mRNS-Expressionsgrade in HNSCC Gewebeproben und Zelllinien: Alter in Jahren, M = Mann, F = Frau. Die mRNS-Expression von S19, S6 und S14 wurde mittels RT-PCR bestimmt und in vier Gruppen von - - (stark erniedrigt) bis + + (stark erhöht) eingeteilt. Als Vergleich diente jeweils der Median der untersuchten Referenzproben. CUP = *Carcinoma of Unknown Primary*.

| Nummer der Biopsate und Zelllinien | Alter und Geschlecht der Patienten | Entnahmestelle der Probe |
|--|--|-----------------------------|
| R 491 | 50/M | Oropharynx |
| R 494 | 64/M | Larynx |
| R 618 | 43/M | Oropharynx |
| R 716 | 34/M | Oropharynx |
| R 753 | 52/M | Oropharynx |
| R 779 | 56/M | Oropharynx |
| R 786 | 50/M | Oropharynx |
| R 821 | 61/M | Larynx |
| K 59 | 25/M | Oropharynx |
| K 60 | 27/F | Oropharynx |
| K 62 | 20/F | Oropharynx |
| K 63 | 15/F | Oropharynx |
| K 65 | 4/F | Oropharynx |
| K 74 | 7/F | Oropharynx |
| K 75 | 20/F | Oropharynx |
| K 76 | 33/M | Oropharynx |
| K 77 | 32/F | Oropharynx |
| K 78 | 18/M | Oropharynx |
| K 79 | 5/F | Oropharynx |
| K 80 | 28/M | Oropharynx |
| K 83 | 43/M | Oropharynx |
| K 84 | 32/F | Oropharynx |
| K 89 | 10/F | Oropharynx |
| K 91 | 38/M | Oropharynx |
| K 98 | 39/F | Oropharynx |

Tabelle 1b Klinische Daten der Referenzgewebe und –zelllinien: Alter in Jahren, M = Mann, F = Frau.

10. LITERATURVERZEICHNIS

Absi, M., La Vergne, J. P., Marzouki, A., Giraud, F., Rigal, D., Reboud, A. M., Reboud, J. P., Monier, J. C. (1989): Heterogeneity of ribosomal autoantibodies from human, murine and canine connective tissue diseases. *Immunol Lett* 23, 35-41.

Amaldi, F., Pierandrei-Amaldi, P. (1990): Translational regulation of the expression of ribosomal protein genes in *Xenopus laevis*. *Enzyme* 44, 93-105.

Avni, D., Shama, S., Loreni, F., Meyuhass, O. (1994): Vertebrate mRNAs with a 5'-terminal pyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells: characterization of the translational cis-regulatory element. *Mol Cell Biol* 14, 3822-3833.

Barnard, G. F., Staniunas, R. J., Bao, S., Mafune, K., Steele, G. D. J., Gollan, J. L., Chen, L. B. (1992): Increased expression of human ribosomal phosphoprotein P0 messenger RNA in hepatocellular carcinoma and colon carcinoma. *Cancer Res* 52, 3067-3072.

Barnard, G. F., Staniunas, R. J., Mori, M., Puder, M., Jessup, M. J., Steele, G. D. J., Chen, L. B. (1993): Gastric and hepatocellular carcinomas do not overexpress the same ribosomal protein messenger RNAs as colonic carcinoma. *Cancer Res* 53, 4048-4052.

Baumgartner, S., Martin, D., Chiquet-Ehrismann, R. (1993): *Drosophila* ribosomal protein S19 cDNA sequence. *Nucleic Acids Res* 21, 3897.

Bishop, J.M. (1987): The Molecular Genetics of Cancer. *Science* 235, 305-311.

Bode, U., Lutter, L. C., Kurland, C. G., Zeichhardt, H., Stoffler, G. (1974 b): Protein neighborhoods of the *E. coli* 30S ribosomal subunit. *Acta Biol Med Ger* 33, 625-628.

Bode, U., Lutter, C., Stoffler, G. (1974 a): Proteins S14 and S19 are near-neighbors in the *E. coli* ribosome. *FEBS Lett* 45, 232-236.

Bollen, A., Heimark, R. L., Cozzone, A., Traut, R. R., Hershey, J. W. (1975): Cross-linking of initiation factor IF-2 to *Escherichia coli* 30 S ribosomal proteins with dimethylsuberimidate. *J Biol Chem* 250, 4310-4314.

Bozzoni, I., Beccari, E., Luo, Z. X., Amaldi, F., Pierandrei-Amaldi, P., Campioni, N. (1981): *Xenopus laevis* ribosomal protein genes: isolation of recombinant c DNA clones and study of the genomic organization. *Nucleic Acids Res* 9, 1069-1086.

Caffarelli, E., Fracapane, P., Gehring, C., Bozzoni, I. (1987): The accumulation of mature RNA for the *Xenopus laevis* ribosomal protein L1 is controlled at the level of splicing and turnover of the precursor RNA. *EMBO J* 6, 3493-3498.

Capel, M. S., Engelman, D. M., Freeborn, B. R., Kjeldgaard, M., Langer, J. A., Ramakrishnan, V., Schindler, D. G., Schneider, D. K., Schoenborn, B. P., Sillers, I. Y. (1987): A complete mapping of the proteins in the small ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *Science* 238, 1403-1406.

Chen, Q.-M., Mariottini, P., Bagni, C., Amaldi, F. (1992): The pyrimidine sequence encompassing the transcription start point of *Xenopus laevis* ribosomal-protein-encoding genes is not obligatory for activity in oocytes. *Gene* 119, 283-286.

Chester, K. A., Robson, L., Begent, R. H., Talbot, I. C., Pringle, J. H., Primrose, L., Macpherson, A. J., Boxer, G., Southall, P., Malcolm, A. D. (1989): Identification of a human ribosomal protein mRNA with increased expression in colorectal tumours. *Biochim Biophys Acta* 1009, 297-300.

Conklin, P. L., Hanson, M. R. (1991): Ribosomal protein S19 is encoded by the mitochondrial genome in *Petunia hybrida*. *Nucleic Acids Res* 19, 2701-2705.

Copper, M. P., Jovanovic, A., Nauta, J. J., Braakhuis, B. J., de Vries, N., van der Waal, I., Snow, G. B. (1995): Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121, 157-160.

Da Costa, L., Tchernia, G., Gascard, P., Lo, A., Meerpohl, J., Niemeyer, C., Chasis, J. A., Fixler, J., Mohandas, N. (2003): Nucleolar localization of RPS19 protein in normal cells and mislocalization due to mutations in the nucleolar localization signals in 2 Diamond-Blackfan anemia patients: potential insights into pathophysiology. *Blood* 101, 5039-5045.

Davydova, N. L., Rak, A. V., Gryaznova, O. I., Liljas, A., Jonsson, B. H., Berglund, H., Hard, T., Garber, M. B. (1997): Preliminary NMR studies of *Thermus thermophilus* ribosomal protein S19 overproduced in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 415, 155-159.

Dequard-Chablat, M., Coppin-Raynal, E., Picard-Bennoun, M., Madjar, J. J. (1986): At least seven ribosomal proteins are involved in the control of translational accuracy in a eukaryotic organism. *J Mol Biol* 190, 167-175.

Dijk, J., Littlechild, J., Garrett, R. A. (1977): The RNA binding properties of "native" protein-protein complexes isolated from the *Escherichia coli* ribosome. *FEBS Lett* 77, 295-300.

Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T. N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., Tentler, D., Mohandas, N., Carlsson, B., Dahl, N. (1999): The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 21, 169-175.

Erikson, E., Maller, J. L. (1989): In Vivo Phosphorylation and Activation of Ribosomal Protein S6 Kinases during *Xenopus* Oocyte Maturation. *J Biol Chem* 264, 13711-13717.

Etter, A., Bernard, V., Kenzelmann, M., Tobler, H., Muller, F. (1994): Ribosomal heterogeneity from chromatin diminution in *Ascaris lumbricoides*. *Science* 265, 954-956.

Expert-Bezancon, A., Barritault, D., Milet, M., Guerin, M. F., Hayes, D. H. (1977): Identification of neighbouring proteins in *Escherichia coli* 30 S ribosome subunits. *J Mol Biol* 112, 603-629.

Ferlito, A., Rinaldo, A., Devaney, K. O. (1995): Malignant laryngeal tumors: phenotypic evaluation and clinical implications. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104, 587-589.

Ferrari, S., Manfredini, R., Tagliafico, E., Rossi, E., Donelli, A., Torelli, G., Torelli, U. (1990): Noncoordinated Expression of S6, S11, and S14 Ribosomal Protein Genes in Leukemic Blast Cells. *Cancer Res* 50, 5825-5828.

Field, J. K., Kiaris, H., Risk, J. M., Tsiriyotis, C., Adamson, R., Zoumpourlis, V., Rowley, H., Taylor, K., Whittaker, J., Howard, P., Beirne, J. C., Gosney, J. R., Woolgar, J., Vaughan, E. D., Spandidos, D. A., Jones, A. S. (1995): Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival. *Br J Cancer* 72, 1180-1188.

Foulkes, W. D., Brunet, J. S., Sieh, W., Black, M. J., Shenouda, G., Narod, S. A. (1996): Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. *BMJ* 313, 716-721.

Fracchiolla, N. S., Pignataro, L., Capaccio, P., Trecca, D., Boletini, A., Ottaviani, A., Polli, E., Maiolo, A. T., Neri, A. (1995): Multiple Genetic Lesions in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas. *Cancer* 75, 1292-1301.

Franco, E. L., Kowalski, L. P., Oliveira, B. V., Curado, M. P., Pereira, R. N., Silva, M. E., Fava, A. S., Torloni, H. (1989): Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 43, 992-1000.

Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. (2001): An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25, 386-401.

Gustavsson, P., Garelli, E., Draptchinskaia, N., Ball, S., Willig, T. N., Tentler, D., Dianzani, I., Punnett, H. H., Shafer, F. E., Cario, H., Ramenghi, U., Glomstein, A., Pfeiffer, R. A., Goringe, A., Olivieri, N. F., Smibert, E., Tchernia, G., Elinder, G., Dahl, N. (1998): Identification of microdeletions spanning the Diamond-Blackfan anemia locus on 19q13 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 63, 1388-1395.

Gustavsson, P., Skeppner, G., Johansson, B., Berg, T., Gordon, L., Kreuger, A., Dahl, N. (1997 b): Diamond-Blackfan anaemia in a girl with a de novo balanced reciprocal X;19 translocation. *J Med Genet* 34, 779-782.

Gustavsson, P., Willing, T. N., van Haeringen, A., Tchernia, G., Dianzani, I., Donner, M., Elinder, G., Henter, J. I., Nilsson, P. G., Gordon, L., Skeppner, G., van't Veer-Korthof, L., Kreuger, A., Dahl, N. (1997 a): Diamond-Blackfan anaemia: genetic homogeneity for a gene on chromosome 19q13 restricted to 1.8 Mb. *Nat Genet* 16, 368-371.

Hamaguchi, I., Flygare, J., Nishiura, H., Brun, A. C., Ooka, A., Kiefer, T., Ma, Z., Dahl, N., Richter, J., Karlsson, S. (2003): Proliferation deficiency of multipotent hematopoietic progenitors in ribosomal protein S19 (RPS19)-deficient diamond-Blackfan anemia improves following RPS19 gene transfer. *Mol Ther* 7, 613-622.

Hamaguchi, I., Ooka, A., Brun, A., Richter, J., Dahl, N., Karlsson, S. (2002): Gene transfer improves erythroid development in ribosomal protein S19-deficient Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 100, 2724-2731.

Heimark, R. L., Kahan, L., Johnston, K., Hershey, J. W., Traut, R. R. (1976): Cross-linking of initiation factor IF3 to proteins of the Escherichia coli 30 S ribosomal subunit. *J Mol Biol* 105, 219-230.

Hirano, H., Eckart, K., Kimura, M., Wittmann-Liebold, B. (1987): Semi-preparative HPLC purification of ribosomal proteins from *Bacillus stearotherophilus* and sequence determination of the highly conserved protein S19. *Eur J Biochem* 170, 149-157.

Horino, K., Nishiura, H., Ohsako, T., Shibuya, Y., Hiraoka, T., Kitamura, N., Yamamoto, T. (1998): A monocyte chemotactic factor, S19 ribosomal protein dimer, in phagocytic clearance of apoptotic cells. *Lab Invest* 78, 603-617.

Hunter, T. (1991): Cooperation between oncogenes. *Cell* 64, 249-270.

Janov, A. J., Leong, T., Nathan, D. G., Guinan, E. C. (1996): Diamond-Blackfan anemia. Natural history and sequelae of treatment. *Medicine (Baltimore)* 75, 77-78.

Kay, M. A., Jacobs-Lorena, M. (1985): Selective translational regulation of ribosomal protein gene expression during early development of *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 5, 3583-3592.

Khanna, N., Sen, S., Sharma, H., Singh, N. (2003): S29 ribosomal protein induces apoptosis in H520 cells and sensitizes them to chemotherapy. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 26-35.

Kimura, M., Kimura, J., Hatakeyama, T. (1988): Amino acid sequences of ribosomal proteins S11 from *Bacillus stearotherophilus* and S19 from *Halobacterium marismortui*. Comparison of the ribosomal protein S11 family. *FEBS Lett* 240, 15-20.

Klein, H., Gervais, C., Suh, M. (1990): Nucleotide sequence of a hamster cDNA highly homologous to the *Xenopus laevis* S19 ribosomal protein. *Nucleic Acids Res* 18, 3997.

Knight, C. R., Rees, R. C., Griffin, M. (1991): Apoptosis: a potential role for cytosolic transglutaminase and its importance in tumour progression. *Biochim Biophys Acta* 1096, 312-318.

Koliopanos, A., Friess, H., di Mola, F. F., Tang, W. H., Kubulus, D., Brigstock, D., Zimmermann, A., Buchler, M. W. (2002): Connective tissue growth factor gene expression alters tumor progression in esophageal cancer. *World J Surg* 26, 420-427.

Kondoh, N., Schweinfest, C. W., Henderson, K. W., Papas, T. S. (1992): Differential expression of S19 ribosomal protein, laminin-binding protein, and human lymphocyte antigen class I messenger RNAs associated with colon carcinoma progression and differentiation. *Cancer Res* 52, 791-796.

Lake, J. A. (1976): Ribosome Structure Determined by Electron Microscopy of *Escherichia coli* Small Subunits, Large Subunits and Monomeric Ribosomes. *J. Mol. Biol.* 105, 131-159.

Lake, J. A. (1985): Evolving ribosome structure: domains in archaeobacteria, eubacteria, eocytes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 54, 507-530.

Lake, J. A., Kahan, L. (1975): Ribosomal proteins S5, S11, S13 and S19 localized by electron microscopy of antibody-labeled subunits. *J Mol Biol* 99, 631-644.

Langberg, S., Kahan, L., Traut, R. R., Hershey, J. W. (1977): Binding of protein synthesis initiation factor IF1 to 30 S ribosomal subunits: effects of other initiation factors and identification of proteins near the binding site. *J Mol Biol* 117, 307-319.

Lelong, J. C., Gros, D., Gros, F., Bollen, A., Maschler, R., Stoffler, G. (1974): Function of individual 30S subunit proteins of *Escherichia coli*. Effect of specific immunoglobulin fragments (Fab) on activities of ribosomal decoding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 248-252.

Levy, S., Avni, D., Hariharan, N., Perry, R. P., Meyuhas, O. (1991): Oligopyrimidine tract at the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3319-3323.

Lewin, B. (1994): Ribosomes provide a translation factory. *Genes V*. Oxford University Press and Cell Press.

Lewin, F., Norell, S. E., Johansson, H., Gustavsson, P., Wennerberg, J., Biorklund, A., Rutqvist, L. E. (1998): Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 82, 1367-1375.

Li, B., Sun, M., He, B., Yu, J., Zhang, Y. D., Zhang, Y. L. (2002): Identification of differentially expressed genes in human uterine leiomyomas using differential display. *Cell Res Mar* 12, 39-45.

Lin, F. L., Boublik, M., Ofengand, J. (1984 b): Immunoelectron microscopic localization of the S19 site on the 30 S ribosomal subunit which is crosslinked to A site bound transfer RNA. *J Mol Biol* 172, 41-55.

Lin, F. L., Kahan, L., Ofengand, J. (1984 a): Crosslinking of phenylalanyl-tRNA to the ribosomal A site via a photoaffinity probe attached to the 4-thiouridine residue is exclusively to ribosomal protein S19. *J Mol Biol* 172, 77-86.

Malygin, A., Baranovskaya, O., Ivanov, A., Karpova, G. (2003): Expression and purification of human ribosomal proteins S3, S5, S10, S19, and S26. *Protein Expr Purif* 28, 57-62.

Mankin, A. S. (1989): The nucleotide sequence of the genes coding for the S19 and L22 equivalent ribosomal proteins from *Halobacterium halobium*. *FEBS Lett* 246, 13-16.

Mariottini, P., Amaldi, F. (1990): The 5' untranslated region of mRNA for ribosomal protein S19 is involved in its translational regulation during *Xenopus* development. *Mol Cell Biol* 10, 816-822.

Mariottini, P., Bagni, C., Annesi, F., Amaldi, F. (1988): Isolation and nucleotide sequences of cDNAs for *Xenopus laevis* ribosomal protein S8: similarities in the 5' and 3' untranslated regions of mRNAs for various r-proteins. *Gene* 67, 69-74.

Masuda, M., Hirakawa, N., Nakashima, T., Kuratomi, Y., Komiyama, S. (1996): Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas. *Cancer* 78, 390-395.

Matsson, H., Klar, J., Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Carlsson, B., Bowers, D., de Bont, E., Dahl, N. (1999): Truncating ribosomal protein S19 mutations and variable clinical expression in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Genet* 105, 496-500.

Matsson, H., Davey, E. J., Draptchinskaia, N., Hamaguchi, I., Ooka, A., Leveen, P., Forsberg, E., Karlsson, S., Dahl, N. (2004): Targeted disruption of the ribosomal protein S19 gene is lethal prior to implantation. *Mol Cell Biol* 24, 4032-4037.

Monk, R. J., Meyuhas, O., Perry, R. P. (1981): Mammals have multiple genes for individual ribosomal proteins. *Cell* 24, 301-306.

Moore, C. (1971): Cigarette smoking and cancer of the mouth, pharynx, and larynx. A continuing study. *JAMA* 218, 553-558.

Nishiura, H., Shibuya, Y., Matsubara, S., Tanase, S., Kambara, T., Yamamoto, T. (1996): Monocyte chemotactic factor in rheumatoid arthritis synovial tissue. Probably a cross-linked derivative of S19 ribosomal protein. *J Biol Chem* 271, 878-882.

Nishiura, H., Shibuya, Y., Yamamoto, T. (1998): S19 ribosomal protein cross-linked dimer causes monocyte-predominant infiltration by means of molecular mimicry to complement C5a. *Lab Invest* 78, 1615-1623.

Nishiura, H., Tanase, S., Sibuya, Y., Nishimura, T., Yamamoto, T. (1999): Determination of the cross-linked residues in homo-dimerization of S19 ribosomal protein concomitant with exhibition of monocyte chemotactic activity. *Lab Invest* 79, 915-923.

Nomura, M., Gourse, R., Baugham, G. (1984): Regulation of the Synthesis of Ribosomes and Ribosomal Components. *Ann Rev Biochem* 53, 75-117.

Ohara, N., Kimura, M., Higashi, Y., Yamada, T. (1993): Isolation and amino acid sequence of the 30S ribosomal protein S19 from *Mycobacterium bovis* BCG. *FEBS Lett* 331, 9-14.

Olson, H. M., Olah, T. V., Cooperman, B. S., Glitz, D. G. (1988): Immune electron microscopic localization of dinitrophenyl-modified ribosomal protein S19 in reconstituted *Escherichia coli* 30 S subunits using antibodies to dinitrophenol. *J Biol Chem* 263, 4801-4806.

Parkin, D. M., Pisani, P., Ferlay, J. (1999): Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 80, 827-841.

Pierandrei-Amaldi, P., Beccari E., Bozzoni, I., Amaldi, F. (1985): Ribosomal protein production in normal and anucleolate *Xenopus* embryos: regulation at the posttranscriptional and translational levels. *Cell* 42, 317-323.

Pintos, J., Franco, E. L., Oliveira, B. V., Kowalski, L. P., Curado, M. P., Dewar, R. (1994): Mate, coffee, and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in southern Brazil. *Epidemiology* 5, 583-590.

Pisani, P., Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. (1999): Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 83, 18-29.

Pogue-Geile, K., Geiser, J. R., Shu, M., Miller, C., Wool, I. G., Meisler, A. I., Pipas, J. M. (1991): Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein. *Mol Cell Biol* 11, 3842-3849.

Pon, C. L., Pawlik, R. T., Gualerzi, C. (1982): The topographical localization of IF3 on *Escherichia coli* 30 S ribosomal subunits as a clue to its way of functioning. *FEBS Lett* 137, 163-167.

Ponte, P., Ng, S. Y., Engel, J., Gunning, P., Kedes, L. (1984): Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res* 12, 1687-1696.

Rathcke, I. O., Mameghani, N. K., Goeroegh, T., Lippert, B. M., Werner, J. A. (2000): Overexpression of S19 ribosomal protein in laryngeal SCC cell lines detected by DDRT-PCR. *AACR* 41, #4347.

Rhodes, L. D., Van Beneden, R. J. (1997): Isolation of the cDNA and characterization of mRNA expression of ribosomal protein S19 from the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Gene* 197, 295-304.

Rosen, K. V., Alexander, R. W., Wower, J., Zimmermann, R. A. (1993): Mapping the central fold of tRNA^{2(fMet)} in the P site of the *Escherichia coli* ribosome. *Biochemistry* 32, 12802-12811.

Sankaranarayanan, R., Masuyer, E., Swaminathan, R., Ferlay, J., Whelan, S. (1998): Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res* 18, 4779-4786.

Scholes, A. G. M., Field, J. K. (1996): Genomic Instability in Head and Neck Cancer. *Current Topics in Pathology* 90, 1-22, Springer.

Schuster, W., Brennicke, A. (1991): RNA editing makes mistakes in plant mitochondria: editing loses sense in transcripts of a rps19 pseudogene and in creating stop codons in cox1 and rps3 mRNAs of *Oenothera*. *Nucleic Acids Res* 19, 6923-6928.

Schwarzbauer, J., Craven, G. R. (1985): Evidence that *E. coli* ribosomal protein S13 has two separable functional domains involved in 16S RNA recognition and protein S19 binding. *Nucleic Acids Res* 13, 6767-6786.

Sharp, M. G., Adams, S. M., Elvin, P., Walker, R. A., Brammar, W. J., Varley, J. M. (1990): A sequence previously identified as metastasis-related encodes an acidic ribosomal phosphoprotein, P2. *Br J Cancer* 61, 83-88.

Shibuya, Y., Shiokawa, M., Nishiura, H., Nishimura, T., Nishino, N., Okabe, H., Takagi, K., Yamamoto, T. (2001): Identification of receptor-binding sites of monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer. *Am J Pathol* 159, 2293-2301.

Shim, C., Zhang, W., Rhee, C. H., Lee, J. H. (1998): Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array. *Clin Cancer Res* 4, 3045-3050.

Shimizu, M., Craven, G. R. (1976): Chemical inactivation of *Escherichia coli* 30-S ribosomes by iodination. Identification of proteins involved in tRNA binding. *Eur J Biochem* 61, 307-315.

Shrestha, A., Horino, K., Nishiura, H., Yamamoto, T. (1999): Acquired immune response as a consequence of the macrophage-dependent apoptotic cell clearance and role of the monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer in this connection. *Lab Invest* 79, 1629-1642.

Shrestha, A., Shiokawa, M., Nishimura, T., Nishiura, H., Tanaka, Y., Nishino, N., Shibuya, Y., Yamamoto, T. (2003): Switch moiety in agonist/antagonist dual effect of S19 ribosomal protein dimer on leukocyte chemotactic C5a receptor. *Am J Pathol* 162, 1381-1388.

Sonnemann, J., Bauerle, A., Winckler, T., Mutzel, R. (1991): A ribosomal calmodulin-binding protein from *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 266, 23091-23096.

Soulet, F., Al Saati, T., Roga, S., Amalric, F., Bouche, G. (2001): Fibroblast growth factor-2 interacts with free ribosomal protein S19. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 591-596.

Sugita, M., Sugiura, M. (1983): A putative gene of tobacco chloroplast coding for ribosomal protein similar to *E. coli* ribosomal protein S19. *Nucleic Acids Res* 11, 1913-1918.

Suzuki, K., Olvera, J., Wool, I. G. (1990): The primary structure of rat ribosomal protein S19. *Biochimie* 72, 299-302.

- Tasheva, E. S., Roufa, D. J. (1995): Regulation of human RPS14 transcription by intronic antisense RNAs and ribosomal protein S14. *Genes Dev* 9, 304-316.
- Thomas, G., Martin-Perez, J., Siegmann, M., Otto, A. M. (1982): The effect of serum, EGF, PGF2 alpha and insulin on S6 phosphorylation and the initiation of protein and DNA synthesis. *Cell* 30, 235-242.
- TNM-Atlas, 4.Auflage (1998), International Union Against Cancer, Springer.
- Unal, O. F., Ayhan, A., Hosal, A. S. (1999): Prognostic value of p53 expression and histopathological parameters in squamous cell carcinoma of oral tongue. *J Laryngol Otol* 113, 446-450.
- Weinberg, R. A. (1989): Oncogenes, Antioncogenes, and the Molecular Bases of Multistep Carcinogenesis. *Cancer Res* 49, 3713-3721.
- Weitzmann, C., Tumminia, S. J., Boublik, M., Ofengand, J. (1991): A paradigm for local conformational control of function in the ribosome: binding of ribosomal protein S19 to Escherichia coli 16S rRNA in the presence of S7 is required for methylation of m2G966 and blocks methylation of m5C967 by their respective methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 19, 7089-7095.
- Werner, J. A., Gottschlich, S., Gorogh, T., Folz, B. J., Lippert, B. M., Niemann, A. M. (1997): Untersuchungen zum Nachweis differentiell exprimierter Gene bei Kopf-Hals-Karzinomen. *Laryngorhinootologie* 76, 300-307.
- Willig, T. N., Draptchinskaia, N., Dianzani, I., Ball, S., Niemeyer, C., Ramenghi, U., Orfali, K., Gustavsson, P., Garelli, E., Brusco, A., Tiemann, C., Perignon, J. L., Bouchier, C., Cicchiello, L., Dahl, N., Mohandas, N., Tchernia, G. (1999): Mutations in ribosomal protein S19 gene and diamond blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression. *Blood* 94, 4294-4306.
- Wool, I. G. (1996): Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci* 21, 164-165.
- Yamamoto, T., Nishiura, H., Nishida, H. (1996): Molecular mechanisms to form leukocyte infiltration patterns distinct between synovial tissue and fluid of rheumatoid arthritis. *Semin Thromb Hemost* 22, 507-511.

Zubay, G. (1987): Genetics. 678-679, The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC..

Zurawski, G., Bottomley, W., Whitfeld, P. R. (1984): Junctions of the large single copy region and the inverted repeats in *Spinacia oleracea* and *Nicotiana debneyi* chloroplast DNA: sequence of the genes for tRNA^{His} and the ribosomal proteins S19 and L2. *Nucleic Acids Res* 12, 6547-6558.

11. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. J. A. Werner, Geschäftsführender Direktor des Medizinischen Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Philipps-Universität Marburg, danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Chemikalien.

Für ihre fachlichen Ratschläge und die konstruktive Kritik zur formellen Gestaltung der Arbeit gilt mein Dank den Herren Dr. T. Görögh und Dr. I. O. Rathcke aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Bei den Mitarbeiterinnen im onkologischen Labor des Medizinischen Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Philipps-Universität Marburg, Frau R. Pelzus und Frau G. Sadowsky, sowie bei Frau S. Falkenberg, die den experimentellen Teil ihrer Dissertation ebenfalls in diesem Labor erarbeitete, möchte ich mich für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in die verschiedenen molekulargenetischen Untersuchungstechniken bedanken.

Herrn P. Zoefel, wissenschaftlicher Mitarbeiter am Hochschulrechenzentrum der Philipps-Universität Marburg, danke ich für die Einführung in die *SPSS Software* sowie die Beratung bezüglich statistischer Fragen.

Für ihre Vorschläge zur Gestaltung der Arbeit gilt mein großer Dank nicht zuletzt den Herren L. Pyritz, B. Sengpiel sowie T. Wege Rost, der im Rahmen seiner Dissertation im onkologischen Labor des Medizinischen Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Philipps-Universität Marburg tätig war.

12. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Alfke, Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Battmann, Baum, Beyer, Bertalanffy, Bien, Brilla, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Doss, Ebel, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Folz, Fruhstorfer, Gemsa, Görg, Gotthard, Gotzen, Grimm, Griss, Groß, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Hebebrand, Heeg, Hellinger, Herzum, Hesse, Höffken, Hörsch, Hofmann, Joseph, Jungclas, Kamp-Becker, Kann, Kern, Klenk, Klose, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Kuhn, Lammel, Lang, Lange, Lennartz, Leppek, Lill, Lippert, Löffler, Maisch, Martin, Mattejat, McGregor, Mennel, Merte, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Nies, Niessing, Oertel, Pfab, Ramaswamy, Renz, Röhm, Remschmidt, Richter, Rosenow, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schmidt, Schneyer, Schüffel, Schulte-Körne, Schulz, Schwarz, Seitz, Seyberth, Shiratori, Slenczka, Sommer, Steiniger, Stief, Strassmann, Sturm, Sundermeyer, Suske, Toussaint, Vacha, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Wagner, Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wilke, v. Wichert in Marburg,

Allilaire, Blondon, Darbois, Girardet, Grimprel, Mazet, Samson in Paris,

Altmaier, Beck, Behringer, Ewig, Henke-Lüdecke, John, Latka, Lucanus, Mann, Petrides, Silomon, Teikemeier, Wehr, Wenning in Bochum,

Arabin, Hatzmann, Kock, Leven, Quakernack, Striebeck, Westhof in Witten-Herdecke.

13. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die S19 mRNS-Expression in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes“ in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenerkrankungen unter Leitung von Prof. Dr. J. A. Werner mit Unterstützung durch Dr. T. Görögh und Dr. I. O. Rathcke ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Sengpiel, V., Rost, T., Gorogh, T., Rathcke, I. O., Werner, J. A. (2004): S19-mRNA expression in squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Anticancer Res* 24, 2161-2167.

Verena Sengpiel

Marburg, den 02.06.2005.