

Funktionelle Aspekte von Kollagen XVI und seiner
NC11-Domäne bei der Progression
des oralen Plattenepithelkarzinoms



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Konstanze B. Bedal

aus
Karlsruhe

im Jahr
2015

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Betreuer: PD Dr. Richard Bauer

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 2015

Selbständigkeitserklärung

Ich, Konstanze Barbara Bedal, geboren am 4. September 1985 in Karlsruhe, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

Zusammenfassung

Die ECM (englisch: *extracellular matrix*) ist ein hoch dynamisches Kompartiment, das ständigen, streng regulierten Umstrukturierungen unterliegt. Während einer Krebserkrankung kommt es zur Deregulierung und Umorganisation der ECM im Tumorgewebe. Eine aberrante ECM begünstigt die Karzinogenese und die maligne Zelltransformation. Die Proteinklasse der Kollagene ist maßgeblich an der Gerüstbildung der ECM beteiligt. Kollagene spielen während der Karzinogenese eine wichtige Rolle in der Adhäsion, Migration, Invasion, Angiogenese und der Gewebemorphologie. Im oralen Plattenepithelkarzinom (englisch: *oral squamous cell carcinoma*, OSCC) und im Gliom ist eine erhöhte Expression von Kollagen XVI zu beobachten.

Um ein besseres Verständnis über die Wirkungsweise und den Einfluss einer erhöhten Kollagen XVI Expression auf die Karzinogenese des OSCC zu erlangen, sollen im ersten Teil dieser Dissertation die funktionellen Aspekte von Kollagen XVI auf die Progression des OSCC untersucht werden. Dabei wird mit Hilfe der Überexpression von Kollagen XVI in der OSCC-Tumorzelllinie PC113 (*Pittsburgh Cancer Institute*) auch der zugrunde liegende Signalweg analysiert.

Ziel 1: Im ersten Teil dieser Dissertation sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Einfluss hat eine erhöhte Kollagen XVI Expression auf die maligne Transformation der OSCC Zellen?
- Welche Gene und Proteine sind daran beteiligt?
- Über welchen Signalweg wirkt Kollagen XVI auf diese Gene, beziehungsweise auf die dazugehörigen Proteine?

Zusammenfassend zeigt der erste Teil dieser Arbeit, dass eine Überexpression von Kollagen XVI in OSCC Zellen zur deutlich erhöhten Genexpression und Sekretion der MMP9 (Matrix-Metalloprotease 9) führt, wobei Kollagen XVI autokrin auf die Zellen einwirkt: Nach der Kollagen XVI vermittelten Aktivierung der Zelloberflächenrezeptoren Integrin $\alpha 1\beta 1$ (Eble et al., 2006; Ratzinger et al., 2011) kommt es zur Aktivierung der ILK (englisch: *integrin-linked Kinase*). Dabei führt die Integrinaktivierung zunächst zur verstärkten Interaktion der ILK mit Kindlin-1 und der dadurch vermittelten Rekrutierung der ILK/Kindlin-1 Komplexe in fokale Adhäsionskontakte. Dort kommt es zur Aktivierung der ILK und der anschließenden

Phosphorylierung und Aktivierung der Akt/PKB (Akt/Proteinkinase B). Im Folgenden führt dies zur Aktivierung und Translokalisierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivatorprotein 1) in den Nukleus. AP-1 bindet dort an seine Konsensussequenz im MMP9 Promotor und steigert dadurch die MMP9 Genexpression. Schließlich führt dies zur vermehrten Proteinexpression und Sezernierung von MMP9 in Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen, was die Invasivität dieser Zellen steigert.

Die kontrollierte Proteolyse von Makromolekülen der ECM setzt bioaktive Fragmente frei oder demaskiert kryptische Proteindomänen dieser Makromoleküle. Diese Fragmente besitzen meist spezifische, von ihren Ursprungproteinen verschiedene, bioaktive Eigenschaften und werden entweder als Matrikine oder Matrikryptine bezeichnet. Eine Vielzahl dieser Matrikryptine und Matrikine beeinflussen Wachstum und invasive Eigenschaften von Tumoren. Aus diesem Grund soll im zweiten Teil dieser Dissertation der Einfluss der NC11 (englisch: *non-collagenous 11*) Domäne von Kollagen XVI auf die Progression des OSCC untersucht werden. Mit Hilfe der Überexpression der NC11-Domäne in der OSCC-Tumorzelllinie PCI13 werden die funktionellen Aspekte der NC11-Domäne auf OSCC Zellen analysiert.

Ziel 2: Im zweiten Teil dieser Dissertation sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Wie wirkt sich die Überexpression der NC11-Domäne auf die funktionellen Eigenschaften, wie Proliferation, Migration und Morphologie, der OSCC Zellen aus?
- Welche Gene und Proteine sind daran beteiligt?
- Können Kollagen XVI Fragmente auch in Seren von OSCC Patienten detektiert werden und gegebenenfalls als Biomarker für die Charakterisierung eines OSCC klinische Verwendung finden?

Der zweite Teil dieser Arbeit beschreibt die vaskulogene Wirkung der NC11-Domäne von Kollagen XVI auf OSCC Zellen. Dabei zeigt sich, dass die Überexpression der NC11-Domäne eine Induktion der Gen- und Proteinexpression des Tumor- und Endothel-assoziierten VEGFR1 (englisch: *vascular endothelial growth factor receptor 1*), VEGFR2 und des uPa (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) Rezeptor die vaskulogene Mimikry der OSCC Zellen bewirkt. Funktionell äußert sich die Überexpression der NC11-Domäne in einem unterschiedlichen Proliferationsmuster, einer kleineren Zellgröße, einer verminderten Proliferationsrate und einer Abnahme

der Migrationsaktivität der OSCC Zellen. Zudem verstärkt eine Überexpression der NC11-Domäne die Fähigkeit der OSCC Zellen zur klonalen Expansion. Des Weiteren werden die Wachstumsstrukturen der OSCC Zellen beeinflusst. Durch die NC11 Überexpression besitzen die OSCC Zellen die Fähigkeit zur vaskulogenen Mimikry und bilden bei der 3D Kultivierung auf GFR (englisch: *growth factor reduced*) Matrigel Endothel-ähnliche Netze aus. Nach Inhibition der VEGF Rezeptoren zeigt sich, dass die vaskulogene Mimikry der NC11 überexprimierenden OSCC Zellen VEGFR vermittelt ist.

Bei der Untersuchung von OSCC-Patientenseren können neben dem Volllänge-Kollagen XVI spezifische Kollagen XVI Trunkierungen detektiert werden, die möglicherweise als Matrikryptine definiert werden können. Außer 120, 80, 60, 50 und 40 kDa großen N-terminalen Fragmenten kann auch ein 35 kDa Fragment, das aufgrund seines molekularen Gewichts die NC11-Domäne sein könnte, in Patientenseren nachgewiesen werden. Vergleiche mit Kontrollseren gesunder Individuen lassen eine verstärkte Abspaltung der NC11-Domäne von Kollagen XVI in Seren von OSCC Patienten vermuten.

Inhaltsverzeichnis

Selbständigkeitserklärung.....	III
Zusammenfassung	IV
Inhaltsverzeichnis	1
I. Einleitung.....	6
I.1. Das orale Epithel.....	6
I.2. Das orale Plattenepithelkarzinom	8
I.2.1. Epidemiologie.....	8
I.2.2. Ätiologie und Risikofaktoren.....	9
I.2.3. Tumorgenese	10
I.3. Die extrazelluläre Matrix	12
I.3.1. Funktion	12
I.3.2. Zusammensetzung der extrazellulären Matrix	13
I.3.3. Der Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Entstehung und Entwicklung von malignen Zellen.....	15
I.4. Kollagene	16
I.4.1. Aufbau und Funktion von Kollagenen	16
I.4.2. Kollagen XVI	20
Aufbau und Funktion von Kollagen XVI	20
Kollagen XVI und Karzinogenese	23
I.5. Matrikine und Matrikryptine.....	24
I.5.1. Aufbau und Funktion	24
I.5.2. Die Rolle von Matrikryptinen und Matrikinen bei der Entstehung von Krebs.....	27
I.6. Integrine	28
I.6.1. Der ILK/Akt Signalweg	32
I.7. Angiogenese und vaskulogene Mimikry	33

II. Material und Methoden.....	36
II.1. Zellkultur	36
II.1.1. Zelllinien und Kulturbedingungen.....	36
II.1.2. 3D Kultivierung.....	37
Kultivierung der Zellen auf GFR Matrigel zur Ausbildung von Netzen.....	37
II.1.3. Transfektion	37
Stabile Transfektion	37
A. Stabile Transfektion zur Expression von rekombinatem Kollagen XVI in OSCC Zellen.....	37
B. Stabile Transfektion zur Expression des NC11-GFP Fusionsproteins in OSCC Zellen	38
Transiente Transfektion	39
II.1.4. Gewinnung von rekombinatem Kollagen XVI.....	39
II.1.5. Funktionelle Assays	39
Migrationsassay	39
Invasionsassay.....	40
Proliferationsassay.....	40
BrdU Assay	40
Colony Forming Assay	41
II.1.6. Inhibition der ILK.....	42
II.1.7. Inhibition fokaler Adhäsionskontakte.....	42
II.1.8. Inhibition der VEGF Rezeptoren	42
II.1.9. Inhibition des AP-1	42
II.1.10. Luciferase-Assay.....	43
II.2. Molekularbiologische Methoden	43
II.2.1. Klonierung	43
Der pcDNA™ 6.2/EmGFP/NC11-GFP Vektor	43
Die MMP9-Promotor Reporter-Vektoren für den Luc-Assay.....	44

II.2.2.	Deletion der AP-1 Bindestelle im pGL4.16 (luc2/Neo) MMP9b Reporter-Vektor.....	44
II.2.3.	RNA Isolierung	45
II.2.4.	Reverse Transkription	46
II.2.5.	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mit <i>TaqMan</i> -Sonden.....	46
II.2.6.	Isolierung genomischer DNA	48
II.3.	Proteinchemische Methoden	48
II.3.1.	Proteingewinnung aus Zellen.....	48
	Gesamtprotein-Zelllysate	48
	Proteinisolation nach ihrer subzellulärer Lokalisation	49
II.3.2.	Proteinquantifizierung	49
II.3.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	49
II.3.4.	Western Blot.....	50
II.3.5.	Proteindetektion auf Western Blots.....	51
II.3.6.	Immunpräzipitation mit magnetischen <i>Microbeads</i>	51
II.3.7.	Gelatine Zymographie.....	52
II.3.8.	Immunfluoreszenz-Färbungen	53
II.3.9.	Immunohistochemische Färbung.....	54
II.3.10.	Proximity Ligation Assay	54
II.4.	Statistische Auswertung.....	55
III.	Ergebnisse	56
III.1.	TEIL1:	56
III.1.1.	Einteilung der Kollagen XVI überexprimierenden Zellklone anhand ihrer Kollagen XVI Expressionslevel	56
III.1.2.	Kollagen XVI induziert eine erhöhte <i>MMP9</i> Expression in oralen Plattenepithelkarzinomzellen	58
III.1.3.	Kollagen XVI Überexpression führt zur Aktivierung der <i>integrin linked kinase</i> (ILK).....	59

III.1.4. Kollagen XVI Überexpression führt zur Aktivierung der Proteinkinase B (Akt/PKB)	62
III.1.5. Kollagen XVI Überexpression führt zu vermehrter ILK/Kindlin-1 Interaktion	63
III.1.6. Die AP-1 Bindestelle bei -98 bp im Promotor ist wichtig für die Kollagen XVI induzierte MMP9 Expression.....	66
III.1.7. Kollagen XVI überexprimierende OSCC Zellen weisen eine Interaktion von c-Fos und Dyskerin zusammen mit einer erhöhten JunB Lokalisation im Kern auf	68
III.1.8. Inhibition des AP-1 führt zur Reduktion der MMP9 Genexpression	70
III.1.9. Kollagen XVI Überexpression führt zu einer gesteigerten Invasion von OSCC Zellen.....	70
III.1.10. Zusammenfassung Teil I	72
III.2. TEIL 2:.....	74
III.2.1. Die Überexpression der NC11-Domäne von Kollagen XVI in der OSCC Zelllinie PCI13	74
III.2.2. Auswirkung der NC11-GFP Induktion in OSCC Zellen auf Zellmorphologie und zelluläre Wachstumsmuster	76
III.2.3. Einfluss der NC11-GFP Induktion in OSCC Zellen auf Zellgröße, Proliferation, Migration und die Fähigkeit Kolonien zu bilden.....	77
III.2.4. NC11-GFP Induktion verursacht ein differenzielles Proliferationsmuster	80
III.2.5. NC11-GFP Überexpression beeinflusst das Wachstum in 3D Kultur auf GFR Matrigel	81
III.2.6. Veränderte Genexpression in OSCC Zellen nach NC11-GFP Überexpression	83
III.2.7. NC11-GFP Überexpression induziert eine erhöhte Proteinexpression des VEGFR 1, VEGFR 2 und des uPa Rezeptors in OSCC Zellen.....	86

III.2.8. NC11-GFP vermittelte VEGFR Expression induziert Endothel- ähnliche, netzförmige Wachstumsmuster in OSCC Zellen	89
III.2.9. Analyse von Patientenseren	91
III.2.10. Zusammenfassung Teil II	93
IV. Diskussion	96
IV.1. Kollagen XVI und die Induktion der MMP9 Expression über den ILK/Akt/PKB/AP-1 Signalweg.....	96
IV.1.1. Schlussfolgerung.....	107
IV.2. Die NC11-Domäne und die vaskuläre Mimikry	109
IV.2.1. Schlussfolgerung.....	117
Anhang 1	
A.I. Abkürzungsverzeichnis	A-1
A.II. Abbildungsverzeichnis	A-4
A.III. Tabellenverzeichnis	A-5
A.IV. Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.....	A-6
A.V. verwendete Proteasen.....	A-7
A. VI. Danksagung	A-8
A.VII. Beruflicher Werdegang	A-9
A.VIII. Literatur	A-11

I. Einleitung

I.1. Das orale Epithel

Als orales Epithel bezeichnet man die Oberfläche der oralen Mukosa. Dabei bildet dieses geschichtete Plattenepithel (englisch: *squamous epithelium*) die erste Barriere zwischen der Mundhöhle und den tiefer liegenden Geweben. Das Epithel garantiert seine strukturelle Integrität durch ständige Zellerneuerung, durch mitotische Zellteilung der Vorläuferzellen in den unteren Schichten (*Stratum basale*) des Epithels und Zellmigration zur Oberfläche um alternde, abgestorbene Zellen zu ersetzen. (Nanci, 2003).

Vorläuferzellen befinden sich in dünnen Epithelien nur in der basalen Schicht und in dickeren Epithelien in den unteren zwei bis drei parabasalen Schichten. Dabei bilden sich teilende Zellen häufig Zellcluster. Die Vorläuferzellen lassen sich in zwei Populationen einteilen: die Zellen der ersten und kleineren Population besitzen eine geringe Teilungsrate und es wird angenommen, dass es sich bei ihnen um Stammzellen handelt. Dabei produzieren sie basale Zellen und erhalten so das Proliferationspotential des Gewebes. Die größere Population der sich teilenden Zellen sind Zellen mit einer hohen Teilungsrate. Ihre Aufgabe besteht darin, genügend Zellen für ständige Reifungsprozesse und Zellersatz zur Verfügung zu stellen. Diese postmitotischen Zellen reifen und differenzieren während ihrer Migration von der basalen zur apikalen Seite des Epithels (Nanci, 2003).

Das orale Epithel besteht neben Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und Melanozyten hauptsächlich aus Keratinozyten mit unterschiedlichen Zellschichten, den sogenannten *Strata*. Die histologischen und morphologischen Unterschiede der *Strata* beruhen auf dem unterschiedlichen Differenzierungs- und Reifungsgrad der darin befindlichen Keratinozyten. Strukturell lässt sich das orale Epithel in keratinisiert und nicht-keratinisiert unterteilen. Das keratinisierte Epithel findet man in der Mundhöhle vor allem im Bereich des Zungenrückens. Wie in Abb. 1A zu sehen, besteht das keratinisierte Epithel aus vier Schichten. Das untere *Stratum basale* grenzt an die Basalmembran. Seine Zellen besitzen eine kubische längliche Form. Nur Zellen dieser Schicht sind mitotisch aktiv, während sich die darüber liegenden *Strata* aus postmitotischen, differenzierenden Zellen zusammensetzen. Es folgt das mehrlagige *Stratum spinosum*, dessen elliptische bis sphärische Zellen über

Desmosomen miteinander verbunden sind. Die Keratinozyten des darüber liegenden *Stratum granulosum* sind groß und abgeflacht. Sie synthetisieren in großen Mengen Keratohyalin und reichern es in basophilen Keratohyalin granula an. Das obere *Stratum corneum* besteht aus ineinander verzahnten, verhornten Keratinozyten (Plättchen, *Squames*). Sobald die Zellen das *Stratum corneum* erreichen, zerfallen Zellkern und Organellen und die Zellen dehydrieren. Neben dem keratinisierten Epithel gibt es auch Epithelien in der Mundhöhle die sich teilweise aus keratinisierten und parakeratinisierten Zellen zusammensetzen. Die Zellkerne der Keratinozyten im *Stratum corneum* bleiben bei der Parakeratinisierung erhalten. Allerdings besteht der größte Teil der Mundhöhle (weicher Gaumen, Zungenunterseite, Mundboden, Innenseite der Wangen und der Lippe) aus einem mehrschichtigen, nicht-keratinisierten Epithel. Auch das nicht-keratinisierte Epithel besteht aus verschiedenen *Strata*. Allerdings besitzt es kein *Stratum granulosum* und kein *Stratum corneum*, stattdessen findet man das *Stratum intermedium* und das *Stratum superficiale*. Da orale nicht-keratinisierte Epithelien häufig wesentlich dicker als keratinisierte Epithelien sind, besteht hier das *Stratum spinosum* aus mehr Zellschichten verglichen zum keratinisierten Epithel. Es folgt das *Stratum intermedium*, dessen Zellen abgeflacht sind. Die oberste Zellschicht wird als *Stratum superficiale* bezeichnet. Seine Keratinozyten sind noch flacher, besitzen aber im Gegensatz zu den Plättchen des keratinisierten Epithels noch einen Zellkern. Das mehrschichtige keratinisierte als auch das nicht-keratinisierte Epithel der Mundhöhle werden wegen ihrer abgeflachten, platt abschließenden Zellen auch als Plattenepithelien bezeichnet (Heinzeller and Büsing, 2001; Nanci, 2003).

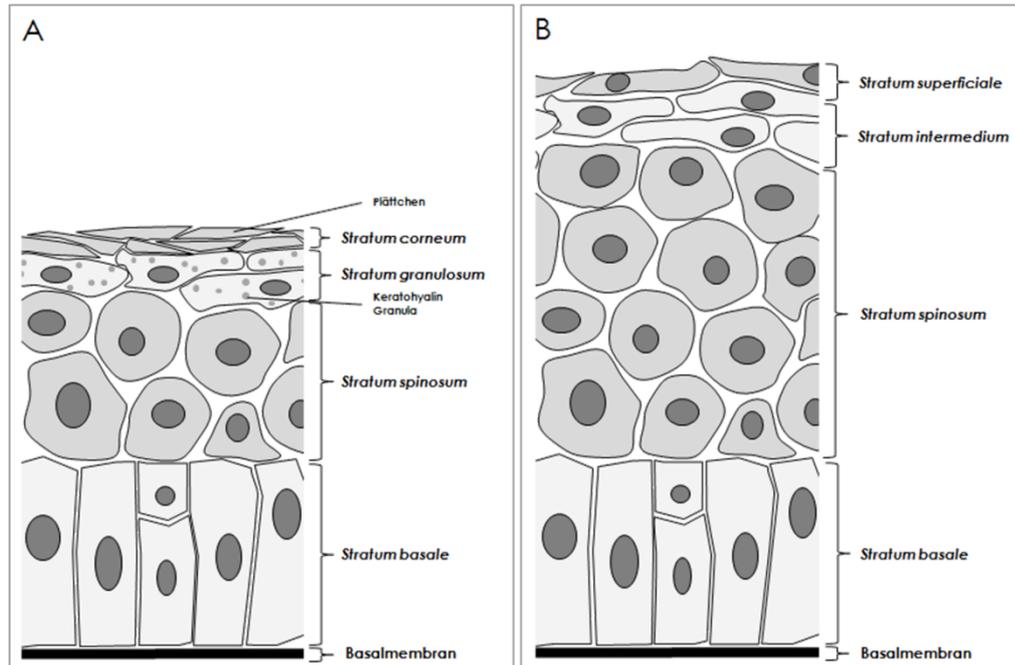


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines mehrschichtigen keratinisierten oralen Platten-epithels (A) und eines mehrschichtigen nicht-keratinisierten oralen Plattenepithels (B)
Zeichnung nach Nanci, 2003

I.2. Das orale Plattenepithelkarzinom

I.2.1. Epidemiologie

Das orale Plattenepithelkarzinom ist mit einem Anteil von mehr als 90% die häufigste Form aller oralen Tumoren (Feller, 2012). Jährlich werden weltweit um die 650.000 Neuerkrankungen diagnostiziert (Argiris et al., 2008). Dabei erkranken Männer um 1,5 fach häufiger als Frauen (Feller, 2012). Das Durchschnittsalter liegt bei einer Erkrankung bei Anfang 60, obwohl in den letzten Jahren ein Anstieg an Patienten unter 45 Jahre zu beobachten war. Die fünf Jahresüberlebensrate liegt trotz verbesserter Operationsmöglichkeiten, Chemotherapie und Strahlentherapie weiterhin bei nur 50% (Argiris et al., 2008). Das liegt zum einen an der schnellen Invasion von malignen Keratinozyten in zervikale Lymphknoten und die dadurch rasche Metastasierung (Baatenburg de Jong et al., 2001). Zum anderen werden OSCCs im Frühstadium und ihre Vorläuferläsionen wegen ihrer fehlenden Schmerzsymptomatik nur selten diagnostiziert (Bagan et al., 2010; Hullmann et al., 2010). Die späte Diagnostizierung von OSCC verschlechtert die Prognose des Patienten dabei erheblich (Kowalski and Carvalho, 2001).

I.2.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Die Hauptrisikofaktoren sind sowohl exzessiver Tabak- als auch Alkoholkonsum, die einen synergetischen Effekt besitzen (Blot et al., 1988; Leemans et al., 2011). In 75% aller OSCC Erkrankungen sind diese Faktoren beteiligt (Argiris et al., 2008). Tabakkonsum beeinflusst die Entstehung von OSCC vor der malignen Transformation stark (Morse et al., 2007). Die kanzerogenen Substanzen im Tabak induzieren im Gewebe die Bildung von freien Sauerstoffradikalen. Die von freien Sauerstoffradikalen hervorgerufenen DNA Schäden können in oralen Zellen zur Mutagenese führen (Zain, 2001). Zu den Hauptrisikofaktoren zählt auch eine antioxidantien- und vitaminarme Ernährung (Scully and Bagan, 2009; Bernier, 2011). Auch mangelnde Mundhygiene, vor allem in Verbindung mit Alkoholkonsum, erhöht das Risiko an OSCC zu erkranken (Meurman and Uttamo, 2008; Bernier, 2011). Dabei wird Alkohol durch Mikroorganismen in der Mundhöhle zum kanzerogenen Acetaldehyd metabolisiert. Dieses verursacht die Bildung von DNA-Addukten und fördert damit die Entstehung von Mutationen.

Untersuchungen in den letzten Jahren weisen zudem auf eine Beteiligung humaner Papillomaviren (HPV) an der Entstehung des OSCCs. Dabei konnte gezeigt werden, dass 25% aller Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich das Genom des onkogenen HPV-16 tragen. Zu der OSCC-Patientengruppe mit einer HPV Infektion gehören häufig Patienten, die weder Tabak konsumieren noch exzessiv Alkohol trinken (Argiris et al., 2008). Zudem sind Tumore dieser Gruppe häufig wenig differenziert. Bei einer Infektion mit HPV-16 kann es zur Inaktivierung der Tumorsuppressoren p53 und pRb (Retinoblastom-Protein) und folglich zur OSCC Entstehung kommen. Daher wird heutzutage eine HPV-Infektion zu den Hauptrisikofaktoren gezählt (Argiris et al., 2008; Leemans et al., 2011; Stransky et al., 2011).

Zu den oben genannten exogenen Risikofaktoren können unter anderem genetische Prädispositionen (wie z. B. das Li Fraumeni Syndrom, Plummer-Vinson Syndrom, Fanconi-Anämie) als auch chronische Immunsuppressionen das Risiko OSCC zu entwickeln, erhöhen (Argiris et al., 2008; Leemans et al., 2011).

I.2.3. Tumorgenese

Orale Plattenepithelkarzinome entstehen überwiegend aus präkanzerogenen Läsionen, die sich in Leukoplakie und Erythroplakie unterscheiden lassen (Hullmann et al., 2010; Bernier, 2011; Leemans et al., 2011). Die Leukoplakie ist eine weiße, nicht abwischbare Mundschleimhautveränderung, die sich klinisch und pathologisch keiner anderen Erkrankung zuordnen lässt. Das Risiko aus einer solchen Leukoplakie ein invasives Karzinom zu entwickeln liegt zwischen 3% und 16% (Bernier, 2011). Dagegen ist die Erythroplakie eine rote, nicht abwischbare Mundschleimhautveränderung mit einem 30 bis 50%igem Risiko sich zu einem invasiven Karzinom zu entwickeln. Auch diese Veränderung der Mundschleimhaut ist klinisch und pathologisch keiner anderen Erkrankung zuzuordnen. (Hullmann et al., 2010; Bernier, 2011; Leemans et al., 2011).

Während der Progression des OSCC wurden diverse Genveränderungen in den transformierten Zellen identifiziert. Dabei handelt es sich generell um die Aktivierung von Onkogenen durch Genamplifikation und Überexpression, sowie um die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, hervorgerufen durch Mutationen und Deletionen. Diese Genveränderungen führen zur Deregulation des Zellverhaltens (z. B. Zellproliferation) und damit zur Tumorentstehung (Hardisson, 2003).

In der frühen Phase der Progression ist in OSCC Zellen am häufigsten der Verlust der chromosomalen Region 9p21 zu beobachten. In diesem Abschnitt liegt das Gen *p16*, dessen Genprodukt $p16^{\text{INK4A}}$ ein wichtiger Inhibitor des Zellzyklus ist (Forastiere et al., 2001; Leemans et al., 2011). Cyclin D bildet mit den Cyclin-abhängigen Kinasen (englisch: *Cyclin-dependent kinase*, CDK) 4 und 6 Komplexe (D-CDK Komplexe), die während der frühen und mittleren G1 Phase aktiviert werden. Diese D-CDK Komplexe sind in der Mitose für die Transition von der G1- in die S-Phase von Bedeutung. Das Protein $p16^{\text{INK4A}}$ verhindert die Aktivierung der D-CDK4 und D-CDK6 Komplexe (Weinberg, 2013).

In der Hälfte aller OSCC kommt es zum Verlust der chromosomalen Region 17p13 oder zu einer Punktmutation des darin enthaltenen Gens *TP53* (Forastiere et al., 2001; Argiris et al., 2008; Leemans et al., 2011). Diese Veränderung ist mit der Progression von einer präinvasiven zu einer invasiven Läsion assoziiert (Forastiere et al., 2001). Das Genprodukt des *TP53* Gens ist der Tumorsuppressor p53. Das p53

Tetramer fungiert im Nucleus als Transkriptionsfaktor. Zum einen initiiert es den Zellzyklusarrest in der G1 Phase zur Reparatur von DNA-Schäden, zum anderen kann aktives p53 auch als Resultat von schwerwiegenden DNA Schäden die Apoptose einleiten (Weinberg, 2013). Der Verlust an aktiven p53 verhindert die Apoptose und verursacht dadurch genetische Instabilität entarteter Keratinozyten (Mannarini et al., 2009).

Des Weiteren wurde in vielen OSCC eine Expression einer konstitutiv aktiven Form des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (englisch: *epidermal growth factor receptor*, EGFR) beobachtet. Die Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert verschiedene Signalkaskaden, die unter anderem die Zellproliferation, das Metastasierungspotential und die Angiogenese entarteter Zellen steigert (Argiris et al., 2008; Weinberg, 2013).

In mehr als 90% aller OSCC Fälle kommt es zu einer Reaktivierung der Telomerase oder ihrer enzymatisch aktiven Untereinheit TERT. Die Telomerase ist bei der Aufrechterhaltung der Telomerlänge und der damit einhergehender Immortalisierung von Zellen beteiligt (Argiris et al., 2008; Leemans et al., 2011).

Bei HPV induzierten Karzinomen kommt es zur Integration der doppelsträngigen Viren-DNA ins Genom der Wirtszelle. Anschließend werden die viralen Onkoproteine E6 und E7 von den infizierten Zellen exprimiert. Das Onkoprotein E6 interagiert mit dem Tumorsuppressor p53 und initiiert dessen Ubiquitinierung und anschließende Degradation. Dadurch wird verhindert, dass die Wirtszelle in Apoptose geht. Das Onkoprotein E7 inhibiert den hypophosphorylierten Tumorsuppressor pRb. In dieser hypophosphorylierten Form inhibiert das pRb den Zellzyklus und ist essentiell für den G₀-Phase Arrest in differenzierten Zellen (Leemans et al., 2011; Weinberg, 2013). Die Inhibierung von pRb in E7 produzierenden Zellen führt zur Unterbrechung des Zellzyklus, zur vermehrten Proliferation und malignen Transformation infizierter Keratinozyten (Marur et al., 2010).

I.3. Die extrazelluläre Matrix

I.3.1. Funktion

Die extrazelluläre Matrix ist ein komplexes und dynamisches Netzwerk aus Makromolekülen mit verschiedenen physikalischen und biochemischen Eigenschaften, das alle Arten von Zellen umgibt und mit ihnen in Kontakt tritt (Hynes, 2009; Frantz et al., 2010; Watt and Huck, 2013; Gattazzo et al., 2014). Sie kommt als nicht-zelluläres Kompartiment in allen Geweben und Organen vor. Neben der Bereitstellung eines Gerüsts zur Stabilisierung der physikalischen Struktur spielt die ECM eine komplexe Rolle in fundamentalen Aspekten der Zellbiologie wie z. B. Zellvitalität, Zellentwicklung, Zellmigration, Zellproliferation, Zellmorphologie und Funktion. (Frantz et al., 2010; Rovinsky, 2011; Gattazzo et al., 2014). Dabei unterscheidet sie sich drastisch in ihrer Zusammensetzung und Topologie sowohl von einem Gewebe zum anderen (z. B. Lunge vs. Haut vs. Knochen) als auch innerhalb von Geweben (renaler Kortex vs. renale Medulla) und auch von einem physiologischen Status zum anderen (gesund vs. kanzerogen). Dazu unterliegt die ECM einem ständigen enzymatischen oder nicht-enzymatischen Umbau und nimmt direkt oder indirekt Einfluss auf die Zellen in ihrer Umgebung.

Die physikalischen Eigenschaften der ECM wie Festigkeit, Porosität, Topographie und Löslichkeit beeinflussen viele Prozesse, die mit der Zellverankerung assoziiert sind, wie z. B. Zellteilung, Zellpolarität und Zellmigration. Über die Bindung der Zellen an die ECM und die Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen, bestehend aus Integrinen (siehe Kapitel I.6), Adaptor- und Signalproteinen, werden biomechanische Kräfte der Matrix in die Zelle übertragen (Mechanotransduktion) (Lu et al., 2012; Gattazzo et al., 2014). Der fokale Adhäsionskomplex fungiert dabei als Mechanosensor und verbindet physikalisch das Aktomyosin- Zytoskelett mit der ECM. Unter dieser Kraftereinwirkung erfahren einige der an diesen Komplexen beteiligten Proteine (z. B. Talin) Konformationsänderungen. Diese Mechano-transduktion hat Einfluss auf das Zellschicksal, Differenzierung und Gewebefunktionen (Lu et al., 2012). Zusätzlich beeinflusst die Zusammensetzung der ECM das Zellschicksal: Wachsen mesenchymale Stammzellen (englisch: *mesenchymal stem cells*, MSCs) auf einer Matrix, die in ihrer Konsistenz der des

Gehirns ähnelt, produzieren diese neuronale Marker. Kultiviert man dieselben MSCs auf ECM, die der von Knochen oder Muskel ähnelt, produzieren diese knochen- oder muskelspezifische Proteine (Hynes, 2009).

Eine weitere wichtige Aufgabe der ECM ist die Präsentation von Wachstumsfaktoren (englisch: *growth factor*, GF). Wachstumsfaktoren binden unter anderem an Heparin und Heparinsulfat, Bestandteile der ECM. Damit bildet die ECM ein Reservoir an Wachstumsfaktoren. Zudem wird vermutet, dass durch die Verankerung der Wachstumsfaktoren an ECM-Proteine stabile Gradienten aufgebaut werden, an denen Zellen chemotaktisch entlang wandern können. Außerdem wurde festgestellt, dass Heparinsulfat auch als Co-Faktor für einige Wachstumsfaktoren fungieren kann (Shi and Massagué, 2003; Mohammadi et al., 2005). Auch durch die enzymatische Degradation der ECM Proteine werden sowohl gebundene Wachstumsfaktoren als auch Wachstumsfaktor-ähnliche Proteinbereiche freigesetzt und dadurch den Zellen kurzfristig zur Verfügung gestellt (Hynes, 2009).

I.3.2. Zusammensetzung der extrazellulären Matrix

Die ECM besteht neben Flüssigkeit aus einer Vielzahl unterschiedlicher Makromoleküle. Hauptsächlich werden diese Makromoleküle von Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten produziert. Eine große Gruppe der Makromoleküle bilden Proteine, wie beispielsweise Faserproteine und Glykoproteine. Aber auch Kohlenhydrate, vor allem Glykosaminoglykane, kommen in großen Mengen in der ECM vor.

Glykosaminoglykane (GAGs) sind nicht verzweigte Polysaccharidketten bestehend aus Disaccharid-Einheiten. Einer der beiden Zucker ist ein Amino-Zucker (N-Acetylglukosamin oder N-Acetylgalactosamin), der meistens sulfatiert vorliegt (z. B. Heparansulfat). GAG-Ketten binden kovalent an spezifische Proteinkerne und bilden eine große Klasse der ECM-Makromoleküle: die Proteoglykane (PGs). GAGs sind hydrophil und sind wichtig für die Hydrogelbildung (Alberts et al., 2002; Frantz et al., 2010). PGs werden anhand ihrer Proteinkerne, Lokalisation und GAG-Zusammensetzung klassifiziert. Dabei werden PGs in drei Familien unterteilt: kleine Leucin-reiche PGs, modulare PGs und Zelloberflächen PGs (Schaefer and Schaefer, 2010). PGs besitzen eine hohe Variabilität in ihren Funktionen, die ihre einzigartigen

Puffer-, Hydratations- und Bindungseigenschaften und ihre Resistenz gegenüber Belastung widerspiegeln (Frantz et al., 2010; Schaefer and Schaefer, 2010).

Die in der ECM am häufigsten vorkommende Proteinfamilie ist die der Kollagene (siehe Kapitel I.4). Kollagene setzen sich unter anderem aus verschiedenen Arten von Fasern zusammen und lassen sich anhand ihrer Struktur und Eigenschaften in unterschiedliche Subfamilien unterteilen. Beispielsweise bilden Kollagen I Fibrillen Kollagenfasern aus, die dem Gewebe Zugfestigkeit verleihen. Dabei sind die Kollagenfasern in Geweben mit Zugbeanspruchung, wie z. B. Sehnen und Bändern, in Richtung der Belastung angeordnet. Neben den zugfesten Kollagenfasern existieren auch elastische Fasern. Sie sind für die Elastizität von Geweben enorm wichtig und ermöglichen die Kompression von Geweben nach wiederholter Dehnung. Dabei hängt der Dehnungsgrad der elastischen Faser mit ihrer engen Assoziation an Kollagenfibrillen zusammen. Die elastische Faser besteht hauptsächlich aus dem Protein Elastin. Elastin ist ein stark hydrophobes Protein und reich an Prolin und Glycin. Die elastischen Fasern sind mit einer Mikrofibrillenschicht, die aus dem Glykoprotein Fibrillin besteht, bedeckt. Diese sind wichtig für die Integrität der elastischen Fasern (Alberts et al., 2002; Frantz et al., 2010)

Ein weiteres ECM Protein ist das Fibronectin. Fibronectin ist ein großes Glykoprotein, das sowohl an spezifische Zelloberflächenrezeptoren als auch an anderen Makromolekülen der ECM binden kann. Es ist daher an der Organisation und Ausrichtung der interstitiellen ECM als auch an der Adhäsion und Funktion von Zellen involviert. Das Fibronectindimer ist über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Jede Untereinheit ist in eine Serie von funktionell unterschiedlichen Domänen unterteilt, die durch flexible Polypeptidketten verbunden sind. Fibronectin interagiert mit Zellen unter anderem über seine Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Peptidsequenz (RGD-Sequenz). Durch zelluläre Zugkräfte kann Fibronectin über ein mehrfaches seiner Eigenlänge hinaus auseinander gezogen werden. Diese Auseinanderfaltung resultiert in der Exposition kryptischer Integrin-Bindestellen (RGD-Sequenz) im Fibronectinmolekül und hat pleiotrope Änderungen im Zellverhalten zur Folge (Alberts et al., 2002; Frantz et al., 2010).

I.3.3. Der Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Entstehung und Entwicklung von malignen Zellen

Die ECM ist ein hoch dynamisches Kompartiment, das ständigen regulierten Umstrukturierungen unterliegt. Der Umbau wird vor allem durch die Kontrolle der Expression und Aktivierung spezifischer Proteasen, wie z. B. Matrix-Metalloproteasen (MMPs), bewerkstelligt. MMPs spielen eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression, da sie am Wachstum, der Invasion und der Metastasierung von malignen Tumoren beteiligt sind. Eine unkontrollierte Expression oder Aktivierung dieser Enzyme kann verheerende Folgen für die Integrität von Geweben haben und schließlich auch zum Tod des gesamten Organismus führen (Reunanen and Kähäri, 2000; Gialeli et al., 2011).

Während einer Krebserkrankung kommt es zur Deregulierung und Umorganisation der ECM im Tumorgewebe. Eine aberrante ECM begünstigt die Progression und die maligne Zelltransformation. Dabei sind Zellen und ECM voneinander abhängig und jede Änderung der ECM beeinflusst unmittelbar angrenzende Zellen. In vielen Tumorerkrankungen kommt es zur Hochregulierung und Aktivierung verschiedener MMPs, was eine erhöhte Freisetzung von Wachstumsfaktoren und kryptischen ECM-Fragmenten zur Folge hat (siehe Kapitel I.5). Zudem wird vermutet, dass durch die Degradation von ECM-Makromolekülen eine Invasion der Tumorzellen begünstigt wird (Frantz et al., 2010; Lu et al., 2012; Gilkes et al., 2014).

In Tumorgeweben sind neben den biochemischen Eigenschaften auch die Architektur und andere physikalische Eigenschaften der ECM verändert. Beispielsweise beobachtet man in Brustkrebs statt den üblicherweise ungeordneten Kollagen I Fibrillen stark linearisierte Fibrillen. Zudem kommt es in Tumorgeweben häufig zur Hochregulierung der Lysinoxidasen. Diese Hochregulierung bewirkt eine verstärkte Vernetzung der Makromoleküle und verursacht eine steifere ECM und somit eine Festigung des Gewebes. Eine steifere ECM begünstigt in der Maus wiederum die Invasion und Progression von Krebszellen. Dies zeigt, dass nicht nur die Makromoleküldichte sondern vor allem deren Organisation eine große Rolle bei der Entstehung von Tumoren spielt (Frantz et al., 2010; Lu et al., 2012; Gilkes et al., 2014).

I.4. Kollagene

I.4.1. Aufbau und Funktion von Kollagenen

Kollagene sind eine Klasse von ECM Proteinen, die maßgeblich bei der Gerüstbildung der ECM beteiligt sind und von Bedeutung für die Adhäsion, Migration, Invasion, Angiogenese und die Gewebemorphologie sind. (Lodish et al., 2000; Kadler et al., 2007; Fratzl, 2008; Shoulders and Raines, 2009; Gordon and Hahn, 2010). Im Menschen sind rund ein Drittel aller Proteine Kollagene und damit die am häufigsten vorkommende Proteinklasse. Bis heute sind 28 verschiedene Kollagene bekannt, bestehend aus mindestens 46 unterschiedlichen Polypeptidketten. Die Hauptproduzenten von Kollagenen sind mesenchymale Zellen und aus ihnen hervorgehende Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten, Odontoblasten und Cementoblasten. Zudem sind auch Epithel-, Endothel-, Muskel- und Schwann Zellen zur Kollagensynthese befähigt (Shoulders and Raines, 2009; V Sandhu et al., 2012).

Jedes Kollagen besteht aus drei Polypeptidketten, den α -Ketten. Diese α -Ketten besitzen eine enge, linksdrehende helikale Primärstruktur mit drei Aminosäuren pro Windung. Jede α -Kette enthält eine unterschiedliche Anzahl an Wiederholungen des Gly-Xxx-Yyy Peptidtriplets, wobei es sich bei Xxx und Yyy um beliebige Aminosäuren handeln kann. Besonders häufig befinden sich Prolin (Pro) an der Xxx-Position und 4-Hydroxyprolin (Hyp) an der Yyy-Position (Alberts et al., 2002; Kadler et al., 2007; Shoulders and Raines, 2009; Gordon and Hahn, 2010; Lauer and Fields, 2010; Adzhubei et al., 2013).

Die Biosynthese von Kollagenen wurde hauptsächlich für fibrilläre Kollagene beschrieben. Diese Kollagene werden von Ribosomen in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums translatiert. Dort kommt es zu einer Vielzahl an posttranslationalen Modifikationen der zentralen Gly-Xxx-Yyy Peptidsequenz: Unter anderem werden Prolin- und Lysinreste an der Yyy Position hydroxyliert, es kommt zur Glykosylierung von Hydroxylysinresten und Asparaginresten am C-terminalem Ende der Polypeptidketten. Anschließend wird das Kollagentrimer im Golgi-Apparat gebildet. Dabei verdrillen sich drei α -Ketten vom C-Terminus ausgehend zu einer rechtsdrehenden Tripelhelix (Superhelix). Die Triplehelix wird über Wasserstoffbrücken der Hydroxyprolinreste und Disulfidbrücken stabilisiert. Anschließend kommt es zur Sezernierung in den extrazellulären Raum und Abspaltung der C- und N-

terminalen Pro-Peptide. Die Abspaltung der Pro-Peptide führt zur Exposition von kurzen nicht-helikalen Peptidsequenzen, den Telozeptiden, die wichtig für die Fibrillogenese sind (Lodish et al., 2000; Alberts et al., 2002; Kadler et al., 2007; Fratzi, 2008; Shoulders and Raines, 2009; Gordon and Hahn, 2010).

Proteindomänen, die die Gly-Xxx-Yyy Peptidsequenz enthalten, werden Kollagendomänen (englisch: *collagenous domain*, COL) genannt, Regionen ohne diese zentrale Peptidsequenz bezeichnet man als nicht-Kollagendomäne (englisch: *non-collagenous domain*, NC). Die Domänen werden vom C-Terminus des Proteins aus nummeriert. Kollagene können sowohl aus unterschiedlichen α -Ketten (heterotrimer), als auch aus drei identischen α -Ketten (homotrimer) bestehen (Kadler et al., 2007).

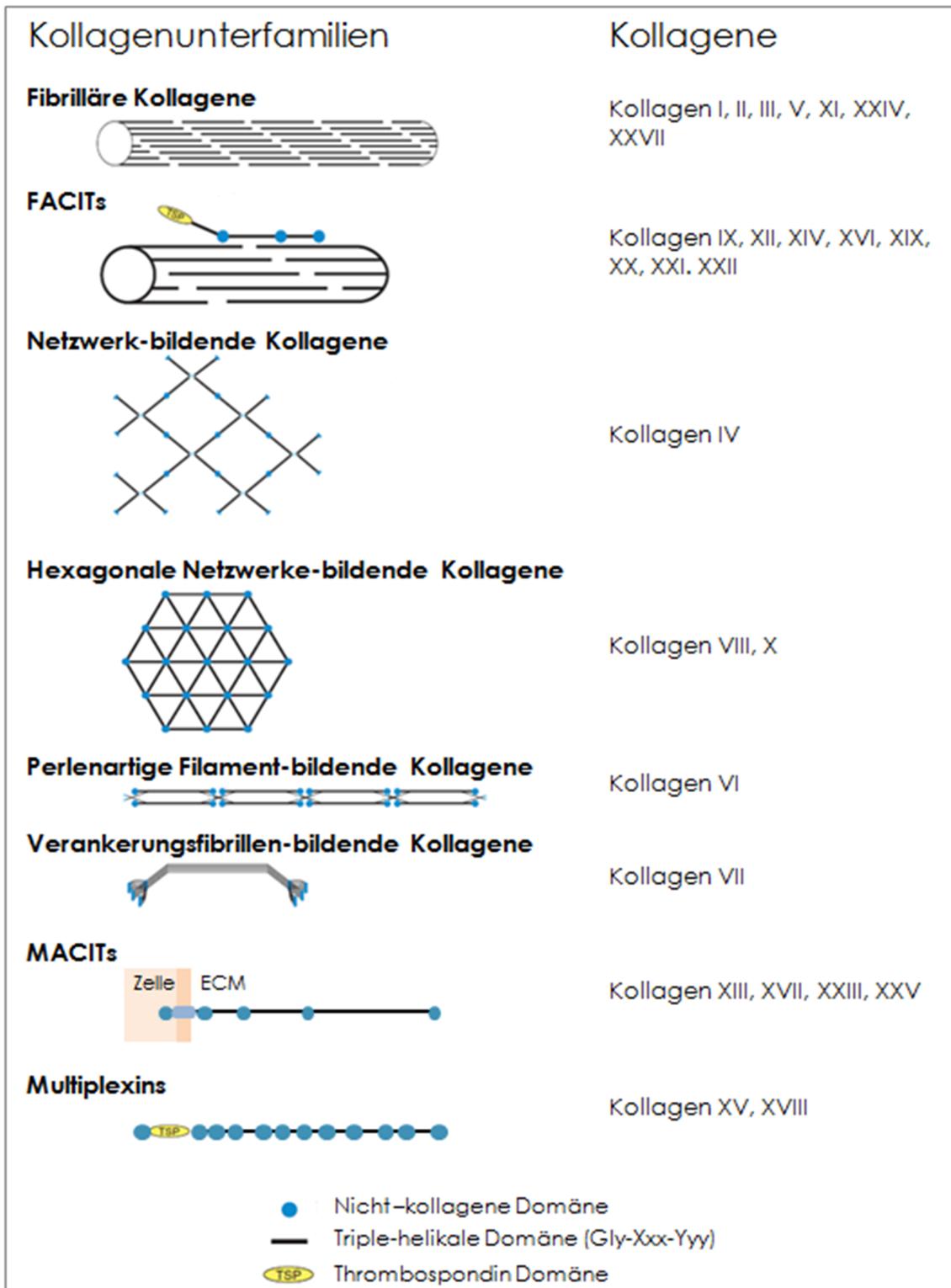


Abb. 2: Einteilung der Kollagene in Unterfamilien aufgrund ihrer supermolekularen Struktur und Lokalisation

Abbildung verändert nach Heino 2011 und Ricard-Blum 2011

Kollagene lassen sich anhand ihrer Lokalisation und supramolekularen Strukturen in verschiedene Unterfamilien einteilen (siehe Abb. 2) (Ricard-Blum et al., 2005; Heino,

2007; Ricard-Blum, 2011b). Die fibrillären Kollagene kommen dabei in Säugetieren am häufigsten vor. Ihnen ist eine große COL1 Domäne gemeinsam, die je von dem N- und C- Propeptid flankiert wird. Diese Propeptide werden nach der Sezernierung proteolytisch vom Prokollagen abgespalten. Das C-Pro-Peptid besteht aus der NC1 Domäne, das N-Pro-Peptid besteht aus der NC2, der COL2 und der globulären NC3 Domäne. Die fibrillären Kollagene unterscheiden sich vor allem durch ihre strukturell unterschiedlichen NC3 Domänen. Die NC3 Domäne enthält entweder eine cysteinreiche Wiederholungsdomäne (englisch: *cystein-rich repeat*, CRR) oder eine Thrombospondin N-terminal ähnliche (englisch: *Thrombospondin N-terminal-like*, TSPN) Domäne (Ricard-Blum et al., 2005). Häufig existieren auch unterschiedliche Splice-Varianten der NC3-Domäne. Die Kollagenfibrillen können aus unterschiedlichen fibrillären Kollagenen bestehen (Ricard-Blum et al., 2005).

Eine weitere Familie der Kollagene bilden die Fibrillen-assoziierten Kollagene mit unterbrochenen Triplehelices (englisch: *fibril-associated collagens with interrupted triple helices*, FACITs). Im Gegensatz zu den fibrillären Kollagenen bilden FACITs keine Fasern aus, sondern sind mit Kollagenfibrillen assoziiert. Dabei wird davon ausgegangen, dass FACIT Kollagene als molekulare Brücken zwischen Kollagenfibrillen und anderen ECM Komponenten fungieren können. Beispielsweise scheinen Kollagen XII und XIV über kleine Proteoglykane, wie Decorin und Fibromodulin mit Kollagenfibrillen zu interagieren und eine Rolle bei der Stabilisierung und Orientierung der Fibrillennetze der ECM zu spielen. Zudem besitzen FACITs meist mehr, aber kürzere COL-Domänen als fibrilläre Kollagene. Die ersten entdeckten FACITs waren das Kollagen IX, XII und XIV. Alle drei können in unmittelbarer Nähe zu Kollagenfibrillen detektiert werden und wurden aus diesem Grund zu der Kollagenfamilie "Fibrillen-assoziierte Kollagene" zusammengefasst.

Heutzutage werden neben diesen ersten Mitgliedern der FACIT Familie auch Kollagen XVI, XIX, XX, XXI, und XXII zu den FACIT Kollagenen gezählt. Sie unterscheiden sich deutlich in ihrer Größe, Anzahl der NC-Domänen und der Zusammensetzung ihrer N-terminalen NC-Domäne. Trotz ihrer großen Diversität in Größe und Struktur, besitzen alle FACITs gemeinsame Struktureigenschaften, aufgrund derer sie zu einer Familie zusammengefasst werden: Alle FACITs besitzen zwei Cysteinreste in der NC1-COL1 Verbindungsregion, die voneinander durch vier Aminosäuren getrennt werden. Des Weiteren besitzen FACITs eine Fehlerstelle der

Gly-Xxx-Yyy Peptidwiederholungssequenz in der COL1 Domäne. Zusätzlich enthält die N-terminale NC-Domäne von FACITs normalerweise eine TSPN Domäne nahe der N-terminalen COL-Domäne. In einigen dieser NC Domänen findet man zudem die von Willebrand-Faktor A-ähnliche (vWA) Domäne (Kollagen XII, XIV und XX) oder eine Fibronectin Typ III Wiederholungsregion (Pan et al. 1992; Ricard-Blum et al. 2005).

Neben den oben genannten Unterfamilien gibt es noch weitere Kollagenfamilien wie membranassoziierte Kollagene mit unterbrochenen Triplehelices (englisch: *membran-associated collagens with interrupted triple helices*, MACITs) und MULTIPLEXINE (englisch: *multiple triple-helix domains and interruptions*) (siehe auch Abb. 2).

I.4.2. Kollagen XVI

Aufbau und Funktion von Kollagen XVI

Kollagen XVI gehört aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften zu der Kollagenunterfamilie der FACITs. Entdeckt wurde die 5,4 kb lange cDNA Sequenz von Kollagen XVI 1992 von Pan et al. und Yamaguchi et al.. Sie besteht aus einer 4809 bp langen kodierenden Sequenz (Pan et al., 1992; Yamaguchi et al., 1992). Das Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 lokalisiert und die native Kollagen XVI α 1-Kette besteht aus 1604 Aminosäuren. Die drei α 1-Ketten mit einem Molekulargewicht von je circa 210 kDa bilden ein Homotrimer. Bis heute sind keine Splice-Varianten, Isoformen oder weitere α -Ketten bekannt. Kollagen XVI besteht aus 10 COL-Domänen und 11 NC-Domänen, wobei die NC1- bis NC10-Domänen, im Gegensatz zur 312 Aminosäuren großen globulären NC11-Domäne, relativ klein sind. Des Weiteren besitzt die NC11-Domäne eine TSPN Domäne und eine Prolin-Arginin-reiche Protein (PARP) Region. Untersuchungen von rekombinantem Kollagen XVI deckten eine verstärkte posttranslationale Prozessierung auf. Beispielsweise kommt es zur N-Glycosylierung an den zwei Konsensussequenzen (Asn-Xxx-Thr/Ser) der NC11-Domäne, eine N-Glycosylierung an der Konsensussequenz der NC1-Domäne ist dagegen nicht zu beobachten. Zudem konnte eine Abspaltung der NC11-Domäne an dem Sequenzmotiv für die Subtilisin-verwandte Proprotein-Convertase (KARRD) zwischen der AS R256 und D257

gezeigt werden (siehe Abb. 3). Rasterkraft-Mikroskopieaufnahmen von rekombinantem Kollagen XVI zeigen einen flexiblen fadenförmigen Schwanz (NC1-bis COL10-Domänen), der mit der N-terminalen globulären NC11-Domäne verbunden ist (Pan et al., 1992; Yamaguchi et al., 1992; Tillet et al., 1995; Grässel et al., 1996; Kassner et al., 2004; Grässel and Bauer, 2013).

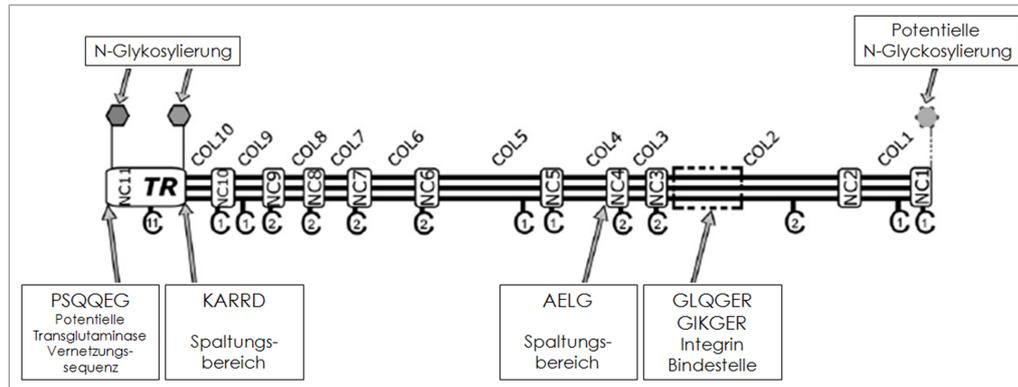


Abb. 3: Schematische Darstellung der molekularen Organisation von Kollagen XVI

Zu sehen sind die 10 COL Domänen (dreifach Linien) und die 11 NC Domänen (weiße Kästen). Die NC11-Domäne enthält zwei N-Glykosylierungsstellen (AS47-48 und AS327-329), die NC1-Domäne eine potentielle N-Glykosylierungsstelle (AS1578-1580). Die Integrinbindestellen sind in der COL2-Domäne lokalisiert. Kollagen XVI besitzt zwei Konsensussequenzen für Proteasen. Die Konsensussequenz für die Subtilisin-verbundene Proprotein-Convertase (KARRD) liegt im C-terminalen Bereich der NC11-Domäne, das Sequenzmotiv für Matrix Metalloproteasen (AELG) liegt im C-terminalen Bereich der COL4-Domäne. Eine potentielle Vernetzungssequenz der Transglutaminase liegt in der N-terminalen Region der NC11-Domäne. Die Cs symbolisieren Cysteinreste, wobei die innen stehende Zahl die Anzahl der vorhandenen Cysteinreste in der Domäne angibt.

Abbildung aus Grässel und Bauer, 2013.

Kollagen XVI ist im menschlichen Organismus weit verbreitet und wird von unterschiedlichen Zellen in verschiedenen Geweben exprimiert. Nicht nur dermale Fibroblasten produzieren Kollagen XVI, auch glatte Muskelzellen (Grässel et al., 1996), dermale Dendrozyten der Haut (Akagi et al., 2002), artikuläre und kostale Chondrozyten (Kassner et al., 2003), endodermale Stromazellen (Tierney et al., 2003), aus dem Knochenmark stammende mesenchymale Stammzellen (Grässel, 2009), Neuronen des dorsalen Wurzelganglions (Hubert et al., 2007), Glioblastom- und Astrozytomzellen (Senner et al., 2008) und dermale und orale Keratinozyten (Grässel and Bauer, 2013).

In gesunder Haut lagert sich Kollagen XVI an strukturell und funktional unterschiedlichen Matrixaggregaten an. Es ist epithelial in der dermal-epidermalen Übergangszone oder in unmittelbarer Nähe der Basalmembran von Blutgefäßen

lokalisiert (Kassner et al., 2003). Seine Lokalisation lässt vermuten, dass Kollagen XVI eine aktive Rolle bei der Verankerung von Mikrofibrillen an die Basalmembran einnimmt (Grässel et al., 1999). Zudem ist Kollagen XVI eine Komponente des mikrofibrillären Apparats der Haut. Dort kolokalisiert es mit Fibrillin-1, einem Hauptbestandteil der elastischen Fasern (Grässel et al., 1999; Kassner et al., 2003). Weitere Versuche von Kassner et al. mit einer rekombinanten Fibronektin-Isoform, die spezifisch während der Embryogenese und Organogenese exprimiert wird, und Kollagen XVI konnten *in vitro* eine Interaktion beider Proteine belegen (Kassner et al., 2004). Dies konnte jedoch nicht in adultem Hautgewebe gezeigt werden (Grässel et al., 1999). Diese Befunde deuten auf einen möglichen Einfluss der Kollagen XVI/Fibronektin Interaktion während der humanen Entwicklung hin (Kassner et al., 2004).

An der dermal-epidermalen Übergangszone kann eine Kolokalisierung von Kollagen XVI mit $\alpha 2$ Integrin beobachtet werden; um Fettzellen der subdermalen Schichten kolokalisiert Kollagen XVI dagegen mit $\alpha 1$ Integrin (für weitere Informationen zu Integrinen siehe Kapitel I.6). Zudem können Zellen, die $\alpha 1\beta 1$ oder $\alpha 2\beta 1$ Integrin auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, an rekombinantes Kollagen XVI binden und sich darauf ausbreiten. Dabei zeigen zellfreie Bindungsassays, dass Kollagen XVI wesentlich effektiver an $\alpha 1\beta 1$ Integrine als an $\alpha 2\beta 1$ Integrine bindet. Kollagen XVI enthält in seiner COL2 Domäne zwei Integrinbindestellen (siehe Abb. 3) und interagiert mit der A-Domäne der α Untereinheit der Integrine. Kollagen XVI induziert dabei die Rekrutierung dieser Integrine zu fokalen Adhäsionsplaques, einen grundlegenden Schritt in der Integrin-Signalweiterleitung. Folglich verankert Kollagen XVI möglicherweise nicht nur Zellen mit spezialisierten Fibrillen, sondern ermöglicht auch eine Signaltransduktion aus der ECM in die Zellen (Eble et al., 2006).

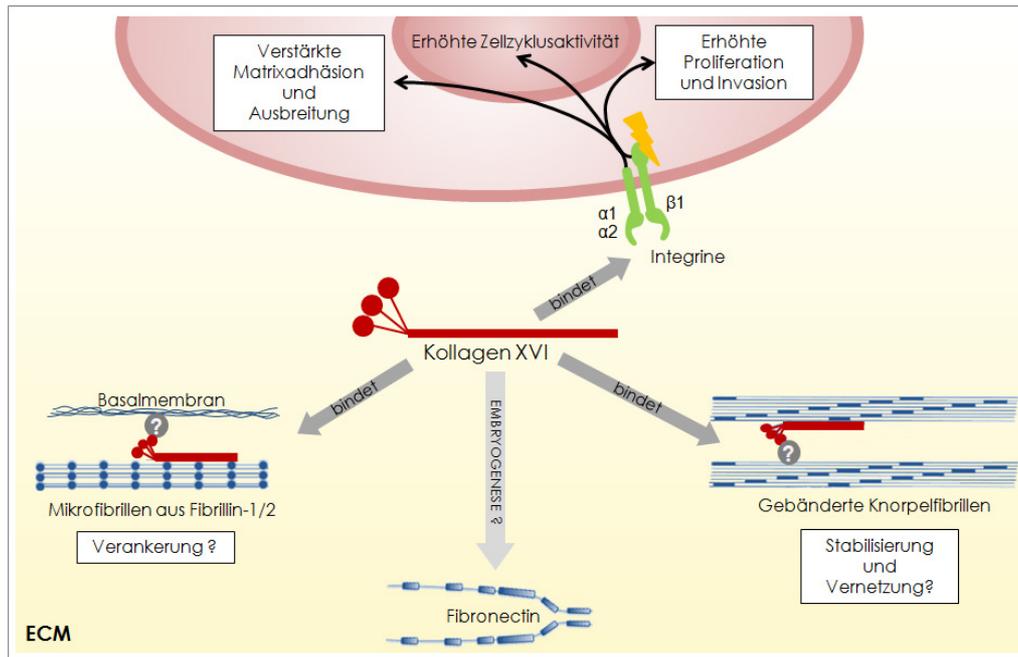


Abb. 4: Die verschiedenen Interaktionspartner von Kollagen XVI und seine Funktionen
 Kollagen XVI ist ein physiologischer Agonist für $\alpha1\beta1$ und $\alpha2\beta1$ Integrine und dient dabei als Substrat zur Zelladhäsion und vermittelt Signaltransduktion in die Zelle. Zusätzlich bindet Kollagen XVI an Mikrofibrillen aus Fibrillin-1 und -2 und ist vermutlich bei der Verankerung dieser Mikrofibrillen an die Basalmembran beteiligt. Kollagen XVI bindet zusätzlich an Embryogenese-spezifisches Fibronectin. Des Weiteren kann eine Kolo-kalisation von Kollagen XVI mit gebänderten Knorpelfibrillen beobachtet werden, was vermutlich zur Vernetzung und Stabilisierung dieser Fibrillen führt.

Abbildung nach Grässel und Bauer, 2012.

Kollagen XVI und Karzinogenese

Während der Tumorgenese von Glioblastomen und OSCCs kann eine hohe Überexpression von Kollagen XVI in distinkten Stadien beobachtet werden (Senner et al., 2008; Bauer et al., 2011; Ratzinger et al., 2011a). Im OSCC kommt es während der Progression in hyperplastischen und dysplastischen Bereichen des Tumorgewebes zur Kollagen XVI Überexpression, während das Protein in Gewebeproben gesunder oraler Mukosa nur nahe der Basalmembran detektierbar ist. Für eine Kollagen XVI überexprimierende OSCC Zelllinie (PCI13) konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Kollagen XVI Expression zur Hochregulierung des Integrin-assoziierten Proteins Kindlin-1 führt und eine verstärkte Interaktion zwischen $\beta1$ Integrin und Kindlin-1 zur Folge hat (Ratzinger et al., 2011). Vermutlich erklärt diese Interaktion die Aktivierung von $\beta1$ Integrin in diesen Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen. Des Weiteren bedingt die Kollagen XVI Überexpression in den OSCC Zellen einen $\beta1$ Integrin vermittelten, früheren Eintritt in die S-Phase. Eine Blockierung der $\beta1$ Integrine mit einem spezifischen Antikörper neutralisiert diesen Effekt (Ratzinger et al., 2011).

Der *Knockdown* von Kollagen XVI mit siRNA in der humanen Glioblastomzelllinie U877MG führt zur signifikanten Reduktion von fokalen Adhäsionskontakten im Vergleich zu Kontrollzellen. Zudem kann nach diesem Kollagen XVI *Knockdown* eine Herunterregulierung der Kindlin-1 Expression zusammen mit einer Abnahme an aktiviertem β 1 Integrin beobachtet werden. Auch weisen diese Zellen ein niedrigeres Invasionspotential auf. Interessanterweise sinkt in den Glioblastomzellen nach Kollagen XVI *Knockdown* auch die Kindlin-2 Expression, während die Protocadherin-18 Expression ansteigt (Bauer et al., 2011).

Zusätzlich kann in zwei Mausmodellen des hepatozellulären Karzinoms (englisch: *hepatocellular carcinoma*, HCC), den PDGFC (englisch: *platelet-derived growth factor C*) und Pten (englisch: *Phosphatase and Tensin homolog*) Mäusen, eine erhöhte Kollagen XVI Expression während der Tumorprogression beobachtet werden (Lai et al., 2011). In HCC Zellen konnte zudem durch die generelle Inhibition der BMPs (englisch: *bone morphogenic protein*, BMP) gezeigt werden, dass Kollagen XVI ein Zielgen von BMPs ist. BMPs sind für die Smad-Signalgebung spezifisch (Maegdefrau and Bosserhoff, 2012). Der Smad-Signalweg ist wiederum wichtig bei der TGF- β (englisch: *transforming growth factor β*) Signalgebung und somit an der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Grady, 2005).

I.5. Matrikine und Matrikryptine

I.5.1. Aufbau und Funktion

Wie bereits erwähnt, unterliegt die ECM einem ständigen, streng regulierten Umbau. Dabei kommt es unter anderem zur kontrollierten Proteolyse von Makromolekülen der ECM. Dieser Vorgang setzt bioaktive Fragmente frei oder demaskiert kryptische Proteindomänen. Die spezifischen, bioaktiven Eigenschaften dieser Fragmente unterscheiden sich von den Eigenschaften ihrer korrespondierenden Vollängemolekülen. Sie werden entweder als Matrikine oder Matrikryptine bezeichnet (Ricard-Blum, 2011a; Ricard-Blum and Salza, 2014). Die Unterscheidung zwischen Matrikinen und Matrikryptinen gestaltet sich schwierig, da es in der Fachliteratur unterschiedlichste Definitionen beider gibt. Marquart et al. 1999 definiert Matrikine als „aus der ECM hervorgegangene Peptide, die die Fähigkeit

besitzen die Zellaktivität zu regulieren“ (Maquart et al., 1999; Ricard-Blum and Salza, 2014). Davis et al. verwendete 2000 zum ersten Mal den Begriff „Matrikryptin“ und bezeichnete damit „enzymatische Fragmente der ECM, die exponierte, kryptische Stellen enthalten“ (Davis et al., 2000). Laut Tran et al. handelt es sich bei den „natürlichen“ Matrikinen um Liganden, die eine Domäne innerhalb eines ECM-Proteins darstellen, nicht aus dem Markomolekül abgespalten sind und deren Rezeptoren entweder zur Familie der Zytokin-, Chemokin-, Ionenkanal- oder der Wachstumsfaktorrezeptoren gehören. „Kryptische“ Matrikine oder Matrikryptine bezeichnet Tran et al. dagegen als Liganden, die in den nativen, sezernierten ECM-Makromolekülen nicht biologisch aktiv sind und erst nach strukturellen Änderungen und kontrollierter enzymatischer Abspaltung ihre funktionellen Eigenschaften offen legen (Tran et al., 2005).

Die Mehrzahl bekannter Matrikryptine oder bioaktiver Peptide stammen aus Kollagenen, Proteoglykanen, Elastin und Lamininen. Manche ECM Proteine können in mehrere Fragmente mit ähnlichen bioaktiven Eigenschaften gespalten werden, wie z. B. die Kollagen IV Fragmente Arresten, Tumstatin und Canstatin. Es kommt allerdings auch vor, dass unterschiedliche Fragmente des selben ECM Makromoleküls gegensätzliche Aktivitäten besitzen, wie z. B. die Fragmente des sezernierten, sauren und Cystein-reichen Proteins (englisch: *secreted protein acidic and rich in cysteine*, SPARC). Matrikryptine und Matrikine sind häufig Monomere, allerdings existieren auch Zink-abhängige Dimere von Endostatin (ein Fragment von Kollagen XVIII). Matrikryptine und Matrikine entstehen unter anderem durch enzymatischen Abbau, mechanische Belastungen und Denaturierung von ECM-Makromolekülen. Die Abspaltung der bioaktiven Fragmente aus den Volllängeproteinen wird durch eine Vielzahl an Enzymen katalysiert, wie z. B. Cathepsine und MMPs. Des Weiteren werden die Ektodomänen von MACITs von ADAMs (englisch: *A Disintegrin and Metalloproteinase*) oder Proprotein-Konvertasen der Furin-Familie abgespalten, während Fibrostatin aus Fibronectin möglicherweise durch Dispase freigesetzt wird. Zudem wird das Matrikryptin Endorepellin (ein Fragment des Proteoglykan Perlecan) vermutlich durch Metalloproteasen der BMP-1/*Tolloid* Familie weiter prozessiert, wobei ein weiteres Matrikryptin, die LG3-Domäne, entsteht. Außerdem gibt es Hinweise, dass mechanische Kräfte die Freisetzung und Abspaltung von bioaktiven Fragmenten modulieren können (Davis

et al., 2000; Bellon et al., 2004; Maquart et al., 2005; Tran et al., 2005; Davis, 2010; Ricard-Blum, 2011a; Ricard-Blum and Salza, 2014).

In vivo werden Matrikryptine in Körperflüssigkeiten und Geweben freigesetzt. Dabei könnten endogene ECM Fragmente, die in den Blutstrom freigesetzt werden als Hormon-ähnliche Proteine angesehen werden. Matrikryptine und Matrikine nehmen eine Schlüsselrolle in der Kontrolle einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen ein. So beeinflussen sie Entzündungen (Adair-Kirk and Senior, 2008), Autoimmunerkrankungen (Jha et al., 2009), Wundheilung (Davis, 2010), Knorpelkalzifizierung, Angiogenese (Endostatin, Canstatin, Tumstatin, Vastatin) (Nyberg et al., 2005) und Tumorwachstum (Hornebeck et al., 2003) (siehe auch Tabelle 1). Auf zellulärer Ebene nehmen ECM Fragmente Einfluss auf Zelladhäsion, Proliferation, Migration und Apoptose. Zudem sind einige Matrikine und Matrikryptine für Fibroblasten, Endothelzellen und Monozyten chemotaktisch aktiv (Heinz et al., 2010). Dabei interagieren sie mit Integrinen, Heparansulfat-Proteoglykanen und Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Zelloberfläche und regulieren darüber Signalwege und Genexpression. Matrikine und Matrikryptine besitzen zudem meist eine niedrigere Affinität zu ihren Rezeptoren als die Volllängepeptide. Zusätzlich können sie auch an viele unterschiedliche Rezeptoren binden, die keine Interaktionspartner ihrer Volllängepeptide sind. Beispielsweise kann Endostatin unter anderem an VEGFR-2 (englisch: *vascular endothelial growth factor receptor 2*) binden (Davis et al., 2000; Bellon et al., 2004; Maquart et al., 2005; Tran et al., 2005; Davis, 2010; Ricard-Blum, 2011a; Ricard-Blum and Salza, 2014).

Tabelle 1 Matrikine und Matrikryptine, die aus Kollagenen hervor gehen (Molekulare Masse nach Ricard-Blum 2014)

Ursprungprotein	Matrikryptin/ Matrikin	Eigenschaften	Molekulare Masse (kDa)	Referenz
Kollagen IV $\alpha 1$ Kette	Arresten	Angiogeneseinhibitor Inhibierung der Invasion von SCC	26	(Aikio et al., 2012)
Kollagen IV $\alpha 2$ Kette	Canstatin	Angiogeneseinhibitor Tumorsuppressor Inhibiert Proliferation und Migration von Endothelzellen Induziert Apoptose von Endothelzellen	24	(Su and Zhu, 2004)
Kollagen IV $\alpha 3$ Kette	Tumstatin	Angiogeneseinhibitor Tumorsuppressor	27	(Hamano and Kalluri, 2005)
Kollagen IV $\alpha 4$ Kette	Tetrastatin	Tumorsuppressor	25	(Brassart-Pasco

Ursprungprotein	Matrikryptin/ Matrikin	Eigenschaften	Molekulare Masse (kDa)	Referenz
				et al., 2012)
Kollagen IV α 5 Kette	Pentastatin 1 Pentastatin 2 Pentastatin 3	Tumorsuppressor	2,1 -2,5	(Koskimaki et al., 2010)
	Lamstatin	Inhibiert Lymphangiogenese Proliferations- und Migrations- inhibitor <i>in vitro</i>	25	(Weckmann et al., 2012)
Kollagen IV α 6 Kette	Hexastatin 1 Hexastatin 2	Angiogeneseinhibitor Tumorsuppressor	2 2,5	(Mundel TM, n.d.; Gunda et al., 2013)
	NC1 Domäne	Angiogeneseinhibitor Tumorsuppressor	25	
Kollagen VI α 3 Kette	Endotrophin	Fördert Tumorentstehung und -wachstum in Fettgewebe	5,8	(Park and Scherer, 2012)
Kollagen XIII α 1 Kette	Ektodomäne	anti-adhäsive, anti- migratorische, anti-proliferative Eigenschaften	240	(Väisänen, 2005)
Kollagen XV α 1 Kette	Restin 1 Restin 2 Restin 3 Restin 4	Angiogeneseinhibitor Tumorsuppressor	18,4 - 21	(Ramchandran et al., 1999)
	Ektodomäne	Nimmt Einfluss auf Zellablösung, Differenzierung und Motilität	120	
	Endostatin	Angiogeneseinhibitor Tumorsuppressor	21	
	Neostatin 7	Angiogeneseinhibitor Inhibiert Lymphangiogenese	28	
Kollagen XVIII α 1 Kette	Neostatin 14	-	23	
	NC1 Domäne	Tumorsuppressor	2,2	(Ramont et al., 2007)
Kollagen XXIII α 1 Kette	Ektodomäne	-	180	(Veit et al., 2007)
Kollagen XXV α 1 Kette	Ektodomäne/ CLAC	-	158	(Hashimoto et al., 2002)

I.5.2. Die Rolle von Matrikryptinen und Matrikinen bei der Entstehung von Krebs

Eine Vielzahl an Matrikryptinen und Matrikinen beeinflussen Wachstum und invasive Eigenschaften von Tumoren. So inhibieren viele aus Kollagen IV hervorgehende Matrikryptine (siehe Tabelle 1) das Tumorstadium. Tumostatin mindert z. B. die Proliferation, Invasion und Migration von Melanomzellen indem es die Produktion und Aktivierung von MMPs inhibiert. Auch die NC1 Domäne der α 6 Kette von Kollagen IV hemmt das Tumorstadium von subkutan transplantierten Lewis-Lungenkarzinomen sowie die Entstehung von spontanen Insulinomen in RIP1Tag2

(englisch: rat insulin promoter, RIP; T Antigen transgen, Tag) Mäusen (Mundel et al., 2008). Während das Wachstum von Tumoren des Pankreas' und von M21 Melanomen durch Canstatin vermindert wird, inhibiert Pentastatin das Tumorstadium von Xenografttransplantaten von Brust- und kleinen Lungentumoren (He et al., 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Endostatin die Proliferationsrate einiger Tumorzelllinien (z. B. HT29 und C51) reduziert (Dkhissi et al., 2003). Endostatin wirkt sich auch negativ auf die Migration und Invasion von Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinomen aus, indem es die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 induziert. Zudem inhibiert es die Invasion und Intravasation (Invasion von Krebszellen durch die Basalmembran in Blutgefäße und Lymphgefäße) von Zungenkarzinomzellen (Reymond et al., 2013). Endorepellin greift die Gefäßbildung von Tumoren an indem es deren Angiogenese und Metabolismus inhibiert. Während man von den meisten Matrikryptinen eine anti-tumorigene Wirkung kennt, gibt es auch welche, die eine Tumorstadium begünstigen. Beispielsweise können Laminin-Peptide, wie das A-13 der N-terminalen, globulären Domäne der α 1 Kette des Laminins-1, eine verstärkte pulmonale Invasion und Metastasierung von B16-F10 Melanomen fördern. (Tran et al., 2005; Ricard-Blum, 2011a)

1.6. Integrine

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren und leiten Signale bidirektional durch die Plasmamembran. Über die Bindung von Liganden ermöglichen sie dabei die Informationsübertragung zwischen ECM und zytoskelettalen, signalgebenden Effektoren. Die physikalischen und chemischen Signale, die von Integrinen kontrolliert werden, sind essentiell für interzelluläre Kommunikation und haben einen Einfluss auf Entwicklung, Gewebeorganisation und pathologische Prozesse. Alle Integrine sind nicht-kovalent gebundene heterodimere Moleküle bestehend aus einer α und einer β Untereinheit. Sowohl die α als auch die β Untereinheiten besitzen eine einzelne Membran-durchspannende Helix, eine große extrazelluläre Domäne und meistens eine relativ kurze zytoplasmatische Domäne. Bis heute sind in Säugetieren 18 verschiedene α und 8 verschiedene β Untereinheiten bekannt, allerdings wurden nur 24 unterschiedliche $\alpha\beta$ -Kombinationen auf Proteinebene identifiziert. Jedes Integrin weist eine ihm eigene Ligandenspezifität und Gewebeverteilung auf.

(Humphries et al., 2006; Askari et al., 2009; Harburger and Calderwood, 2009; Barczyk et al., 2010; Campbell and Humphries, 2011; Calderwood et al., 2013).

Die Ligandenspezifität der Integrine wird von ihrer α Untereinheit bestimmt. Sie besteht aus einem sieben-blättrigen β Propeller, der gemeinsam mit der Thigh-, Calf1- und Calf2-Domäne die Integrinkopf-unterstützende Beinstruktur bildet. Die letzten drei oder vier β Faltblätter des β Propellers enthalten Ca^{2+} -bindende Domänen, welche die Ligandenbindung beeinflussen. Neun der 18 α Untereinheit besitzen zudem eine ungefähr 200 Aminosäuren lange α I-Domäne zwischen dem zweiten und dritten β Faltblatt des β Propellers. Diese α I-Domäne bindet Liganden über ein Mg^{2+} -Ion an der Metallion-abhängigen Adhäsionsstelle (englisch: *metal-ion-dependent adhesion site*, MIDAS)(Barczyk et al., 2010; Campbell and Humphries, 2011; Calderwood et al., 2013).

Die β -Untereinheit enthält eine Plexin-Semaphorin-Integrin (PSI) Domäne, eine Hybrid-Domäne, eine β I-Domäne und vier Cystein-reiche Wiederholungen der epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne (englisch: *epidermal growth factor-like domains*, *EGF-like domains*). Auch die β I-Domäne verfügt über eine MIDAS-Region, an die ein Mg^{2+} -Ion binden kann. Bei Integrinen, die eine α -Untereinheit ohne α I-Domäne besitzen, ist diese MIDAS-Region an der Ligandenbindung beteiligt. Zudem befindet sich angrenzend zur MIDAS-Region eine weitere Metallion bindende Stelle. Abhängig vom gebundenen Ion besitzt diese Region einen inhibitorischen (Bindung von Ca^{2+}) oder aktivierenden (Bindung von Mg^{2+}) Effekt. Die zyttoplasmatische Domäne enthält das Bindungsmotiv NPX/Y, womit Proteine mit PTB-Domäne interagieren können (Barczyk et al., 2010; Campbell and Humphries, 2011; Calderwood et al., 2013).

Integrine können in einer abgewinkelten oder gestreckten Konformation vorkommen. Die abgewinkelte Form repräsentiert dabei die inaktive Form, die gestreckte die aktive. Elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten zudem Integrine in verschieden abgewinkelten Stadien zeigen, die eine fließende „Atem“-Bewegung vermuten lassen. Integrine scheinen sich also ständig zu bewegen, wobei sich ihre Konformation fortlaufend von der aktiven, gestreckten zur abgewinkelten, inaktiven Form und wieder zurück verändert (Askari et al., 2009). Zudem scheinen mechanische Zugkräfte zwischen ECM und zytoskeletalen Strukturen Integrine, die als Bindeglied zwischen diesen Strukturen dienen, zu strecken. Dadurch wird ihre

aktive Konformation stabilisiert und ihre Ligandenaffinität gesteigert. Allerdings scheint die abgewinkelte Konformation der Integrine nicht immer deren inaktive Form zu repräsentieren, besonders wenn kleine Liganden im Spiel sind (Askari et al., 2009; Barczyk et al., 2010).

Die Liste der bekannten Integrin-Liganden ist lang und beinhaltet Hauptbestandteile der ECM wie z.B. Kollagene aber auch Zelloberflächenrezeptoren wie E-Cadherin. Dabei werden verschiedene Erkennungssequenzen der Integrine erkannt. Als Prototyp eines Integrin-Liganden kann Fibronectin angesehen werden. Es enthält eine RGD-Peptid-sequenz. Diese Sequenz findet man z. B. auch in Vitronectin und Fibrinogen. Die Kollagen-bindenden Integrine erkennen dagegen die triple-helikale GFOGER Sequenz, oder Varianten dieser Peptidsequenz. Interessanterweise ist das im Knorpel vorkommende Kollagen IX ein guter Ligand für alle Kollagen-bindende Integrine, obwohl es keine prototypische Kollagen GFOGER-Erkennungssequenz besitzt. Ein weiteres Integrin-Bindungsmotiv ist die LDV-Erkennungssequenz, die in Varianten auch in den Adhäsionsmolekülen der ICAMs (*englisch: intercellular adhesion molecule*) und MadCAM (*englisch: mucosal vascular addressin cell adhesion molecule*) vorhanden ist. Neben den „klassischen“ Liganden gibt es auch durch Proteolyse von ECM Makromolekülen entstehende Liganden, wie z. B. Endostatin, Endorepellin und Tumstatin. Auch können Integrine an bestimmte Viren und Bakterien binden. (Humphries et al., 2006; Barczyk et al., 2010).

Nachdem Integrine keine enzymatische Aktivität besitzen, findet die Signalweiterleitung durch die Gruppierung von Signalproteinkomplexen an der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors statt. Die Bildung dieser Komplexe kann einerseits über Anhäufung von Integrinen zu *Integrinclustern* und andererseits über Konformationsänderungen des Rezeptors erreicht werden. Durch die Konformationsänderungen werden Bindestellen der Signalproteinkomplexe maskiert, wodurch diese Komplexe nicht mehr an die Integrine binden können und somit keine Signale mehr weitergeleitet werden (Barczyk et al., 2010; Campbell and Humphries, 2011).

Für eine korrekte bidirektionale Signalweiterleitung muss die Lokalisation spezifischer Proteine räumlich und zeitlich exakt koordiniert werden. Die Bindung von Liganden an Integrine, aber auch die Bildung von *Integrinclustern*, bewirken die Rekrutierung Aktin-bindender Proteine sowie weiterer Zytoskelett- und

Signalproteine. Dadurch kommt es zur Übertragung von mechanischen und chemischen Signalen in die Zelle. Eine wichtige Rolle bei der intrazellulär vermittelten Aktivierung von Integrinen spielen die Proteine Talin und Kindlin, die beide eine FERM-Domäne enthalten. Dabei binden sie an die zytoplasmatische Domäne der β -Untereinheit von Integrinen und bewirken dadurch eine erhöhte Ligandenaffinität der Integrine. Talin interagiert auch mit Aktin und zahlreichen anderen Zytoskelett- und Signalproteinen und verbindet aktivierte Integrine direkt mit dem intrazellulären Signalsystem und dem Zytoskelett. Die Integrinaktivierung mittels Talin und Kindlin ermöglicht die Bindung spezifischer Liganden, was eine Talin vermittelte Verbindung des Zytoskeletts mit der ECM zur Folge hat. Über diese Verbindung kommt es zur mechanischen Kraftübertragung zwischen der ECM und dem Zytoskelett, was die Rekrutierung weiterer Zytoskelett- und Signalproteine zur Folge hat. Diese Multiproteinkomplexe verbinden Integrine zum einen noch stärker mit dem Aktin-Zytoskelett, zum anderen übertragen sie Signale in die Zelle. Eines der ersten bekannten, daran beteiligten Signalmoleküle war die Fokale Adhäsionskinase (FAK). FAK ist sowohl eine mittels Phosphorylierung regulierte Signalkinase, als auch ein Adapter- und Gerüstprotein. Sie spielt eine wichtige Rolle bei Bildung und Umbildung von Adhäsionskontakten, bei der Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie, bei Zellmigration und der Wechselwirkung zwischen Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Mitra et al., 2005; Critchley and Gingras, 2008; Harburger and Calderwood, 2009; Barczyk et al., 2010; Wang, 2012; Calderwood et al., 2013).

Ein weiteres Schlüsselprotein in der Integrin-vermittelten Signalweitergabe ist die *integrin-linked kinase* (ILK). Die ILK bildet gemeinsam mit dem „*LIM-domain*“ Protein PINCH und dem Actin- und Paxillin-bindenden Parvin einen heterotrimeren Komplex. Entdeckt wurde ILK 1996 von Hannigan et al. in einem Screening nach Proteinen, die an die zytoplasmatische Domäne von β 1 Integrin binden können. Untersuchungen zeigen, dass die ILK auch mit der zytoplasmatischen Domäne von β 3 Integrin interagiert. Immunpräzipitationsexperimente legen zudem eine direkte Bindung der ILK an Akt/PKB (Akt/Proteinkinase B) offen (Hannigan et al., 1996; Persad et al., 2001; Mitra et al., 2005; Harburger and Calderwood, 2009).

I.6.1. Der ILK/Akt Signalweg

Integrin-vermittelte Zelladhäsion stimuliert unter anderem die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K). Diese phosphoryliert Phosphatidylinositol-(4,5)-Diphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat (PIP3), welches wiederum an die *Pleckstrin homology-like domain* von ILK bindet und dabei die Aktivierung von ILK bewirkt (Hannigan et al., 2005). ILK interagiert neben vielen anderen Proteinen mit Akt/PKB. Die durch PIP3 aktivierte PI3K-abhängige Kinase 1 (englisch: *PI3K-dependent kinase1*, PDK1) phosphoryliert das Threonin der Akt/PKB an Position 308. Zur vollständigen Aktivierung benötigt Akt/PKB eine weitere Phosphorylierung des Serinrestes an Position 473 durch PDK2. Persad et al. konnten zeigen, dass die ILK die Fähigkeit besitzt Akt/PKB an dieser Serinposition zu phosphorylieren und postulieren daher eine PDK2 Kinaseaktivität der ILK (Persad et al., 2001; Hannigan et al., 2005). Aktivierte Akt/PKB phosphoryliert eine Vielzahl an Proteinsubstraten, die bei der Regulierung der Zellproliferation, der Zellvitalität, des Zellwachstums, der Angiogenese und dem Zellmetabolismus beteiligt sind. Eines dieser Substrate ist die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β), die durch die Phosphorylierung durch Akt/PKB inhibiert wird. GSK3 β ist ein direkter Regulator des Aktivatorproteins 1 (AP-1). Dieser heterodimere Transkriptionsfaktor besteht aus einem Mitglied der Jun-Proteinfamilie und einem Mitglied der Fos-Proteinfamilie. AP-1 bindet an die TRE-Nukleotidsequenz 5'-TGAGTCT-3' der DNA und ist an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, wie z. B. Wachstum, Überleben und Tumorgenese. Die durch aktive GSK3 β induzierte Phosphorylierung von c-Jun inhibiert die Bindung von AP-1 an seine Konsensussequenz. Aktives GSK3 β inhibiert folglich die AP-1 Aktivität. Zusammenfassend kommt es durch die Aktivierung der ILK und der daraus resultierten Inaktivierung von GSK3 β schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (siehe Abb. 5). Neben der indirekten Akt/PKB-vermittelten Phosphorylierung von GSK3 β interagiert ILK auch direkt mit GSK3 β und besitzt die Fähigkeit sie zu phosphorylieren (Persad et al., 2001; Wu and Dedhar, 2001; Eferl and Wagner, 2003; Hannigan et al., 2005; Legate et al., 2005; Tabe et al., 2007).

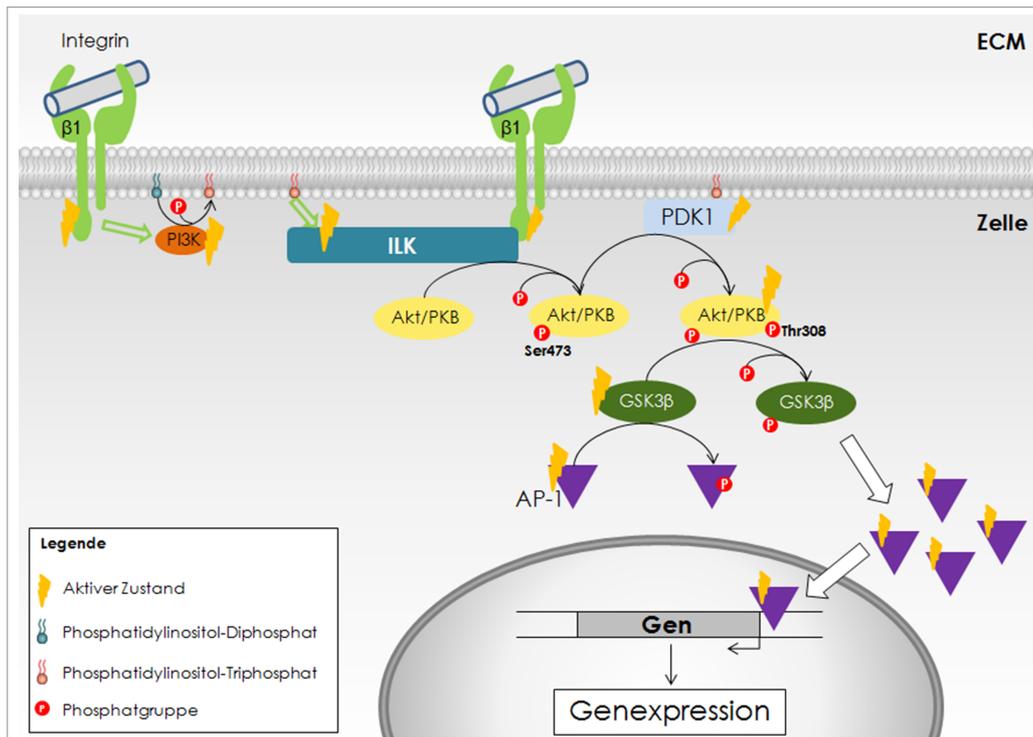


Abb. 5: Der ILK/Akt Signalweg

Durch Integrin-vermittelte Zelladhäsion kommt es zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Die aktivierte PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-Diphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-Triphosphat (PIP3), das an ILK bindet und zu ihrer Aktivierung führt. Zudem aktiviert PIP3 die PI3K-abhängige Kinase 1 (PDK1). Die aktive ILK interagiert mit Akt/PKB, agiert als PDK2 und phosphoryliert Akt/PKB an dem Serinrest 473. Die PDK1 phosphoryliert Akt/PKB an ihrem Threoninrest an Position 308. Die doppel-phosphorylierte Akt/PKB ist nun aktiv und besitzt damit die Fähigkeit die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) durch Phosphorylierung zu hemmen. Die Inhibition von GSK3 β bewirkt eine verminderte Phosphorylierung-vermittelte Hemmung des Transkriptionsfaktors AP-1. Aktives AP-1 transloziert in den Zellkern, bindet an seine Konsensussequenz (TRE-Sequenz: 5'-TGAGTCT-3') im Promotorbereich seiner Zielgene und es kommt zur verstärkten Genexpression.

Abbildung vom Verfasser dieser Arbeit erstellt

I.7. Angiogenese und vaskulogene Mimikry

Mit Hilfe des kardiovaskulären Systems werden alle Organe und Gewebe mit Nährstoffen, Sauerstoff, Blut und Immunzellen versorgt. Zusätzlich übernimmt es die Aufnahme und den Abtransport von Abfallmetaboliten aus den Organen und Geweben. Das vaskuläre System entwickelt sich aus zwei streng geregelten Prozessen: der Vaskulogenese und der Angiogenese. (Chung et al., 2010). Als Vaskulogenese bezeichnet man die Neubildung eines primären vaskulären Netzwerkes durch die Differenzierung von Vorläuferzellen (Angioblasten und Hämangioblasten) zu Endothelzellen und deren Organisation in ein primitives Netzwerk (Hendrix et al., 2003). Unter Angiogenese versteht man die Ausbildung von Kapillaren aus schon existierenden Blutgefäßen. Dabei kommt es zur Aussprossung

des kapillaren Plexus, zu mikrovaskulärem Wachstum und zur Fusion mit ausgereiften, funktionellen Gefäßbetten. Zudem versteht man unter Angiogenese das Eindringen von Blutgefäßen in avaskuläre Regionen des Gewebes. Dieser Prozess ist auf eine korrekte Interaktion zwischen Endothelzellen, welche die innere Schicht der Blutgefäße bilden, Perizyten und Stromazellen, wie Fibroblasten, angewiesen. Des Weiteren hängt er von der Assoziation der beteiligten Zellen mit der ECM und der vaskulären Basalmembran ab. In adulten Geweben hält die Angiogenese während der Wundheilung, während Entzündungsreaktionen und des endometrialen Wachstums im menstrualen Zyklus die Homöostase und die Gewebeintegrität aufrecht (Chung et al., 2010).

Auch Tumore benötigen sowohl für ihr Wachstum als auch zur Dissemination von Metastasen eine Blutversorgung. Neben der Versorgung mit Blut über Blutgefäße, die durch Angiogenese entstanden sind, findet man in verschiedenen Tumoren auch Zellen, die Endothelzellen imitieren und vaskuläre Kanäle bilden. Dieser Vorgang wird als vaskulogene Mimikry bezeichnet und ermöglicht eine Angiogenese-unabhängige Durchblutung von Tumoren (Folberg et al., 2000; Hendrix et al., 2003; Folberg and Maniotis, 2004; Chung et al., 2010; Paulis et al., 2010). Vaskulogene Mimikry wurde erstmals 1999 von Maniotis et al. vorgestellt und bezeichnete zunächst die Fähigkeit aggressiver Melanomzellen Endothelzellen-assoziierte Gene zu exprimieren und ECM-reiche Vaskulogenese-ähnliche Netzwerke in 3D-Zellkultur zu bilden (Maniotis et al., 1999). Heutzutage schreibt man vaskulogener Mimikry nicht nur aggressiven Melanomzellen zu, sondern auch anderen aggressiven Krebsarten, wie Karzinomen, Sarkomen, Glioblastomen und Astrocytomen. Aufgrund ihrer hohen Plastizität besitzen aggressive Tumorzellen die Fähigkeit zur vaskulogenen Mimikry. Darunter versteht man die *de novo* Bildung eines vaskulären Netzwerkes, das die Durchblutung des Tumorgewebes ermöglicht, den Transport von Flüssigkeiten aus undichten Gefäßen erlaubt oder/und die Verbindung des Tumors mit dem endothelial ausgekleideten vaskulären System bewerkstelligt (Hendrix et al., 2003; Seftor et al., 2012). In Krebspatienten ist die vaskulogene Mimikry mit einer schlechten Prognose assoziiert (Hendrix et al., 2003; Seftor et al., 2012; Cao et al., 2013).

Während der vaskulogenen Mimikry kommt es zur Dysregulation von tumorspezifischen Phänotypen und zur Transdifferenzierung von aggressiven

Tumorzellen in andere Zelltypen wie z. B. in Endothelzellen. Beispielsweise exprimieren aggressive, zur vaskulogenen Mimikry befähigte Melanomzellen verstärkt das Angiogenese-Vaskulogenese-spezifische Protein VEGFR1 (englisch: *vascular endothelial growth factor receptor 1*). *In vitro* Analysen zeigen, dass dieses Protein essentiell für die Bildung von Vaskulogenese-ähnlichen Netzwerken in dreidimensionalen Zellkulturen ist (Hendrix et al., 2001; Hess et al., 2001; Seftor et al., 2001; Frank et al., 2011). Weitere *in vitro* Experimente deckten den Einfluss der umgebenden ECM auf die Fähigkeit der vaskulogenen Mimikry von Tumorzellen auf: mit aggressiven Melanomzellen konditionierte ECM bewirkte bei nicht-aggressiven Melanomzellen die Ausbildung eines Vaskulogenese-ähnlichen Netzwerks (Seftor et al., 2001).

Die Durchblutung von Tumoren kann auf unterschiedlichsten Wegen bewerkstelligt werden: Beispielsweise können in Tumorgewebe Blutgefäße aus angiogenen Gefäßen bestehen, die von schon existierenden Gefäßen vereinnahmt wurden. Zudem können Blutgefäße in Tumoren aus intussuszeptivem, mikrovaskulogenem Wachstum, postnataler Vaskulogenese oder vaskulogener Mimikry hervorgehen. Des Weiteren existieren Mosaikgefäße, die aus Tumorzellen und Endothelzellen gebildet werden (Dome et al., 2007; Seftor et al., 2012). Auf Grund dieser Vielzahl an Vaskularisationsmechanismen, die während der Progression von Tumoren auftreten, gestaltet sich eine effektive Antivaskularisationstherapie bei Krebspatienten als äußerst schwierig. Für eine wirkungsvolle Therapie wäre die Identifizierung des individuellen Vaskularisationsprofils nötig (Dome et al., 2007).

II. Material und Methoden

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, solange keine Reaktionstemperatur explizit angegeben wurde.

II.1. Zellkultur

II.1.1. Zelllinien und Kulturbedingungen

Die humane OSCC Zelllinie PCI13 wurde freundlicher Weise von Prof. T. L. Whiteside der University of Pittsburgh Cancer Institute (PCI), (Pittsburgh, PA) zur Verfügung gestellt. Die Zellen der Zelllinie PCI13 wurden aus Tumorgewebe eines männlichen OSCC Patienten isoliert, der an einem geringgradig eingestuftem Tumor des retromolaren Dreiecks litt. Das Tumorstadium war pT4pN1M0G3. Kultiviert wurden die PCI13 Zellen in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) (Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 2mM L-Glutamin (Thermo Fisher Scientific) und 1% Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific) bei 37°C und 5% CO₂.

Tabelle 2 Zusammensetzung der Kulturmedien für die verwendeten Zellen

Zellen	Mediumzusammensetzung	Hersteller
PCI13	DMEM	Pan-Biotech
	FKS	10% Thermo Fisher Scientific
	L-Glutamin	2 mM Thermo Fisher Scientific
	Penicillin/Streptomycin	1% Thermo Fisher Scientific
tPCI13 COLXVI	DMEM	Pan-Biotech
	FKS	10% Thermo Fisher Scientific
	L-Glutamin	2 mM Thermo Fisher Scientific
	Penicillin/Streptomycin	1% Thermo Fisher Scientific
	Puromycin	0,25 µg/ml Biomol
tPCI13 NC11-GFP	DMEM	Pan-Biotech
	FKS	10% Thermo Fisher Scientific
	L-Glutamin	2 mM Thermo Fisher Scientific
	Penicillin/Streptomycin	1% Thermo Fisher Scientific
	Blasticidin	0,5 µg/ml Millipore

II.1.2. 3D Kultivierung

Kultivierung der Zellen auf GFR Matrigel zur Ausbildung von Netzen

Ein *ThinCert Cell Culture Insert* (Greiner BioONE, Frickenhausen, Deutschland) mit der Porengröße 8 μm für 24-Well-Kulturplatten wurde mit 60 μl in serumfreiem Kulturmedium 1:2 verdünntem GFR Matrigel (Corning) beschichtet. Anschließend wurde dieses ThinCert in 24-Well-Kulturplatten so platziert, dass eine Kammer mit einem oberen und unteren Kompartiment entstand. In das untere Kompartiment wurde 600 μl des Kulturmediums mit 10% frisch aufgetautem FKS gegeben, 100.000 Zellen wurden in Kulturmedium mit 1% FKS resuspendiert und in das obere Kompartiment ausgesät. Die Wachstumsstrukturen der Zellen wurde über 48h mikroskopisch beobachtet und anschließend RNA aus den Zellen isoliert (siehe Kapitel II.2.3) und mit Hilfe quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) (siehe Kapitel II.2.5) untersucht.

II.1.3. Transfektion

Stabile Transfektion

A. Stabile Transfektion zur Expression von rekombinantem Kollagen XVI in OSCC Zellen

Die Kollagen XVI defiziente OSCC Zelllinie wurde von Ratzinger et al. (Ratzinger et al., 2011) mit Hilfe des *FuGene HD* Transfektionsreagenzes (Roche, Penzberg, Deutschland) mit dem von Kassner et al. (Kohfeldt et al., 1997; Kassner et al., 2004) verwendeten Expressionsvektor pCEP-Pu BM40S C-StrepII stabil transfiziert. Die kodierende Sequenz der Kollagen XVI alpha1 Kette (siehe Tabelle 3) wurde zwischen die Restriktionsschnittstellen NheI und NotI in den Vektor kloniert. Die entstandenen Zellklone erhielten die Namen tPCI13 COLXVI C1-4. Kultiviert wurden die COLXVI Zellklone in DMEM (Pan-Biotech) mit 10% FKS (Thermo Fisher Scientific), 2 mM L-Glutamin (Thermo Fisher Scientific), 1% Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific) bei 37°C und 5% CO₂. Als Selektionsantibiotikum wurde jeweils 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin (Biomol, Hamburg, Deutschland) zugegeben. Stabile Mock Kontrollzellen wurden mit dem Expressionsvektor pCEP-Pu BM40S C-StrepII ohne

kodierende Kollagen XVI - Sequenz transfiziert. Die Mock Kontrollzellen wurden als mock1 und mock2 bezeichnet.

Tabelle 3 Sequenzcode der Protein kodierende cDNA Sequenz von humanem Kollagen XVI

cDNA Sequenz Volllänge Kollagen XVI	
Sequenzcode:	>ENST00000373672 cds: KNOWN_protein_coding (Ensemble)
Genname	COL16A1
Proteinname	Collagen Alpha-1 (XVI) chain
Länge des Transkripts:	5.736 bps
Länge des Translationsprodukts:	1.604 Residues
CCDS:	CCDS41297

B. Stabile Transfektion zur Expression des NC11-GFP Fusionsproteins in OSCC Zellen

Die Kollagen XVI defiziente OSCC Zelllinie wurde mit Hilfe von *Xtreme Gene HP DNA* Transfektionsreagenz (Roche) mit dem Expressionsvektor *Vivid Colors™ pcDNA™ 6.2/EmGFP/TOPO Mammalian Expression Vector* (Thermo Fisher Scientific; Katalognummer K359-20) transfiziert. Die kodierende Sequenz der NC11-Domäne (siehe Tabelle 4) wurde nach Herstelleranweisungen in den TOPO-Vektor kloniert. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-Well-Kulturplatten (Corning) in Medium ohne Antibiotika ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen stabil transfiziert. Zur Gewinnung von NC11-GFP exprimierenden Zellklonen wurden aus den transfizierten PCI13-Zellen einzelne Zellen unter Mikroskopkontrolle isoliert. Die auf diese Weise generierten NC11-GFP exprimierenden PCI13 Zellklone erhielten die Bezeichnung tPCI13 NC11-GFP C1-3. Kultiviert wurden die NC11-GFP Zellklone in DMEM (Pan-Biotech) mit 10% FKS (Thermo Fisher Scientific), 2 mM L-Glutamin (Thermo Fisher Scientific), 1% Penicilin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific) bei 37°C und 5% CO₂. Als Selektionsantibiotikum wurde jeweils 0,5 µg/ml Blastocidin (Millipore) zugegeben. Die NC11-GFP Klone exprimierten ein rekombinates NC11-GFP Fusionprotein, bei dem das GFP Protein ans C-terminale Ende der NC11-Domäne fusioniert wurde. Zur Gewinnung von stabil transfizierten Kontroll-Zelllinien wurden PCI13-Zellen mit Hilfe des *Xtreme Gene HP DNA* Transfektionsreagenzes (Roche) mit dem Leervektor transfiziert. Die Mockkontrollzellen wurden als GFP-mock1 und GFP-mock2 bezeichnete

Tabelle 4 Sequenzcode der cDNA Sequenz der NC11-Domäne von Kollagen XVI

cDNA Sequenz NC11-Domäne von Kollagen XVI	
Sequenzabschnitt des Volllänge Kollagen XVI:	66-999 bp der >ENST00000373672 cds: KNOWN_protein_coding (Ensemble)
Länge des Transkripts:	933 bps
Länge des Translationsprodukts:	310 Residues

Transiente Transfektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-Well-Kulturplatten (Corning) mit Medium ohne Antibiotika ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit dem *FuGene HD* Transfektionsreagenz (Roche; Katalognr. 04709705001) nach Herstellerangaben transient transfiziert. Dabei wurde der Kontrollvektor pGL4.74 (hRluc/TK) (Promega, Fitchburg, USA) in einem Verhältnis 1:30 mit dem jeweiligen Luciferase-Reporter-Vektor gemischt (siehe Tabelle 5). Nach zweitägiger Inkubation wurden die transient transfizierten Zellen mit Hilfe des Luciferase-Aktivitäts-Assays (siehe Kapitel II.1.10) auf die jeweilige Promotoraktivität untersucht.

Tabelle 5 Übersicht über die verwendeten Luciferase-Reporter-Vektoren

Luciferase-Reporter-Vektor	MMP9 Promotor Fragment	Transfektionsreagenz	Zellen
pGL4.16 (luc2/Neo) MMP9a	135 bp Fragment	FuGene HD (Roche)	tPCI13 COLXVI
pGL4.16 (luc2/Neo) MMP9b	570 bp Fragment	FuGene HD (Roche)	tPCI13 COLXVI
pGL4.16 (luc2/Neo) MMP9bD	570 bp Fragment Deletion der AP-1 Bindestelle	FuGene HD (Roche)	tPCI13 COLXVI
pGL4.16 (luc2/Neo) MMP9c	970 bp Fragment	FuGene HD (Roche)	tPCI13 COLXVI

II.1.4. Gewinnung von rekombinantem Kollagen XVI

Rekombinantes Kollagen XVI wurde aus Zellkulturüberständen von Kollagen XVI überexprimierenden Zellen mittels einer One-Step Gravity Flow Affinitätschromatographie isoliert. Dazu wurden die Strep-Tactin Superflow Säulen der Firma IBA (Göttingen, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet (Ausbeute: 900µg pro 15 ml Zellkulturüberstand).

II.1.5. Funktionelle Assays

Migrationsassay

Zur Untersuchung der Migration von OSCC Zellen wurde die Boyden-Kammer verwendet. Dabei nutzt man die Eigenschaft der Zellen entlang eines

chemotaktischen Konzentrationsgradienten von einem Kompartiment durch eine poröse Membran in ein anderes Kompartiment zu migrieren (Boyden, 1962).

Zur Herstellung der Boyden-Kammer wurde ein *ThinCert Zellkultureinsatz* (Greiner BioONE) mit der Porengröße 8 μm in einer 24-Well-Kulturplatte (Corning) platziert. Dabei entstand eine Migrationskammer mit einem oberen und unteren Kompartiment. In das untere Kompartiment wurde 600 μl des Kulturmediums mit 10% frisch aufgetautem FKS (Thermo Fisher Scientific) gegeben, 100.000 Zellen wurden in Kulturmedium mit 1% FKS (Thermo Fisher Scientific) resuspendiert und in das obere Kompartiment ausgesät. Nach 24 stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die zur Unterseite des ThinCerts migrierten Zellen mit Hilfe der Kristallviolett färbung gefärbt. Dazu wurden die Zellen am ThinCert gewaschen, mit 1% Glutaraldehyd (Sigma, St. Louis, USA) fixiert und anschließend mit einer 0,02% Kristallviolett färbelösung (Sigma) gefärbt. Der Farbstoff wurde in 70%igem Ethanol gelöst. Die Farbintensivität der erhaltenen Ethanollösung, die relativ zur Zellzahl der migrierten Zellen war, wurde am *Tecan GENios Microplate Reader* (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 595 nm analysiert.

Invasionsassay

Zur Analyse der Invasivität der OSCC Zellen wurden 3D *Micromass* Pellets generiert. Dazu wurden 96-Well-Kulturplatten mit 1% Agarose (Biozym, Hessisch Oldenburg, Deutschland) beschichtet. 50.000 Zellen wurden in einem Milliliter Kulturmedium resuspendiert, davon jeweils 100 μl in die Wells gegeben und 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zudem wurden die *Wells* einer 24-Well-Kulturplatte mit partiell degenerierter Kollagen I Matrix (PureCol, Advanced Biomatrix, San Diego, USA: 1 mg/ml, pH 7,5) beschichtet. Die entstandenen *Micromass* Pellets wurden anschließend auf diese degenerierte Kollagen I Matrix (Advanced Biomatrix) platziert und für 48h kultiviert. Die *Micromass* Pellets wurden zu Beginn und nach der 48 stündigen Kultivierung fotografiert. Die Fläche der Invasionszone wurde mit Hilfe des Programms Photoshop CS4 (Adobe, San Jose, USA) gemessen.

Proliferationsassay

BrdU Assay

Der BrdU-Assay beruht auf dem Prinzip des Basenaustausches während der Replikation der DNA. Dabei wird das chemische Basenalogon Bromdesoxyuridin

(BrdU) statt des Nukleotids Thymidin in die DNA der Zelle eingebaut. Der Einbau des BrdUs ist dabei proportional zur Zellzahl und wird mittels Antikörper nachgewiesen.

Für die Messung der Zellproliferation wurden 2500 Zellen in 100 µl Kulturmedium pro *Well* einer schwarzen, nicht transluzenten, 96-*Well*-Kulturplatte (Corning) ausgesät. Am folgenden Tag wurden die adhärenierten Zellen mit PBS gewaschen und zur Synchronisation 6h in Kulturmedium ohne FKS (Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Anschließend fand ein Mediumwechsel mit Kulturmedium mit 10% FKS (Thermo Fisher Scientific) statt. Die Inkubation mit der *BrdU-Labeling Solution* des *Cell Proliferation ELISA, BrdU* (Roche; Katalognummer 11669915001) dauerte 16h. Das weitere Vorgehen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurden das Medium abgenommen und die Zellen mit 200µl *FixDenat* pro *Well* für 30 min fixiert. Das in die DNA eingebaute BrdU wurde mittels eines Antikörpers nachgewiesen, an dem eine Peroxidase (POD) gekoppelt ist. Zur Bindung dieses Antikörpers wurde die Fixierlösung entfernt und die Zellen mit 100µl pro *Well* mit *Anti-BrdU-POD Working Solution* 90 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 200 µl *Washing Solution* für je 5 min, wurde 100 µl der Substrat-Lösung pro *Well* zugegeben und die Chemilumineszenz am *Tecan GENios Microplate Reader* (Tecan) gemessen.

Colony Forming Assay

Bei dem *Colony Forming Assay* handelt es sich um einen *in vitro* Zellüberlebensassay, basierend auf der Fähigkeit einer einzelnen Zelle sich unlimitiert zu teilen und zu einer Zellkolonie heran zu wachsen (Franken et al., 2006). Die Mindestgrösse einer Zellkolonie ist dabei 50 Zellen.

Dafür wurden in 6-*Well*-Kulturplatten pro *Well* 2 ml Grundagar bestehend aus DMEM (Thermo Fisher Scientific) 0,5 % Agar Agar (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 20 % FKS (Thermo Fisher Scientific), 1 % Penicilin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific), 2mM L-Glutamin (Thermo Fisher Scientific) und 3,7g/l Natriumhydrogencarbonat (Merck, Readinton Township, USA) gegeben. Anschließend wurden 100.000 Zellen pro *Well* mit in 400µl Kulturmedium resuspendiert, 600 µl Grundagar dazu pipettiert und in die vorbereiteten 6-*Wells* ausgesät. Die Zellen wurden vier Wochen bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Während dessen wurde den Zellen in Form von 1 ml Topagar bestehend aus DMEM (Thermo Fisher Scientific) 0,3 % Agaragar (Roth), 20 % FKS (Thermo Fisher Scientific), 1 %

Penicilin/Streptomycin (Gibco), 2mM L-Glutamin (Gibco) und 3,7g/l Natriumhydrogen-carbonat (Merck) wöchentlich Nährstoffe zugeführt. Die Zellenkolonien wurden anschließend fotografiert (72 Pixel/Zoll) und mit Hilfe des Computerprogramms Photoshop CS4 (Adobe) ausgemessen und gezählt. Dabei wurden Zellhaufen größer als 200 Pixel (nach Vereinzelnung 50-100 Zellen) als Kolonie bewertet. Die Anzahl der Kolonien pro well wurde auf die Anzahl der Kolonien bei Mock Kontrollzellen pro well normalisiert.

II.1.6. Inhibition der ILK

Zur Hemmung der ILK wurden die tPCI13 COLXVI Zellen mit dem ILK Inhibitor Cpd22 (Millipore, Billerica, USA) 24 h lang behandelt. Der Inhibitor wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) zu einer 10 mM Stocklösung gelöst. Die Endkonzentration zur Inhibition der ILK war 300 nM.

II.1.7. Inhibition fokaler Adhäsionskontakte

Um fokale Adhäsionskontakte zu inhibieren, wurden tPCI13 COLXVI Zellen mit RGD-Peptiden (Abbotec, San Diego, USA) 24 h lang inkubiert. Die RGD-Peptide wurden in DMEM gelöst. Die Konzentration der Stocklösung betrug 2 mg/ml.

II.1.8. Inhibition der VEGF Rezeptoren

Zur Inhibition von VEGF Rezeptoren wurden tPCI13 NC11-GFP Zellen für 24h oder 48h mit *Axitinib* (Tocris, Bristol, UK) mit einer Endkonzentration von 30 nM inkubiert. *Axitinib* wurde in DMSO (Sigma) zu einer 30 µM Stocklösung gelöst.

II.1.9. Inhibition des AP-1

AP-1 wurde bei tPCI13 COLXVI Zellen mit Tanshinone II A (Tocris) mit einer Konzentration von 100 ng/ml inhibiert. Gelöst wurde Tanshinone II A in DMSO (Sigma). Bei Tanshinone II A handelt es sich um eine in *Salvia miltiorrhiza radix* (Rotwurzel Salbei) natürlich vorkommende Substanz, die im klinischen Alltag zur

Prävention von Psoriasis (Schuppenflechte), atypischer Dermatitis und anderen entzündungsbedingten Erkrankungen Anwendung findet. Der Rotwurz Salbei kommt auch in der traditionellen Chinesischen Medizin zur Anwendung (Li et al., 2012).

II.1.10. Luciferase-Assay

Zur Messung der Promotoraktivität der MMP9 Promotorfragmente wurde ein *Dual-Luciferase® Reporter Assay* (Promega) durchgeführt. Dafür wurden die tPCI13 COLXVI Zellen, wie in Kapitel II.1.3 beschrieben, mit den induzierbaren Firefly-Luciferase-Reporter Vektoren (siehe Kapitel II.2.1 und II.2.2) und dem konstitutiv exprimierenden *Renilla*-Luciferase Kontrollvektor (Promega) transient transfiziert. Der *Renilla*-Luciferase Kontrollvektor diente zur Normalisierung der Transfektionseffizienz. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen zur Messung der Firefly- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität geerntet. Nach Abnahme des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit *1x Passive Lysis Buffer* überschichtet und 20 min inkubiert. Von dem Zelllysate wurde 20 µl in Luminometer-Röhrchen vorgelegt und mit Hilfe der Injektoren des Luminometers *DLReady* (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) zunächst 90 µl des *Luciferase Assay Reagent II* zugegeben und die Firefly-Luciferase-Aktivität in *relative light units (rlu)* gemessen. Anschließend wurde mit Hilfe der Injektoren 90 µl *Stop&Glo Reagent* zu der Probe zugegeben und die *Renilla*-Luciferase-Aktivität gemessen.

II.2. Molekularbiologische Methoden

II.2.1. Klonierung

Der pcDNA™ 6.2/EmGFP/NC11-GFP Vektor

Die kodierende Sequenz der NC11-Domäne (siehe Tabelle 4) wurde nach Herstelleranweisungen in den TOPO-Vektor pcDNA™ 6.2/EmGFP/TOPO (Thermo Fisher Scientific) kloniert. Die Sequenz wurde mittels folgender Primer aus *genomischer DNA* (siehe Kapitel 0) in einer PCR amplifiziert: 5'-GTCATGAATACAGGTGCACAATG-3' und 5'-AGAGGGAGCAAGTGTGACATT-3'.

Die kodierende Sequenz des GFPs wurde dabei C-terminal an die kodierende Sequenz der NC11-Domäne kloniert.

Die MMP9-Promotor Reporter-Vektoren für den Luc-Assay

Die verschiedenen Promotorfragmente von MMP9 wurden den Herstellerangaben folgend vor das *Luciferase* Gen in den pGL4.17 (luc2/Neo) Vektor (Promega; Katalognummer E6721) kloniert. Um die Primer zur Herstellung der MMP9 Promotorfragmente zu designen, wurde die Gensequenz mit der Identifizierungsnummer ENST00000372330 (ensemble.org, 20. Dezember 2013) verwendet:

Tabelle 6 Primersequenzen für die Herstellung der MMP9-Promotorfragmente

Vektorname	Promotor-länge	Primersequenz	Schnittstelle
pGL4.16 (luc2/Neo) MMP9a	135 bp	5'-tacattGGTACCAGCACTTGCCTGTCAAGGA-3' 5'-ttgataCTCGAGCCAGCACCAGGAGCACC-3'	<i>KpnI</i> GGTACC <i>XhoI</i> CTCGAG
pGL4.16 (luc2/Neo) MMP9b	570 bp	5'-tacattGGTACCAAAGAGGACAGAGCCTGGA-3' 5'-ttgataCTCGAGCCAGCACCAGGAGCACC-3'	<i>KpnI</i> GGTACC <i>XhoI</i> CTCGAG
pGL4.16 (luc2/Neo) MMP9c	970 bp	5'-tacattGGTACCTCTTGGGTCTTGGCCTTAGT-3' 5'-ttgataCTCGAGCCAGCACCAGGAGCACC-3'	<i>KpnI</i> GGTACC <i>XhoI</i> CTCGAG

II.2.2. Deletion der AP-1 Bindestelle im pGL4.16 (luc2/Neo) MMP9b Reporter-Vektor

Zur Deletion der AP-1 Bindestelle wurde ein *forward* Primer erstellt, der am 3' Ende der gewünschten Deletionsstelle lag. Dazu wurde folgende Gensequenz von MMP9 verwendet: transcript ENST00000372330 (ensembl.org, am 20. Dezember 2013). Der *reverse* Primer liegt am 5'-Ende der gewünschten Deletionsstelle. Diesem Primer wurde die Restriktionsschnittstelle des Restriktionsenzym *EcoRI* für einen späteren Kontrollverdau eingefügt. Beide Primer waren phosphoryliert. Anschließend wurde mittels der PhusionTM Hot Start Polymerase (Thermo Fisher Scientific) der Deletionsvektor mit den Primern in einer PCR amplifiziert. Als Matrizenstrang diente der aus *E.coli* isolierte und folglich methylierte pGL4.16 (luc2/Neo) MMP9b Vektor. Die Besonderheit der PhusionTM Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase war ihre 3'-5' Exonuklease Aktivität (Korrekturaktivität). Dadurch besaß sie eine 50-fach geringere Fehlerrate als die Taq-Polymerase. Sie konnte bis zu 20 kb lange DNA-Stränge ohne Überhänge amplifizieren. Anschließend wurde das PCR Produkt mit

dem *PCR Purification Kit* (Qiagen, Venlo, Niederlande; Katalognummer 28104) nach Herstellerangaben gereinigt und mit dem Enzym DpnI (Promega; Katalognummer R6231) nach Herstellerangaben 3h bei Raumtemperatur verdaut um den methylierten Matrizenstrang, das pGL4.17 (luc2/Neo) MMP9b Plasmid, abzubauen (Mülhardt, 2009). Nach der Ligation für 2h bei Raumtemperatur mit der NEB T4 Ligase (NEB, Ipswich, USA) wurde der Deletionsvektor pGL4.17 (luc2/Neo) MMP9bD in chemisch kompetente *E.coli* NEB 5alpha (NEB; Katalognummer C2987) nach Herstellerangaben transfiziert. Dafür wurde die Ligase im Ligationsansatz zunächst hitzeinaktiviert (10 min 65°C) und die Probe anschließend für 15 min auf Eis herunter gekühlt. Zur Transfektion wurden zu den frisch aufgetauten kompetenten *E.coli* 5 µl des Ligationsansatzes gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock bei 42°C für 30 s und ein anschließender Kälteschock auf Eis für 30 s. Anschließend wurde zu den Zellen 950 µl *SOC-Medium* (NEB) gegeben und 60 min bei 37°C geschüttelt. Die transfizierten Zellen wurden auf LP-Agar Platten (Rezept siehe Tabelle 9) mit Ampicillin als Selektionsmarker ausgesät.

Tabelle 7 Verwendete Primer zur Deletion der AP-1 Bindestelle im pGL4.17 (luc2/Neo) MMP9b Reporter-Vektor

Primer	Primersequenz	Schnittstelle
MMP9bD forward	5'-GCACTGCTGTCAAGGAGGGGTGG-3'	-
MMP9bD Reverse	5'-GAATTC-GCAGCACCAGCATGAGAAAG -3'	EcoRI GAATTC

Tabelle 8 Temperaturprofil für die Phusion™ Hot Start PCR

Zyklus-Schritt	Temp.	Zeit	Anzahl
Initiale Denaturierung	98°C	1 min	1
Denaturierung	98°C	5-10 sec	5
Annealing	58°C	30 sec	
Extension	72°C	92 sec	
Denaturierung	98°C	5-10 sec	25
Annealing	65°C	30 sec	
Extension	72°C	92 sec	
Final extension	72°C	5-10 min	1
	4°C	For ever	

Tabelle 9 Zusammensetzung von LB-Medium Agar Platten; pH 7 mit NaOH eingestellt

Zusammensetzung	Hersteller	
NaCl	1%	VWR (Radnor, USA)
Pepton	1%	Sigma
Hefeextrakt	0,5%	Sigma
Agar Agar	1,5%	Roth

II.2.3. RNA Isolierung

Die RNA wurde mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben aus den Zellen isoliert. Dazu wurden die Zellen zunächst von der Kulturflasche (Corning)

mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) gelöst, bei 300 g für 5 min zentrifugiert und mit PBS (Sigma) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 350 µl (T25 Kulturflasche) oder 600 µl (T75 Kulturflasche) *RLT-Lysis Buffers* mit *beta*-Mercaptoethanol (1:100; Sigma) lysiert. Die Lyse wurde mit gleichen Volumen an 70%igen Ethanol (Roth) abgestoppt. Daraufhin wurde die Probe auf eine Zentrifugationssäule des Kits aufgetragen und für 30 sec bei 10.000 rpm mit der PerfectSpin 24 Plus Zentifuge (VWR, Erlangen, Deutschland) zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend mit 700 µl *RW1 Wash Buffer* (30 sec, 10.000 rpm), 500 µl *RPE Wash Buffer* sowie 500 µl *RPE Wash Buffer* (2 min, 10.000 rpm) gewaschen. Eluiert wurde die RNA mit 20 µl Wasser (1 min, 10.000 rpm) und bei -80°C gelagert.

II.2.4. Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA wurde der *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Katalognummer: 05081963001; Roche) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Den verwendeten Reaktionsansatz und das Temperaturprofil sind in Tabelle 10 angegeben. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 10 Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die cDNA-Synthese

Reaktionsansatz		Temperaturprofil
Total RNA (1µg)	x µl	10 min 65°C
50 µM Oligo(dT) Primer	1 µl	
600 µM Random Hexamer Primer	2 µl	
Wasser	13-x µl	
5x Reaction Buffer	4 µl	10 min 25°C
40 U/µl RNase Inhibitor	0,5 µl	30 min 55°C
10 mM dNTPs	2 µl	5 min 85°C
20 U/µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	0,5 µl	

II.2.5. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) mit *TaqMan*-Sonden

Die Quantitative PCR mit *TaqMan*-Sonden beruht auf der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase. Bei der *TaqMan*-Sonde handelt es sich neben den Primern um ein weiteres Oligonukleotid, dass mit der gesuchten Sequenz zwischen den Primern hybridisieren kann. Sein 3'-Ende ist durch ein Didesoxynucleotid oder eine Phosphatgruppe blockiert und kann folglich nicht als Primer fungieren. Des Weiteren

besitzt die Sonde an einem Ende einen Fluoreszenzfarbstoff, der als Reporter fungiert und am anderen Ende ein weiteres Fluorochrom, das als Quencher dient. Der Quencher absorbiert die Emission des Reporters solange er in seiner räumlichen Nähe ist. Während der Elongation baut die Taq-Polymerase aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die TaqMan-Sonde ab. Dabei wird der Quencher vom Reporter getrennt und die Lichtemission des Reporters kann gemessen werden (Livak et al., 1995; Mülhardt, 2009).

Die quantitative PCR mit TaqMan-Sonden wurde mit dem Brilliant II Fast qPCR Master Mix (Stratagene Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und mit TaqMan-Sonden der Firma Roche durchgeführt. Der verwendete Reaktionsansatz und das Temperaturprofil sind in Tabelle 11 und

Tabelle 12 gezeigt.

Tabelle 11 Temperaturprofil der quantitativen TaqMan-PCR

Zyklus-Schritt	Temp.	Zeit	Anzahl
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	12 sec	45
Annealing	60°C	30 sec	
Extension	72°C	10 sec	

Tabelle 12 Reaktionsansatz der quantitativen Taqman-PCR

Reaktionsansatz	
2x Brilliant II Fast Master Mix (Mg ₂ Cl, Taq DNA-Polymerase, NTPs)	10 µl
Forward Primer (20 µM)	0,5 µl
Reverse Primer (20 µM)	0,5 µl
TaqMan-Sonde	0,5 µl
Wasser	5,5 µl

Tabelle 13 Für die quantitative PCR verwendete Primer und TaqMan-Sonden

Gen	Sequenzen	Sonde (bei Roche erhältlich)	Hersteller
18 S	GCAATTATCCCCATGAACG GGGACTTAATCAACGCAAGC	#48	Eurofins (Luxemburg)
ITGA1	CATGTAAAGTTGGATATCCCTTCC CATTTCCATGAGATAGGATGTGTT	# 35	Eurofins
MMP-9	TTCGACGATGACGAGTTGTG TCCAAACCGAGTTGGAACC	# 61	Eurofins
uPa Rezeptor	ACACCACCAAATGCAACGA CCCCTTGACGCTGTAACAC	# 1	Eurofins
VEGF A	TGCCCCGCTGCTGTCTAAT TCTCCGCTCTGAGCAAGG	# 1	Eurofins
VEGFR-1	CAAGGCCTCGCTCAAGATT CAGCTGGAATGGCAGAAACT	# 40	Eurofins

Gen	Sequenzen	Sonde (bei Roche erhältlich)	Hersteller
VEGFR-2	CTGAACTAAATGTGGGGATTGAC TCGGTTTACAAGTTTCTTATGCTG	# 48	Eurofins

II.2.6. Isolierung genomischer DNA

Zur Gewinnung genomischer DNA aus den OSCC Zellen wurde der *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche; Katalognummer 11796828001) nach Herstellerangaben angewendet. Dazu wurden die Zellen von der Kulturflasche (Corning) abgelöst und bei 300 x g 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 200 µl PBS (Sigma) resuspendiert. Zu den resuspendierten Zellen wurde 200 µl *Binding Buffer* und 40 µl *Proteinkinase K* pipettiert und alles zusammen bei 70°C für 10 min inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl Isopropanol (Merck) wurde die Probe in eine Zentrifugensäule überführt und bei 8.000 x g 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend mit 500 µl *Inhibitor Removal Buffer* (1 min, 8.000 x g) und zweimal mit 500 µl *Wash Buffer* (1 min, 8.000 x g) gewaschen. Die genomische DNA wurde mit 200 µl *Elution Buffer* eluiert und bei -20°C gelagert.

II.3. Proteinchemische Methoden

II.3.1. Proteingewinnung aus Zellen

Gesamtprotein-Zelllysate

Zur Gewinnung von Gesamtprotein-Zelllysaten wurden die OSCC Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt) von der Kulturflasche (Corning) gelöst, mit PBS (Sigma) gewaschen und bei 300 x g 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl *RIPA-Puffer* (radioimmunoprecipitation assay buffer) (Sigma) mit *EDTA-free Protease Inhibitor Ultra* (Roche) resuspendiert und anschließend mit Ultraschall (2 Zyklen, 20 sec, 45% power) behandelt. Danach erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm (Sigma 3K30 Zentirfuge; Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland) und einer Temperatur von 4°C. Der Überstand wurde bei -20°C bis zur Quantifizierung aufbewahrt.

Proteinisolation nach ihrer subzellulärer Lokalisation

Zur Gewinnung von Proteinen sortiert nach ihrer subzellulären Lokalisation wurde der *ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit* (; Millipore Katalognummer 539790) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei konnten zytosolische Proteine, Membranproteine und Kernproteine getrennt voneinander isoliert werden.

II.3.2. Proteinquantifizierung

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde ein *BCA Protein Assay* (Millipore) durchgeführt. Der BCA Assay beruht auf der alkalischen Reduktion des Cu^{2+} -Ions zu Cu^+ in Anwesenheit von Protein. Das reduzierte Cu^+ -Ion bildet zusammen mit der Bicinchoninsäure (englisch: *bicinchoninic acid*, BCA) einen violetten Farbkomplex, der durch photometrische Messung bei 562 nm quantifiziert werden kann. Für den *BCA Protein Assay* wurden 10 μl Zelllysate bzw. BSA-Standard (Albuminbovine Fraction V, Biomol) in die *Wells* einer 96-Well-Kulturplatte (Corning) vorgelegt und anschließend mit 200 μl BCA-Reagenz (50 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde darauf mit dem *Tecan GENios Microplate Reader* bei 562 nm gemessen. Mit Hilfe des BSA-Standards konnte die Proteinkonzentration der Zelllysate bestimmt werden.

II.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine anhand ihres Molekulargewichts in einem SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gel in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Das anionische Tensid SDS denaturiert Proteine unter Bildung von SDS-Protein-Komplexen. Die Proteine weisen damit eine negative Gesamtladung auf und wandern proportional zu ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld vom Minus- zum Pluspol (Laemmli, 1970; Rehm and Letzel, 2009).

Zur Auftrennung der Proteine wurden die Zelllysate vor Auftrag auf das SDS-Gel durch die Zugabe von Laemmli-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 14) 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proteinproben in einem SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gel (10%iges Trenngel und 4%iges Sammelgel siehe Tabelle 14) mit einer Stromstärke von 20 mA pro Gel aufgetrennt. Für die elektrische

Auftrennung wurde die Gelapparatur *Mini-Protean® Tetra Cell* (Bio-Rad, Hercules, California, USA) verwendet.

Tabelle 14 Zusammensetzung der Trenn-, Sammelgele, des Elektronenpuffers und des 5xLaemmli-Puffers

Gele und Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
10%iges Trenngel	ention. H ₂ O	3,6 ml -
	Acrylamid (40%)	2,5 ml Roth
	10 % SDS	100 µl Roth
	1 M Tris pH 8.8	3,75 ml Affymetrix (Santa Clara, USA)
	10 % Ammonium Persulfat	50 µl Sigma
	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine	10 µl Sigma
4%iges Sammelgel	ention. H ₂ O	2,85 ml -
	Acrylamid (40%)	375 µl Roth
	10 % SDS	37,5 µl Roth
	1 M Tris pH 8.8	450 µl Affymetrix
	10 % Ammonium Persulfat	25 µl Sigma
	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine	3,5 µl Sigma
Elektrodenpuffer	Tris pH 8.5	25 mM Affymetrix
	Glycin	192 mM Merck
	SDS	1% Roth
5x Laemmli-Puffer	SDS	10% Roth
	Glycerol	50% Applichem
	Tris pH 6,8	300mM Affymetrix
	Bromphenolblau	0,01% Applichem
	H ₂ O	

II.3.4. Western Blot

Die Proteine wurden nach der Gelelektrophorese durch elektrophoretischen Transfer (*Mini Trans-Blot® Cell*, (Bio-Rad) Tank-Blot, 140 mA, 1 h 10 min, siehe Tabelle 15) auf eine PVDF-Membran (Roche) übertragen.

Tabelle 15 Zusammensetzung des Blotpuffers

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Blotpuffer	Tris/HCl pH 8.5	25 mM Affymetrix
	Glycin	192 mM Merck
	Methanol	10% Merck

II.3.5. Proteindetektion auf Western Blots

Die Membran wurde nach dem Blotten 1h mit 5% BSA in TBST (siehe Tabelle 16) blockiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper (3% BSA in TBST) erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach dreifachem Waschen mit TBST (3x10 min) wurde die Membran mit dem HRP-gekoppelten (*horse radish peroxidase*) Sekundärantikörper (in 3% BSA in TBST) 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut gewaschen (3x10 min mit TBST), 5 min mit Roti-Lumin (Roth) oder SuperSignal® West Femto (Thermo Fisher Scientific) inkubiert. Die Detektion des Chemilumineszenzsignals erfolgte mit Hilfe des Chemolumineszenzsystems Chemi-Smart 500 der Firma PeqLab. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind der Antikörperliste im Anhang zu entnehmen. Zur semiquantitativen Analyse wurde die Bandenintensität des analysierten Proteins durch die Bandenintensität der korrespondierenden Ladekontrolle geteilt.

Tabelle 16 Zusammensetzung TBST

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
TBST	Tris pH 7,5	20 mM Affymetrix
	NaCl	150 mM Merck
	Tween20	0,1 % Sigma

II.3.6. Immunpräzipitation mit magnetischen *Microbeads*

Die Immunpräzipitation mit den magnetischen *Protein A/G Microbeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) und Hilfe der μ MACS-Säulen (Miltenyi Biotec) wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde 200 μ g Gesamtprotein eines Zelllysats mit 2 μ g eines monoklonalen Antikörpers bzw. 4 μ g eines polyklonalen Antikörpers vermengt. Zusätzlich wurde, abhängig von der Spezies, aus der der Antikörper isoliert wurde (Protein A oder G) und Art: 50 μ l (monoklonaler Antikörper) bzw. 100 μ l (polyklonaler Antikörper) magnetische Protein *A/G Microbeads* zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Während dessen wurde die μ MACS-Säule in einem magnetischen Feld angebracht. Anschließend wurde die Probe auf die Säule gegeben, die Säule viermal mit RIPA-Puffer (Sigma) gewaschen und einmal mit 1:100 in Wasser verdünnten RIPA-Puffer gewaschen. Eluiert wurde das Immunpräzipitat mit 50 μ l auf 95°C erhitzten 1xLaemmli-Puffer (5xLaemmli-puffer

1:5 mit Wasser verdünnt siehe Tabelle 14). Es folgte eine SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe Kapitel II.3.3)

II.3.7. Gelatine Zymographie

Zur Detektion aktiver MMPs in Zellkulturüberständen wurde eine Gelatine Zymographie durchgeführt. Dabei macht man sich die Eigenschaft einiger MMPs (vor allem MMP-2 und MMP-9) zu Nutze, Gelatine abzubauen. Für die Detektion aktiver MMPs wurden 70% konfluente OSCC Zellen 24h in FKS-freiem Kulturmedium kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und deren Proteinmenge mittels der Zentrifugensäulen Amicon® Ultra 10K (Millipore) nach Herstellerangaben konzentriert. Nach anschließender Proteinquantifizierung (siehe Kapitel II.3.2), wurden 2 µg der Gesamtproteinmenge mit nicht reduzierendem 2x Lade-Puffer versetzt und auf ein gelatinehaltiges PAA Gel (siehe

Tabelle 17) aufgetragen. Das Gel wurde während der folgenden Gelelektrophorese (20 mA pro Gel) auf 4°C gekühlt, damit es nicht zur Denaturierung der Proteasen kam. Danach wurde das Gel zwei mal 30 min mit Renaturierungspuffer gewaschen, dann vier mal 5 min mit Wasser. Nach der Inkubation zwischen 48h in Verdaupuffer bei 37°C, wurde das Gel mit der Coomassie Blue Färbelösung 1h gefärbt, 15 min mit der Entfärber-Lösung I und anschließend über Nacht mit der Entfärber-Lösung II entfärbt.

Tabelle 17 Zusammensetzung der gelatinehaltigen PAA Gele, Puffer und Lösungen

Gele, Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
10%iges Trenngel	ention. H ₂ O	
	40% Acrylamid	10% Roth
	10% SDS	0,1% Roth
	Tris pH 8,8	250mM Affymetrix
	10% Ammonium Persulfat	0,07% Sigma
	1% Gelatine	0,1% Sigma
	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine	0,1% Sigma
4,5%iges Sammelgel	ention. H ₂ O	
	Acrylamid (40%)	4,5% Roth
	10 % SDS	0,1% Roth
	1 M Tris pH 8.8	250mM Affymetrix

Gele, Puffer und Lösungen	Zusammensetzung		Hersteller
	10 % Ammonium Persulfat	0,05%	Sigma
	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine	0,33%	Sigma
2x Ladepuffer	Tris/HCl pH 8	20 mM	Affymetrix
	EDTA	2 mM	Applichem
	SDS	2 %	Roth
	Glycerol	20 %	Applichem
	Bromphenolblau	0.02 %	Applichem
Renaturierungspuffer	Triton X-100	2.5%	Sigma
Verdaupuffer	Tris/HCl pH 8.5	50 mM	Affymetrix
	CaCl ₂	5 mM	Merck
Coomassie Blue Färbelösung	Coomassie Blue	0,25 %	Applichem
	Essigsäure	10 %	Merck
	Isopropanol p. a.	25 %	Merck
Entfärber-Lösung I	Methanol p. a.	50 %	Merck
	Essigsäure	10 %	Merck
Entfärber-Lösung I	Methanol p. a.	5 %	Merck
	Essigsäure	7,5 %	Merck

II.3.8. Immunfluoreszenz-Färbungen

Nach dem Aussäen von 10.000 OSCC Zellen pro Kammer eines Glasobjekträgers (ChamberSlides von Millipore) und der Kultivierung für zwei Tage, wurden die Zellen 10 min mit 4%igem Paraformaldehyd (Sigma) in PBS (Sigma) fixiert und dreimal 5 min mit PBS mit 0,1% Tween20 (PBST) gewaschen. Es folgte die Permeabilisierung der Zellen mit Hilfe von 0,1% Triton X-100 (Sigma) 5 min in PBS. Nach nochmaligem Waschen (3x 5 min mit PBST) wurden die Zellen für 1h mit 3% BSA (Biomol) in PBS mit 0,1% Tween 20 (PBST) blockiert, anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (in 3% BSA in PBST) inkubiert und danach abermals mit PBST gewaschen (3x 5 min) Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpers (3% BSA in PBST). Zum Schluss wurden die Zellen mit *Vectashield Mounting Medium with DAPI* (Vector Laboratories, Peterborough, UK) eingedeckelt und damit gleichzeitig die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Für Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen wurde das Mikroskop Olympus BX 61 (Olympus, Hamburg, Deutschland) verwendet. Zur Quantifizierung wurden der Mittelwert der Fluoreszenzintensität jeder einzelne Zelle eines Bildes mit Hilfe des Programmes ImageJ 1.6 (Wayne Rasband, National Institute of Health,

USA) gemessen und durch die Zellfläche geteilt. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in der Antikörperlist (siehe Anhang) aufgelistet.

II.3.9. Immunohistochemische Färbung

Nach dem Aussäen von 20.000 OSCC Zellen pro Kammer eines Glasobjekträgers (ChamberSlides von Millipore) und der Kultivierung für zwei Tage, wurden die Zellen 15 min mit 2%igem Paraformaldehyd (Sigma) in PBS (Sigma) fixiert und anschließend dreimal für 5 min mit PBS mit 0,1% Tween20 (PBST) gewaschen. Permeabilisiert wurden die Zellen mit Hilfe von 0,1% Triton X-100 (Sigma) für 5 min in PBS. Nach nochmaligem waschen mit PBST (3x 5 min) wurden die endogenen Peroxidasen mit 3% Wasserstoff in einer 10%igen Methanollösung gehemmt. Anschließend wurden die Zellen 1h mit 5% normalen Ziegen Serum (Sigma) in PBST blockiert. Nach der Inkubation mit Primärantikörper (in 3% normalen Ziegen Serum in PBST) bei 4°C über Nacht, wurden die Zellen dreimal 5 min mit PBST gewaschen und 30 min mit dem HRP-Polymer *Dako EnVision™+ Dual Link System-HRP* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) behandelt. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit PBST gewaschen (3x 5 min) und mit Hilfe von *SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Substrat* (Sigma), das nach Herstellerangaben hergestellt wurde, angefärbt. Durch Waschen mit PBS wurde die Färbeprozedur gestoppt und die Zellen wurden schließlich mit *Dako Glycergel Mounting Medium* (Agilent Technologies) eingedeckelt. Für und Durchlichtaufnahmen wurde das Mikroskop Olympus BX 61 (Olympus) verwendet.

II.3.10. Proximity Ligation Assay

Für die Analyse der Kindlin-1/ILK Interaktion wurde ein *Duolink® proximity ligation assay* (PLA) der Firma Olink (Uppsala, Schweden, Katalognummer: DUO92105) nach Herstellerangaben durchgeführt. Diese Methode verbindet eine Immunfluoreszenzfärbung mit einer DNA-Amplifikation. Dabei werden sekundäre Antikörper verwendet, die mit einem Plus- oder Minusstrang einer DNA-Sequenz gekoppelt sind. Befinden sich die gesuchten Proteine, also folglich auch die Antikörper, in räumlicher Nähe zueinander, hybridisieren die DNA-Stränge. Die Polymerase kann nun den Strang nach dem *rolling circle* Mechanismus amplifizieren.

Anschließend wird die amplifizierte DNA mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden hybridisiert. Die Fluoreszenz ist als punktförmiges Signal unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Für den Nachweis der Kindlin-1/ILK Interaktion wurden die Antikörper der Tabelle 18 verwendet. Als Negativkontrolle wurde der Anti-ILK Antikörper zusammen mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von $\beta 1$ Integrin (Millipore) verwendet. Die ersten Antikörper wurden in 3%igen BSA in TBST nach Herstellerangaben verdünnt und 1h in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach anschließender 30minütiger Inkubation mit den PLA-Proben (1:5 verdünnt) bei 37°C fand die Amplifikation 2h lang bei 37°C in einer feuchten Kammer statt. Zur Quantifizierung der Kindlin-1/ILK Interaktion wurden alle Interaktionen eines Bildes mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ V1.45 (Bethesda, USA) gezählt und durch die Anzahl der Zellen geteilt.

Tabelle 18 Für den PLA verwendete Antikörper

Antigen	Spezies	Sekundärantikörper	Hersteller
ILK	Goat IgG	Anti-Goat IgG (minus DNA Strang)	SantaCruz (Dallas, USA)
Kindlin-1	Rabbit IgG	Anti-Rabbit IgG (plus DNA Strang)	Abcam (Cambridge, UK)

II.4. Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Computerprogramms *GraphPad Prism V6* (San Diego, USA) berechnet. Dazu wurde der Mann Whitney U Test herangezogen. Ein p-Wert gleich oder unter 0,05 wurde als signifikant angenommen. Die Fehlerbalken repräsentierten die Standardabweichung.

III. Ergebnisse

III.1. TEIL 1:

Kollagen XVI induziert die MMP9 Expression über die Aktivierung des ILK/Akt/AP-1 Signalweges und fördert die Invasion von OSCC-Zellen

Im Verlauf der Tumorgenese von Glioblastomen und OSCC kommt es in distinkten Tumorstadien zu einer starken Überexpression von Kollagen XVI (Senner et al., 2008; Bauer et al., 2011; Ratzinger et al., 2011a). So konnte während der Progression des OSCCs in hyperplastischen und dysplastischen Bereichen des Tumorgewebes eine Kollagen XVI Überexpression beobachtet werden, wohingegen Kollagen XVI in Gewebeproben gesunder oraler Mukosa nur nahe der Basalmembran lokalisiert ist. Nach der Induktion einer Kollagen XVI Überexpression in einer humanen OSCC-Zelllinie (PCI13) konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Kollagen XVI Expression zum Anstieg der Proteinexpression des Integrin-assoziierten Proteins Kindlin-1 führt und eine verstärkte Interaktion von $\beta 1$ Integrin mit Kindlin-1 zur Folge hat (Ratzinger et al., 2011).

Ein Anstieg der MMP9 Expression und Sezernierung ist während der Progression einer Vielzahl von Tumoren zu beobachten. Zahlreiche Studien deuten auf eine MMP9 Beteiligung an der Angiogenese, der Ausbreitung, der Invasion und der Motilität von Krebszellen hin. Zudem scheint eine erhöhte MMP9 Expression bei der Entstehung der Krebsstammzellnische und der Metastasenbildung involviert zu sein und das Metastasenwachstum zu fördern (Farina and Mackay, 2014).

III.1.1. Einteilung der Kollagen XVI überexprimierenden Zellklone anhand ihrer Kollagen XVI Expressionslevel

Zur Untersuchung des Einflusses von Kollagen XVI während der Progression des OSCCs wurden Kollagen XVI überexprimierende OSCC-Zellen der Zelllinie PCI13 verwendet. In Western Blot Analysen von Zellkulturüberständen mit einem Antikörper, der den N-Terminus des Kollagen XVI erkennt (Kollagen XVI Antikörper),

weisen diese Zellklone (COLXVI Klone) verschiedene Sezernierungslevel von Kollagen XVI auf, während Mock Kontrollklone kein Kollagen XVI sezernieren (Abb. 6). Klon drei und vier zeigen im Vergleich zu Klon eins und zwei eine verstärkte Kollagen XVI Sezernierung (Abb. 6). Um mögliche Dosis-abhängige Effekte von Kollagen XVI offenzulegen, wurde in weiteren Experimenten der COLXVI Klon 1 exemplarisch für eine niedrige Kollagen XVI Sezernierungsdosis untersucht (COLXVI Low), während der COLXVI Klon 3 exemplarisch für eine höhere Dosis (COLXVI High) verwendet wurde. Bei allen COLXVI Klonen können in den Zellkulturüberständen neben Volllänge-Kollagen XVI, das ein molekulares Gewicht von circa 220 kDa hat, auch verschiedene N-terminale, trunkierte Formen von Kollagen XVI detektiert werden: Zu beobachten ist ein 80 kDa Fragment, das bereits von Kassner et al. beschrieben wurde (Kassner et al., 2004). Zusätzlich findet man Fragmente mit einem Molekulargewicht von 60 kDa, 40 kDa und 35 kDa. Eine massenspektroskopische Untersuchung des 35 kDa Fragments identifizierte dieses als NC11-Domäne von Kollagen XVI, die bereits von Tillet et al. als proteolytisches Fragment von Kollagen XVI beschrieben wurde (Tillet et al., 1995).

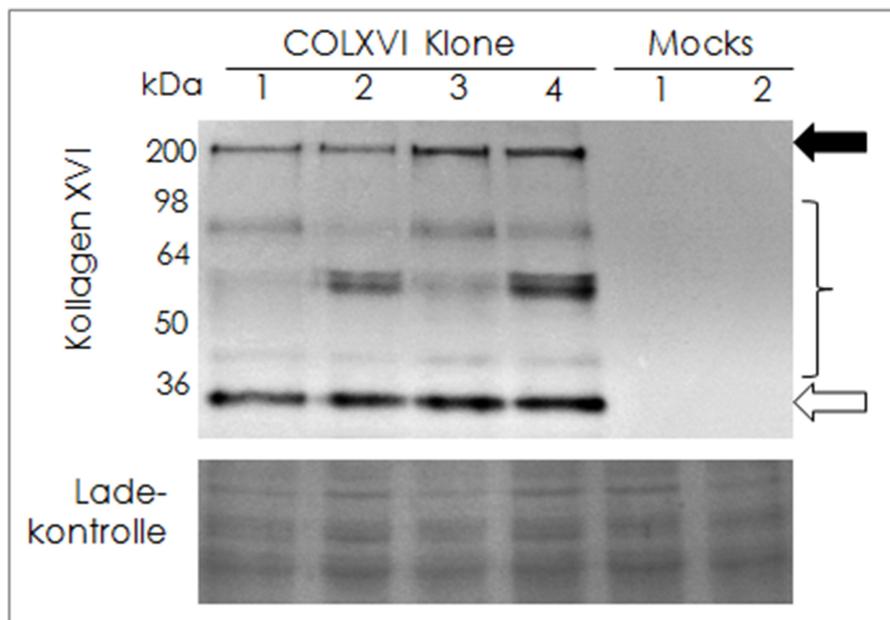


Abb. 6: Kollagen XVI im Überstand von COLXVI Klonen und Mock Kontrollklonen

Western Blot Analyse von Zellkulturüberständen der Kollagen XVI überexprimierenden Klone (COLXVI Klone 1-4) und der Mock Kontrollklone (1-2) mit einem Antikörper, der den N-Terminus von Kollagen XVI erkennt. Nur die COLXVI Klone sezernieren das Volllänge-Kollagen XVI (220 kDa; schwarzer Pfeil). COLXVI Klon 3 und 4 weisen eine stärkere Kollagen XVI Sezernierung auf als Klon 1 und 2. Zudem können bei allen Zellkulturüberständen der COLXVI Klone Fragmente mit einem molekularen Gewicht von 80, 60 und 40 kDa (geschweifte Klammer), als auch die 35 kDa schwere NC11-Domäne detektiert werden (weißer Pfeil). Als Ladekontrolle diente eine Coomassie Blue Färbung des Gels vor dem Blotten.

III.1.2. Kollagen XVI induziert eine erhöhte *MMP9* Expression in oralen Plattenepithelkarzinomzellen

Quantitative Taqman® PCR Analysen weisen eine 5- bis 10-fache Induktion der *MMP9* Genexpression der COLXVI Klone verglichen mit den Mock Kontrollklonen nach (Abb. 7A, weiße Balken). Die Zugabe von 1 µg/ml rekombinantem Kollagen XVI für 24 h zu den Zellen lässt die *MMP9* Genexpression sowohl in COLXVI Klonen als auch in Mock Kontrollklonen weiter stark ansteigen. Dabei erhöht sich die *MMP9* Genexpression nochmals um das 10 bis 15 fache (Abb. 7 A, graue Balken). Dies legt abermalig den Einfluss von Kollagen XVI auf die Genexpression der *MMP9* offen. Untermuert werden diese Ergebnisse durch Gelatinezymographie (Abb. 7 B). Im Vergleich zu Mock Kontrollklonen weisen COLXVI Klone weisen auch hier eine erhöhte *MMP9* Sezernierung auf. Die COLXVI Klone zeigen eine klare Bande bei 92 kDa, welches der Pro-Form von *MMP9* entspricht. Im Gegensatz dazu besitzen Mock Kontrollklone nur eine sehr schwache *MMP9* Bande. Zudem sezernieren sowohl COLXVI Klone als auch Mock Kontrollklone Pro-*MMP2* mit einem molekularen Gewicht von 72 kDa.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Kollagen XVI die Expression und anschließende Sezernierung von *MMP9* in OSCC Zellen induziert. Diese Steigerung der *MMP9* Expression und Sezernierung scheint über exogenes, von den COLXVI Zellen ins Kulturmedium sezerniertes Kollagen XVI induziert zu werden. Die exogene Wirkungsweise von Kollagen XVI auf die Steigerung der Genexpression von *MMP9* in COLXVI Zellen zeigt sich zudem nach Zugabe von rekombinantem Kollagen XVI in das Zellkulturmedium.

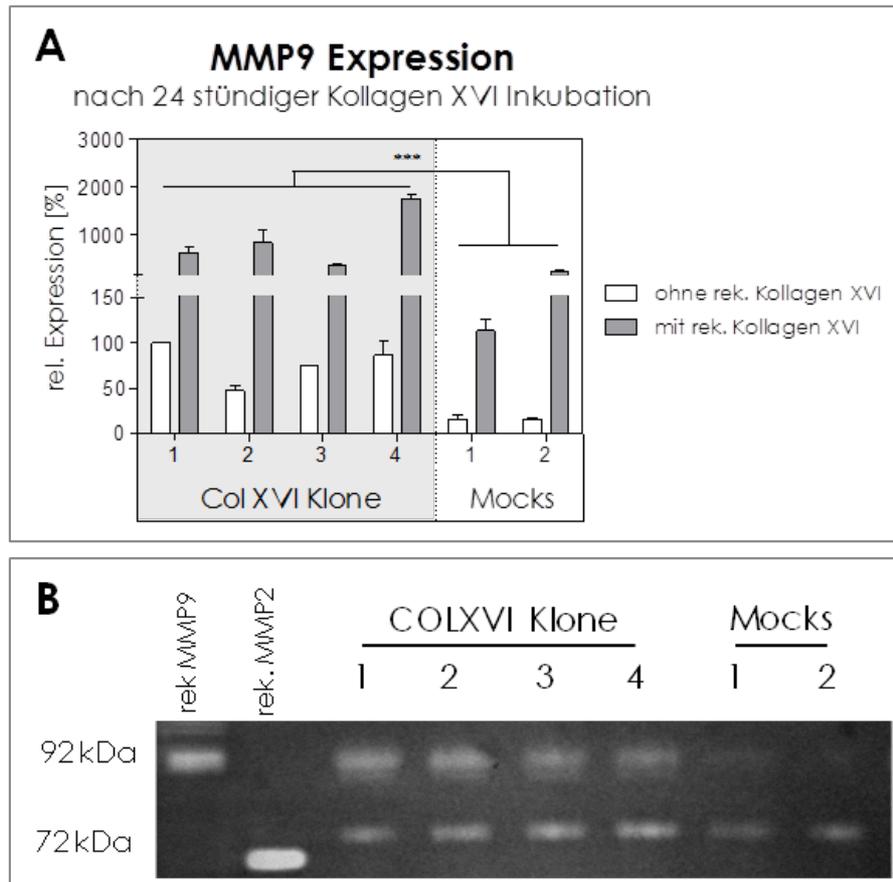


Abb. 7: MMP9 Genexpression und Sezernierung von COLXVI Klonen und Mock Kontrollklonen.

A. Quantitative Taqman® PCR der MMP9 Genexpression von COLXVI Klonen verglichen mit Mock Kontrollen nach 24-stündiger Inkubation mit rekombinatem Kollagen XVI. Ohne zusätzliches Kollagen XVI zeigen COLXVI Klone (1-4), verglichen mit den Mock Kontrollen, eine erhöhte MMP9 Expression (n=3; $p < 0,01$). Die Zugabe von rekombinatem Kollagen XVI (1 $\mu\text{g/ml}$) verursacht einen deutlichen Anstieg der MMP-9 Expression in allen Zellen. **B.** Gelatine Zymogramm von Zellkulturüberständen der COLXVI Klone (1-4) und der Mock Kontrollen (1-2). Die COLXVI Klone weisen eine klare Bande bei 92 kDa auf, die der Pro-Form von MMP9 entspricht. Im Gegensatz dazu zeigen Mock Kontrollklone nur eine schwache Bande bei 92 kDa. Des Weiteren sezernieren sowohl COLXVI Klone als auch Mock Kontrollklone Pro-MMP2 mit einem molekularen Gewicht von 72 kDa.

III.1.3. Kollagen XVI Überexpression führt zur Aktivierung der *integrin linked kinase* (ILK)

Kollagen XVI übermittelt Effekte über die Aktivierung von $\beta 1$ Integrinen und Kindlin-1 (Ratzinger et al., 2011). Es ist bekannt, dass $\beta 1$ Integrin Signale intrazellulär über ILK weiterleiten kann (Hannigan et al., 2005). ILK wird dabei unter anderem über Phosphorylierung (Thr 173) aktiviert. Tatsächlich zeigen Western Blot Analysen von Membranfraktionen eine verstärkte ILK Phosphorylierung in den COLXVI Klonen

verglichen mit den Mock Kontrollklonen (Abb. 8 A). Die ILK Gesamtproteinmenge der COLXVI Klone und Mock Kontrollklone unterscheidet sich dagegen kaum. Um festzustellen, ob die ILK Aktivierung für die Hochregulierung der MMP9 Expression verantwortlich ist, wurde die ILK Aktivierung in den COLXVI Klonen mittels einer 24-stündigen Inkubation mit 300 nM des spezifischen ILK Inhibitors Cpd 22 gehemmt. Die quantitative Taqman® PCR weist eine 60-80%ige Reduktion der *MMP9* Genexpression nach 24-stündiger ILK-Inhibition nach (Abb. 8 B). Die Gelatine-Zymographie zeigt auch eine deutliche Abnahme der MMP9 Sezernierung in Zellkulturüberständen von COLXVI Zellen nach ILK-Inhibition und untermauert diese Befunde. Zudem findet man eine starke Reduktion der MMP2 Sezernierung nach einer ILK-Inhibition (Abb. 8 C). Ein Luziferase Aktivitätsassay mit einem Vektor, der ein 530 bp langes MMP9 Promotorfragment vor dem Luziferase Reporter gen enthält, bestätigt die Beteiligung der ILK an der Kollagen XVI abhängigen Regulation der MMP9 Expression: Es zeigt sich eine 40%ige Reduktion der MMP9 Promotoraktivität in COLXVI Klonen nach ILK-Inhibition (Abb. 8 D). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Kollagen XVI in OSCC Zellen die Phosphorylierung und Aktivierung der ILK induziert. Schließlich kommt es in OSCC Zellen über die Aktivierung der ILK zur verstärkten MMP9 Expression und Sezernierung.

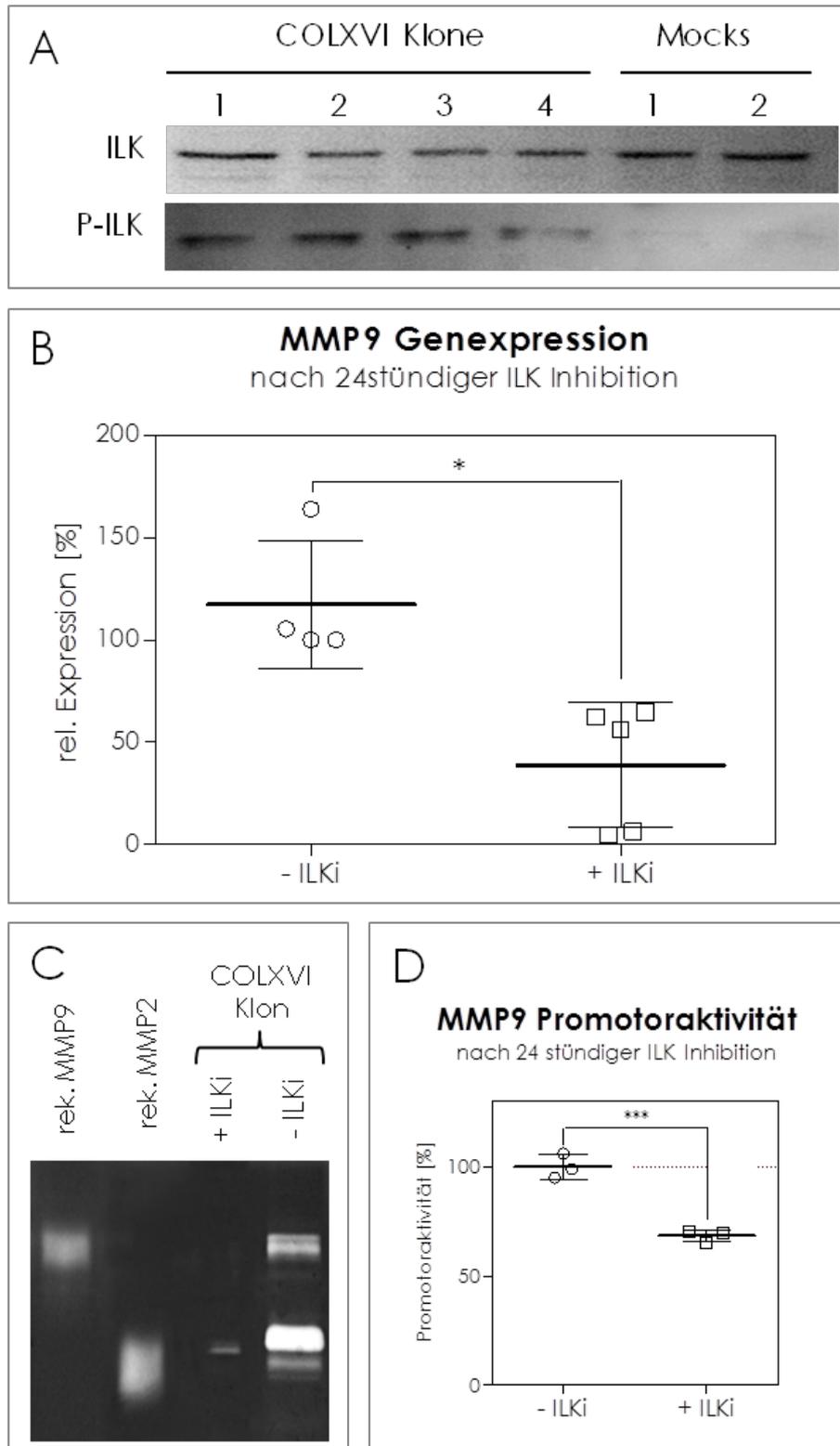


Abb. 8: Kollagen XVI Überexpression induziert MMP9 Genexpression und Sezernierung über ILK Aktivierung

A. Western Blot Analyse von Membranfraktionen zum Nachweis von Gesamt-ILK und phosphorylierter ILK in COLXVI Klonen und Mock Kontrollklonen. Es zeigt sich eine ILK Aktivierung in COLXVI Klonen, während bei Mock Kontrollen nur eine sehr schwache ILK Aktivierung nachweisbar ist. **B.** Quantitative Taqman® PCR zum Nachweis der *MMP9* Genexpression bei COLXVI Klon High nach 24-stündiger ILK Inhibition mit Cpd 22 (c=300 nM; ILKi). Die *MMP9* Expression ist nach ILK Inhibition stark reduziert (n=3; p<0,05). **C.** Gelatinezymographie von Zellkulturüberständen nach 24-stündiger ILK Inhibition mit Cpd 22 (300nM; ILKi) des COLXVI Klons High.

Nach ILK Inhibition ist ein deutlicher Rückgang der MMP9 (92kDa) und MMP2 (72 kDa) Sezernierung zu beobachten. D. Luziferase Aktivitätsassay mit einem Reportervektor, der ein 530 bp langes MMP9 Promotorfragment enthält. Nach 24-stündiger Inhibition der ILK Aktivität mit Cpd 22 (300nM; ILKi) zeigen Zellen des COLXVI Klon High eine deutliche Reduktion der MMP9 Promotoraktivität(n=3; $p < 0.001$).

III.1.4. Kollagen XVI Überexpression führt zur Aktivierung der Proteinkinase B (Akt/PKB)

Aus der Literatur ist bekannt, dass die aktivierte ILK Akt/PKB an ihrem Serinrest an Position 473 phosphoryliert ist (Persad et al., 2001; Hannigan et al., 2005; McDonald et al., 2008). Da in den Membranen der COLXVI Klone verstärkt die phosphorylierte und damit aktivierte Form von ILK vorliegt, wurde untersucht, ob es in den COLXVI Klonen auch zur Aktivierung von Akt/PKB kommt. Tatsächlich zeigen Western Blot Analysen eine verstärkte Phosphorylierung der Akt/PKB am Serinrest 473 in COLXVI Klonen, Mock Kontrollklone weisen dagegen eine geringere Phosphorylierung auf (Abb. 9). Die Akt/PKB Gesamtproteinmenge der COLXVI Klone und Mock Kontrollklone unterscheidet sich dagegen nicht. Dieser Befund untermauert die bisherigen Ergebnisse der Kollagen XVI induzierten ILK Aktivierung, da Akt/PKB im Verlauf der ILK Signalkaskade aktiviert wird. Kollagen XVI verursacht wahrscheinlich über die Aktivierung der ILK die Phosphorylierung der Akt/PKB.

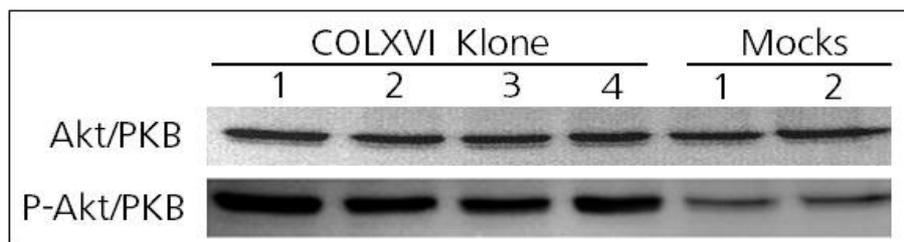


Abb. 9: PKB/Akt Phosphorylierung

Western Blot Analyse von Zelllysaten zum Nachweis von gesamt PKB/Akt und Ser473 phosphorylierter PKB/Akt bei COLXVI Klonen und Mock Kontrollklonen. Es zeigt sich eine verstärkte Ser473 Phosphorylierung in COLXVI Klonen verglichen mit den Mock Kontrollen.

III.1.5. Kollagen XVI Überexpression führt zu vermehrter ILK/Kindlin-1 Interaktion

Kindlin-1 wird in COLXVI Klonen überexprimiert (Ratzinger et al., 2011). Des Weiteren ist ein Kindlin-1 verwandtes Protein, das Kindlin-2, ein bekannter Interaktionspartner der ILK (Böttcher et al., 2012). Zudem zeigen die bisherigen Experimente eine Beteiligung von ILK an der Kollagen XVI induzierten MMP9 Expression. Aus diesem Grund wurde getestet, ob Kindlin-1 möglicherweise in Kollagen XVI überexprimierenden Zellen mit ILK interagiert. Der *Proximity ligation assay* weist eine klare Interaktion zwischen Kindlin-1 und ILK in COLXVI Klonen nach (Abb. 10). Dies wird durch Co-Immunpräzitationsexperimente mit Kindlin-1 und ILK in Abb. 11 D bestätigt. Quantitative Analysen der ILK/Kindlin-1 Interaktionen zeigen, dass diese Interaktion abhängig von der Kollagen XVI Dosis ist: In COLXVI Klonen mit hoher Kollagen XVI Dosis (COLXVI Klon High) ist eine höhere Anzahl an ILK/Kindlin-1 Interaktionen zu beobachten (1,5 Interaktionen/Zelle) als in COLXVI Klonen mit geringer Kollagen XVI Sezernierung (COLXVI Klon Low; 1 Interaktion/Zelle) (Abb. 11 A). Bei Mock Kontrollen sind nur sehr schwache bis keine ILK/Kindlin-1 Interaktionen zu detektieren (0,3 Interaktionen/Zelle).

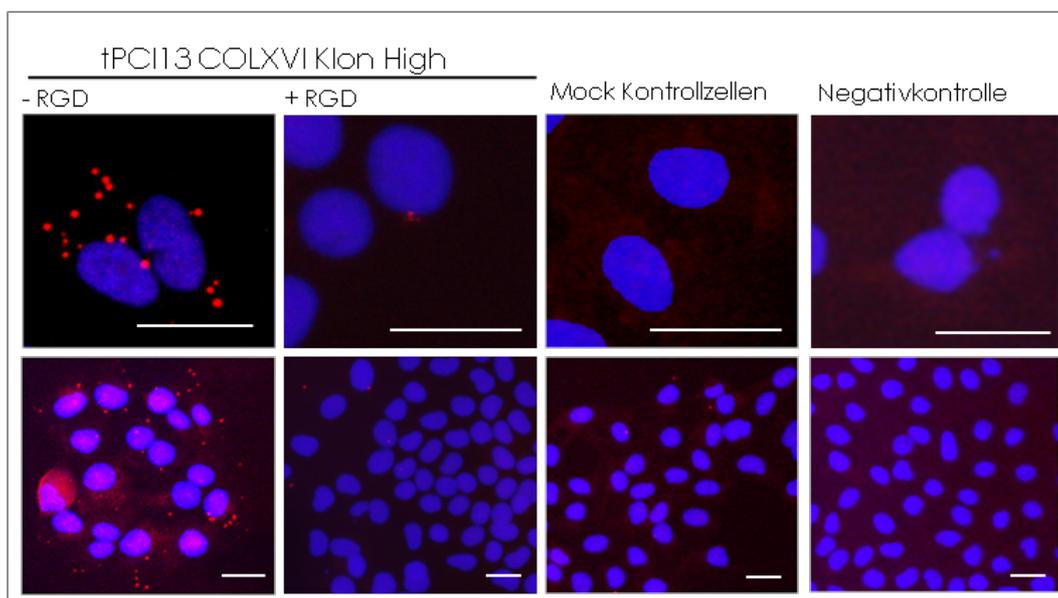


Abb. 10: Kollagen XVI Überexpression induziert ILK/Kindlin-1 Interaktion

Proximity ligation assay (PLA) von Kindlin-1 und ILK in COLXVI Klonen und Mock Kontrollen zur Analyse der ILK/Kindlin-1 Interaktion (400x Vergrößerung). Die obere Reihe zeigt exemplarische Bildausschnitte aus Fluoreszenzaufnahmen mit 400x Vergrößerungen (Die Messskala entspricht 50 µm). In der unteren Reihe sind Fluoreszenzaufnahmen mit einer 200x Vergrößerung zu sehen (Messskala entspricht 50 µm). Jeder rote Punkt zeigt die Interaktion zwischen ILK und Kindlin-1. COLXVI Klone weisen eine höhere ILK/Kindlin-1 Interaktion auf als Mock Kontrollen. Nach Inhibierung der fokalen Adhäsionsbildung mit löslichen RGD-Peptiden (c=0,1 mg/ml) ist eine deutliche Reduktion der Interaktionen zu sehen.

Die Lokalisierung der Interaktionen lässt vermuten, dass ILK und Kindlin-1 vor allem an fokalen Adhäsionskontakten miteinander interagieren. Diese Annahme wird durch Inhibition der Bildung von fokalen Adhäsionskontakten durch lösliche RGD-Peptide bestätigt: Nach einer 24-stündigen Inhibition mit 0,1 mg/ml RGD-Peptiden lässt sich ein Rückgang der ILK/Kindlin-1 Interaktionen beobachten (Abb. 10 erste und zweite Spalte). Die Auswertung zeigt eine signifikante Abnahme der ILK/Kindlin-1 Interaktion nach Inkubation mit löslichen RGD-Peptiden (Abb. 11 C; $n \geq 9$; $p < 0,01$). Zusätzlich führt eine Inhibition der fokalen Adhäsionskontakte zu einer dosisabhängigen Reduktion der *MMP9* Genexpression (Abb. 11 C). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kollagen XVI vermittelte *MMP9* Expression in OSCC Zellen durch die verstärkte Bildung von fokalen Adhäsionskontakten hervorgerufen werden kann. Des Weiteren kommt es in Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen an fokalen Adhäsionskontakten zur gesteigerten ILK/Kindlin-1 Interaktion.

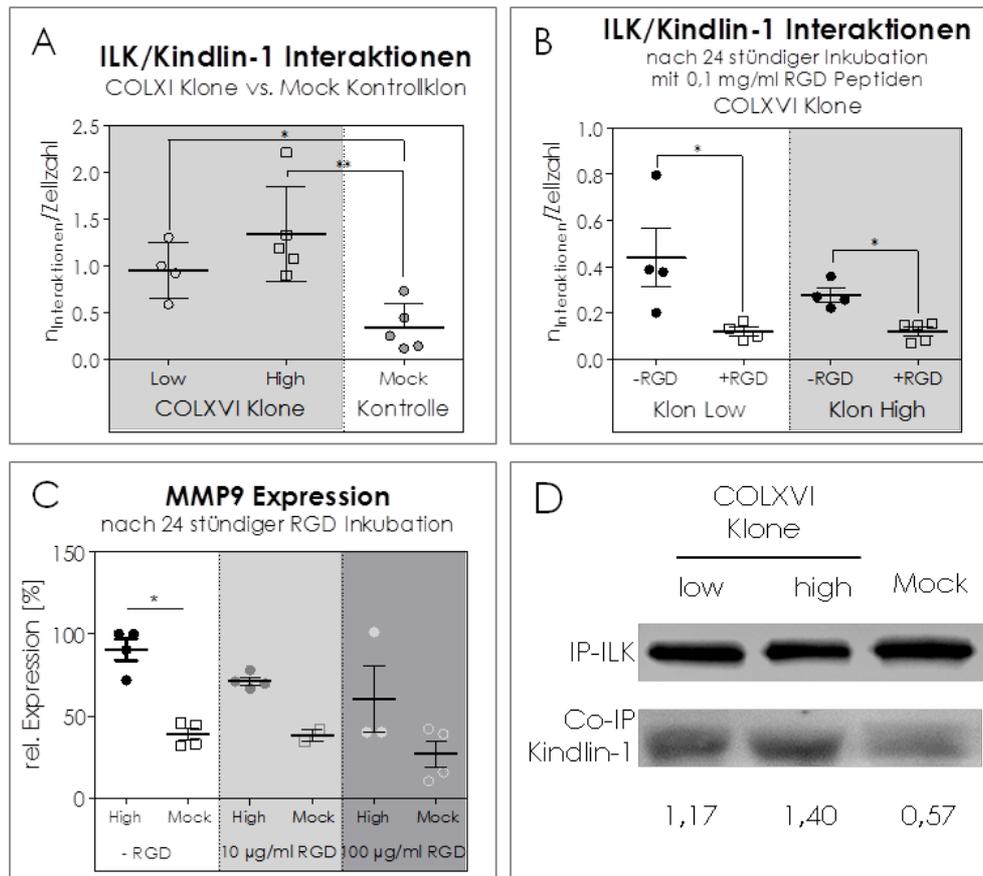


Abb. 11: ILK/Kindlin-1 Interaktion induziert MMP9 Expression

A. Quantifizierung der ILK/Kindlin-1 Interaktionen aus Abb. 17. Es ist eine signifikante Erhöhung der ILK/Kindlin-1 Interaktionen bei COLXVI Klonen im Vergleich zu Mock Kontrollen messbar ($n=100$, *: $p<0,05$; **: $p<0,01$). **B.** Quantifizierung der ILK/Kindlin-1 Interaktionen nach 24-stündiger Inhibition der fokalen Adhäsionskontakte mit löslichen RGD-Peptiden ($c=0,1$ mg/ml) bei COLXVI Klon High und Low. Nach Inhibition mit RGD-Peptiden ist eine deutliche Reduktion der ILK/Kindlin-1 Interaktion nachweisbar ($n\geq 9$; $p<0,01$). **C.** Quantitative Taqman® PCR zum Nachweis der *MMP9* Genexpression bei COLXVI Klon High und Mock Kontrollklon nach 24-stündiger Inhibition der fokalen Adhäsionsbildung mit löslichen RGD-Peptiden. Nach Inhibition mit RGD-Peptiden ist eine deutliche Reduktion der *MMP9* Expression nachweisbar ($n=3$; $p<0,05$). **D.** Co-Immünpräzipitation mit ILK und Kindlin-1. COLXVI Klone High und Low weisen eine stärkere ILK/Kindlin-1 Interaktion auf als der Mock Kontrollklon.

III.1.6. Die AP-1 Bindestelle bei -98 bp im Promotor ist wichtig für die Kollagen XVI induzierte MMP9 Expression

Zur Identifikation der MMP9 Promotorregion, die eine wichtige Rolle bei der Kollagen XVI induzierten Hochregulierung spielt, wurden verschieden lange MMP9 Promotorfragmente (90 bp, 530 bp, 930 bp) in einen Luziferase-Reportervektor vor das Reporterogen kloniert (Abb. 12) und anschließend in COLXVI Klone und Mock Kontrollklone transfiziert. Die Promotoraktivität der verschiedenen Fragmente in den unterschiedlichen Klonen wurde mit Hilfe eines Luziferase Aktivitätsassays ermittelt. Im Allgemeinen lässt sich in allen durchgeführten Luziferase Aktivitätsassays bei COLXVI Klonen, verglichen mit Mock Kontrollen, eine erhöhte MMP9 Promotoraktivität nachweisen (Abb. 12 B).

Beim Vergleich der Promotoraktivität zwischen den Reportervektoren zeigen Luziferase Aktivitätsassays, in denen Reportervektoren mit den längeren MMP9 Promotorfragmenten (530 bp und 930 bp) eingesetzt wurden, eine deutlich höhere MMP9 Promotoraktivität als Assays mit dem 90 bp MMP9 Promotorvektor.

In COLXVI Klonen, die eine hohe Kollagen XVI Expression aufweisen (COLXVI High), werden Luziferase-Reportervektoren mit den MMP9 Promotorfragmenten der Länge 530 bp und 930 bp wesentlich stärker aktiviert als in den COLXVI Klonen mit niedriger Kollagen XVI Expression (COLXVI Klon Low). Die COLXVI Klonen besitzen eine vierfach erhöhte Promotoraktivität gegenüber den Mock Kontrollzellen, während COLXVI Low Klone nur eine zwei- bis dreifach erhöhte Promotoraktivität besitzen (Abb. 12 B).

Das 930 bp lange Promotorfragment enthält zwei Bindestellen für den Transkriptionsfaktor AP-1 (Abb. 12, MMP9 c Promotor), das 530 bp lange eine AP-1 Bindestelle (Abb. 12, MMP9 b Promotor) und das 90 bp lange Fragment enthält keine AP-1 Bindestelle (Abb. 12, MMP9 a Promotor). Da die Luziferase Aktivitätsassays mit Vektoren, die die zwei längeren MMP9 Promotorfragmente enthalten, eine deutlich höhere Aktivität aufweisen als Assays mit dem 90 bp MMP9 Promotorvektor, liegt der Verdacht nahe, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 an der Hochregulierung der MMP9 Expression beteiligt ist. Zusätzlich steigt die Promotoraktivität des Reportervektors, der das 930 bp lange Fragment enthält, verglichen mit der Aktivität des 530 bp MMP9 Promotorvektors nur gering an. Daraus

lässt sich schließen, dass vor allem die AP-1 Bindestelle im Promotorbereich bei -98 bp während der Kollagen XVI induzierten *MMP9* Expression von Bedeutung ist. Zum Nachweis dieser Hypothese wurde die AP-1 Bindestelle im 530 bp langen *MMP9* Promotorfragment deletiert (Abb. 12 C). Ein anschließender Luziferase Aktivitätsassay mit dem Deletionsvektor und seinem korrespondierenden intakten *MMP9* Promotorvektor (530 bp) verdeutlicht den Einfluss der AP-1 Bindestelle an Position -98 bp. So hat die Deletion der AP-1 Bindestelle eine deutlich geminderte Promotoraktivität zur Folge (Abb. 12 D). Dies weist darauf hin, dass die AP-1 Bindestelle an Position -98 bp des *MMP9* Promotors essentiell für die Hochregulierung der *MMP9* Promotoraktivität nach Kollagen XVI Überexpression ist.

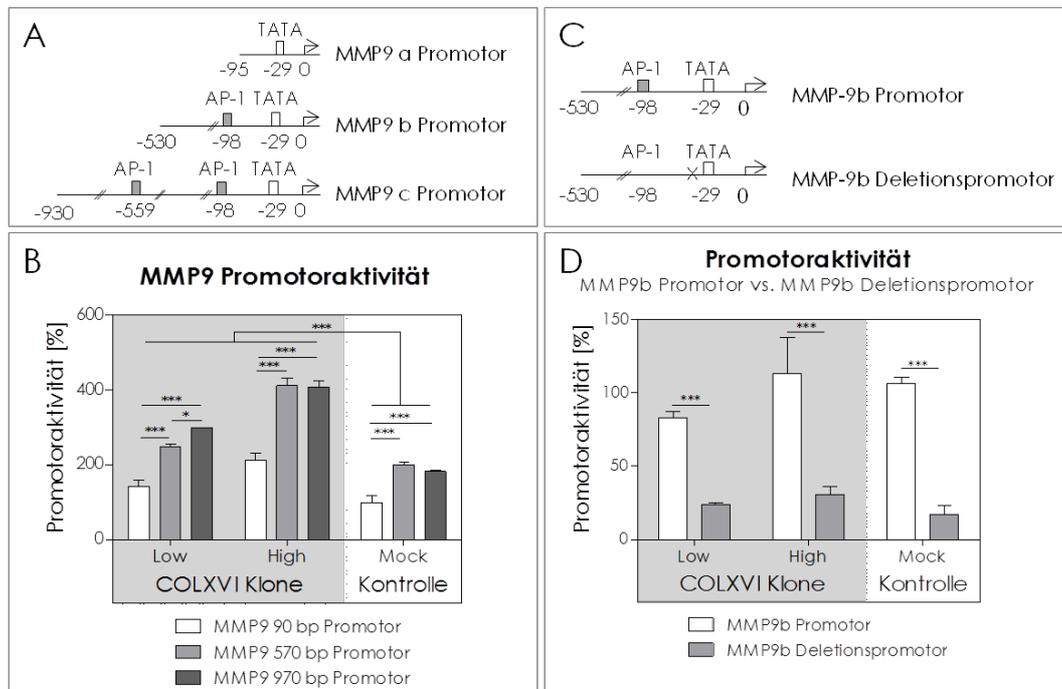


Abb. 12: Promotoraktivität der jeweils unterschiedlich langen MMP9 Promotorfragmente

A. Schematische Darstellung der unterschiedlich langen MMP9 Promotorfragmente. Das MMP9a Fragment ist 90 bp lang und enthält keine AP-1 Bindestelle, das MMP9b Fragment ist 530 bp lang und enthält eine AP-1 Bindestelle und das MMP9c Fragment ist 930 bp lang und enthält zwei AP-1 Bindestellen. **B.** Luziferase Aktivitätsassay zum Nachweis der Promotoraktivität der verschiedenen, in Reportervektoren klonierten Promotorfragmente in COLXVI Klonen verglichen mit dem Mock Kontrollklon. COLXVI Klonen zeigen bei allen drei Reportervektoren (weiß, hellgrau und dunkelgrau) eine höhere MMP9-Promotoraktivität als in den Mock Kontrollen ($n=3$; $p<0,001$). Der Vektor mit dem 530 bp langen MMP9 Promotorfragment weist in allen Zellen eine höhere Promotoraktivität auf als der Vektor mit dem kurzen, 90 bp langen MMP9 Promotorfragment ($n=3$; $p<0,001$). **C.** Schematische Darstellung des 530 bp langen MMP9b Promotorfragments und dessen korrespondierendes MMP9b Deletionspromotorfragment. Im MMP9b Deletionspromotor wurde die AP-1 Bindestelle an Position -98 bp deletiert. **D.** Luziferase Aktivitätsassay zum Nachweis der Promotoraktivität der verschiedenen MMP9b Reportervektoren. Zellen transfiziert mit Reportervektoren, die den Deletionspromotor (MMP9b Deletionspromotor) besitzen, weisen in Luziferase Aktivitätsassays, im Vergleich zu Zellen mit intakten MMP9b Promotorvektoren eine klar reduzierte MMP9 Promotoraktivität auf ($n=3$; $p<0,001$).

III.1.7. Kollagen XVI überexprimierende OSCC Zellen weisen eine Interaktion von c-Fos und Dyskerin zusammen mit einer erhöhten JunB Lokalisation im Kern auf

AP-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor. Eine seiner Untereinheiten wird häufig von Proteinen der Fos-Familie gestellt, die zweite Untereinheit gehört häufig zur Familie der Jun-Proteine (Eferl and Wagner, 2003). Es ist bekannt, dass c-Fos in Zusammenhang mit der MMP9 Expression steht (Crowe and Brown, 1999). Da unsere Promotoraktivitätsstudien auf eine Beteiligung von AP-1 an der durch Kollagen XVI induzierten MMP9 Expression in OSCC Zellen hinweisen, wurde die Proteinexpression von c-Fos zwischen COLXVI Klonen und Mock Kontrollen verglichen. Western Blot Analysen von Kernextrakten aus COLXVI Klonen und Mock Kontrollen zeigen keinen Unterschied in der c-Fos Expression (Abb. 13 A). Diesen Befund untermauern auch Immunfluoreszenzfärbungen; deren Quantifizierung zeigt ebenfalls keinen Unterschied in der nukleären Lokalisation von c-Fos zwischen COLXVI Klonen und Mock Kontrollklonen (Abb. 13 B).

Weiterhin wurden c-Fos Interaktionspartner durch Immunpräzipitation mit anschließender reduzierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silbergefärbung untersucht. Dabei unterscheiden sich COLXVI Klone von Mock Kontrollklonen durch eine deutlich erkennbare Proteinbande mit einem molekularen Gewicht von 58 kDa (Abb. 13 C). Massenspektrometrische Untersuchungen identifizierten diese Proteinbande als Isoform 3 von Dyskerin. Co-Immunpräzipitationsexperimente bestätigten Dyskerin als Interaktionspartner von c-Fos in COLXVI Klonen (Abb. 13 D). COLXVI Klone zeigen dabei, verglichen mit Mock Kontrollen, eine verstärkte c-Fos/Dyskerin Interaktion. Des Weiteren weisen Western Blot Analysen von Kernextrakten eine stark erhöhte nukleäre Lokalisation von Dyskerin in COLXVI Klonen nach. Im Vergleich dazu exprimieren Mock Kontrollen kaum nukleäres Dyskerin (Abb. 13 E). Immunfluoreszenzfärbungen von Dyskerin in COLXVI Klonen und Mock Kontrollen untermauern diesen Befund und zeigen die verstärkte Dyskerinlokalisierung (rot) in Zellkernen von COLXVI Zellen verglichen mit Mock Kontrollzellen (Abb. 13 F).

Die Analyse von Kernextrakten mittels Western Blot offenbart eine klar gesteigerte nukleäre Expression von JunB in COLXVI Klonen (Abb. 13 A).

Immunfluoreszenzfärbungen und deren Quantifizierung bestätigen diesen Befund (Abb. 13 G). So weisen COLXVI Klone auch hier eine signifikante Erhöhung der nukleären JunB Lokalisation gegenüber Mock Kontrollen auf. Diese Ergebnisse zeigen einen klaren Unterschied der AP-1 Expression und deren Interaktionspartnern zwischen COLXVI Klonen und Mock Kontrollen.

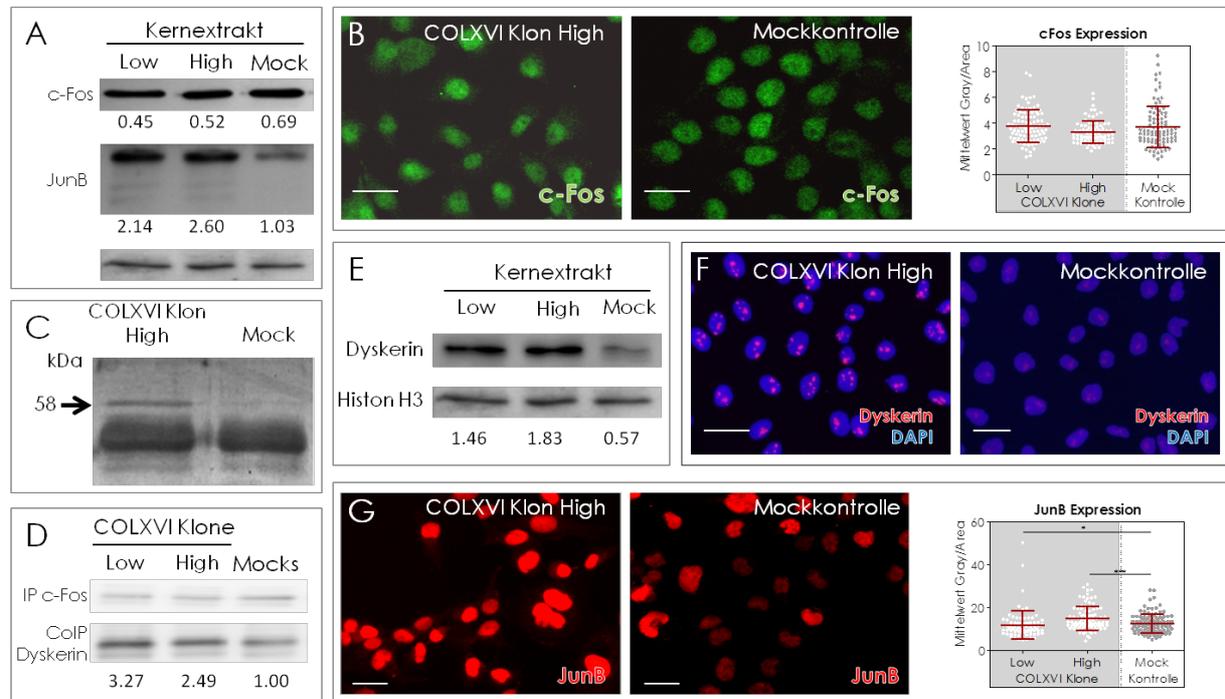


Abb. 13: Kollagen XVI Überexpression führt zu einer Interaktion von c-Fos mit Dyskerin und induziert eine verstärkte nukleäre Lokalisation von JunB

A. Western Blot Analyse von Kernextrakten zum Nachweis von c-Fos und JunB bei COLXVI Klonen und Mock Kontrollen. Es zeigt sich eine verstärkte nukleäre Expression von JunB bei COLXVI Klonen verglichen mit den Mock Kontrollen. Zwischen COLXVI Klonen und Mock Kontrollen ist kein Unterschied in der nukleären c-Fos Expression nachweisbar. **B.** Immunfluoreszenzfärbung von c-Fos in COLXVI Klonen und Mock Kontrollen (400x Vergrößerung, Messskala entspricht 50 μ m, grün: c-Fos). Auch hier ist kein Unterschied in der c-Fos Expression sichtbar. Zur Quantifizierung wurde die Intensität der Fluoreszenz von je 100 Zellen von COLXVI Klonen und Mock Kontrollen gemessen. **C.** Silbergefärbung einer Immunpräzipitation von c-Fos. Der COLXVI Klon weist eine deutliche 58 kDa Bande auf. Massenspektrometrische Untersuchungen identifizierten diese Proteinbande als Dyskerin. **D.** Co-Immunpräzipitation von c-Fos und Dyskerin aus Proteinextrakten von COLXVI Zellen und Mock Kontrollzellen. Es zeigt sich in COLXVI Klonen, verglichen mit Mock Kontrollklonen, eine verstärkte c-Fos/Dyskerin Interaktion. **E.** Western Blot Analyse zum Nachweis von Dyskerin in Kernextrakten. COLXVI Klone weisen im Vergleich zu Mock Kontrollen eine erhöhte nukleäre Expression von Dyskerin auf. **F.** Immunfluoreszenzfärbung von Dyskerin in COLXVI Klonen und Mock Kontrollen (400x Vergrößerung, Messskala entspricht 50 μ m, rot: Dyskerin, blau: DAPI). COLXVI Klone weisen eine erhöhte nukleäre Expression von Dyskerin auf. **G.** Immunfluoreszenzfärbung von JunB in COLXVI Klonen und Mock Kontrollen (400x Vergrößerung, Messskala entspricht 50 μ m, rot: JunB). COLXVI Klone weisen eine erhöhte nukleäre JunB Expression auf. Die semiquantitative Analyse der Fluoreszenzintensität belegt eine signifikante Erhöhung der nukleären JunB Expression in COLXVI Klonen verglichen mit Mock Kontrollen (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$).

III.1.8. Inhibition des AP-1 führt zur Reduktion der MMP9 Genexpression

Zur Bestätigung der AP-1 Beteiligung an der Kollagen XVI induzierten MMP9 Expression wurde die Dimerisierung von AP-1 mit Tanshinone II A verhindert und damit die AP-1 Aktivierung inhibiert. Wie in Abbildung Abb. 14 zu sehen ist, führt die 24-stündige AP-1 Inhibition zu einer signifikanten Reduktion der *MMP9* Genexpression in COLXVI Klonen. Die *MMP9* Genexpression der Mock Kontrolle sinkt dagegen nicht.

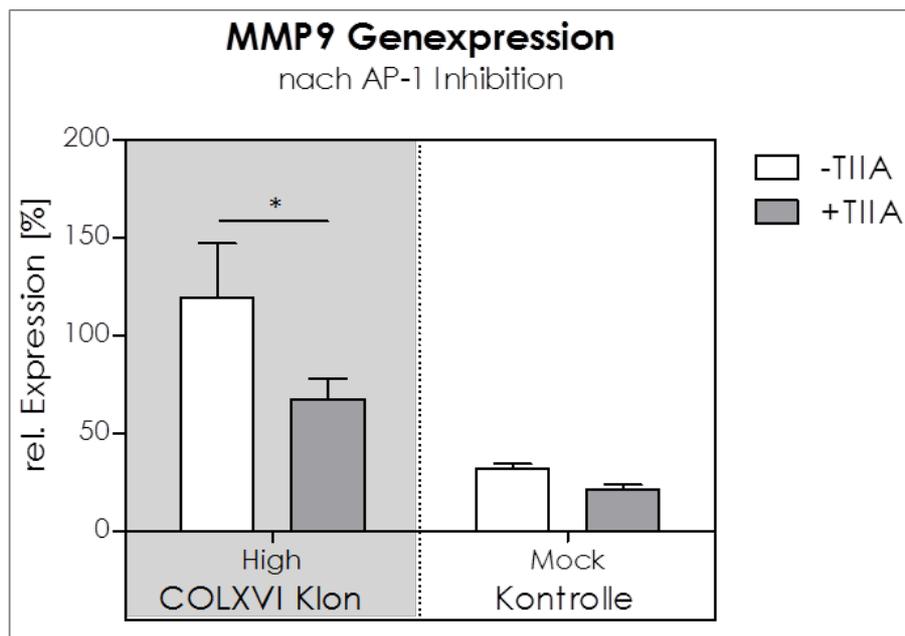


Abb. 14: Inhibition der AP-1 Dimerisierung

Quantitative Taqman® PCR zum Nachweis der *MMP9* Genexpression bei COLXVI Zellen und Mock Kontrollen nach 24-stündiger Inhibition der AP-1 Dimerisierung mit Tanshinone II A (TIIA). Nach Inhibition mit TIIA kommt es zu einer signifikanten Abnahme der *MMP9* Genexpression in COLXVI Zellen ($n = 3$; $p < 0,05$). Dagegen ist keine signifikante Reduktion der *MMP9* Gen-expression in Mock Kontrollen zu beobachten.

III.1.9. Kollagen XVI Überexpression führt zu einer gesteigerten Invasion von OSCC Zellen

Eine erhöhte MMP9 Expression ist in vielen Tumoren mit einer verstärkten Invasion der Tumorzellen assoziiert (Xu et al., 2010). Daher wurde anschließend analysiert, ob eine Kollagen XVI Überexpression zur gesteigerten Invasion von OSCC Zellen

führt. Zur Analyse der Invasion wurden 3D *Micromass* Pellets von COLXVI Zellen und Mock Kontrollen in partiell degradiertes Kollagen I Gel eingebettet. Nach 48-stündiger Kultivierung zeigen COLXVI Zellen eine signifikant größere Invasionszone als Mock Kontrollklone ($p < 0,001$). Zudem erscheinen die Kernbereiche der 3D *Micromass* Pellets der COLXVI Klone, verglichen mit denen der Mock Kontrollklone, wesentlich diffuser (Abb. 15 A). Des Weiteren wurde untersucht, ob exogenes Kollagen XVI eine Invasion der OSCC Zellen begünstigt. Dazu wurde bei der Generierung der 3D *Micromass* Pellets der Mock Kontrollzellen rekombinantes Kollagen XVI in einer Konzentration von 500 ng/ml zugegeben. Nach 48-stündigem Wachstum auf partiell degradiertem Kollagen I Gel weisen die in Kollagen XVI inkubierten 3D *Micromass* Pellets der Mock Kontrollklone eine größere Invasionszone auf als Mock Kontrollklone, die nicht mit rekombinantem Kollagen XVI behandelt wurden. Diese Ergebnisse belegen, dass sowohl die Überexpression von Kollagen XVI als auch exogen appliziertes rekombinantes Kollagen XVI die Invasion von OSCC Zellen begünstigt.

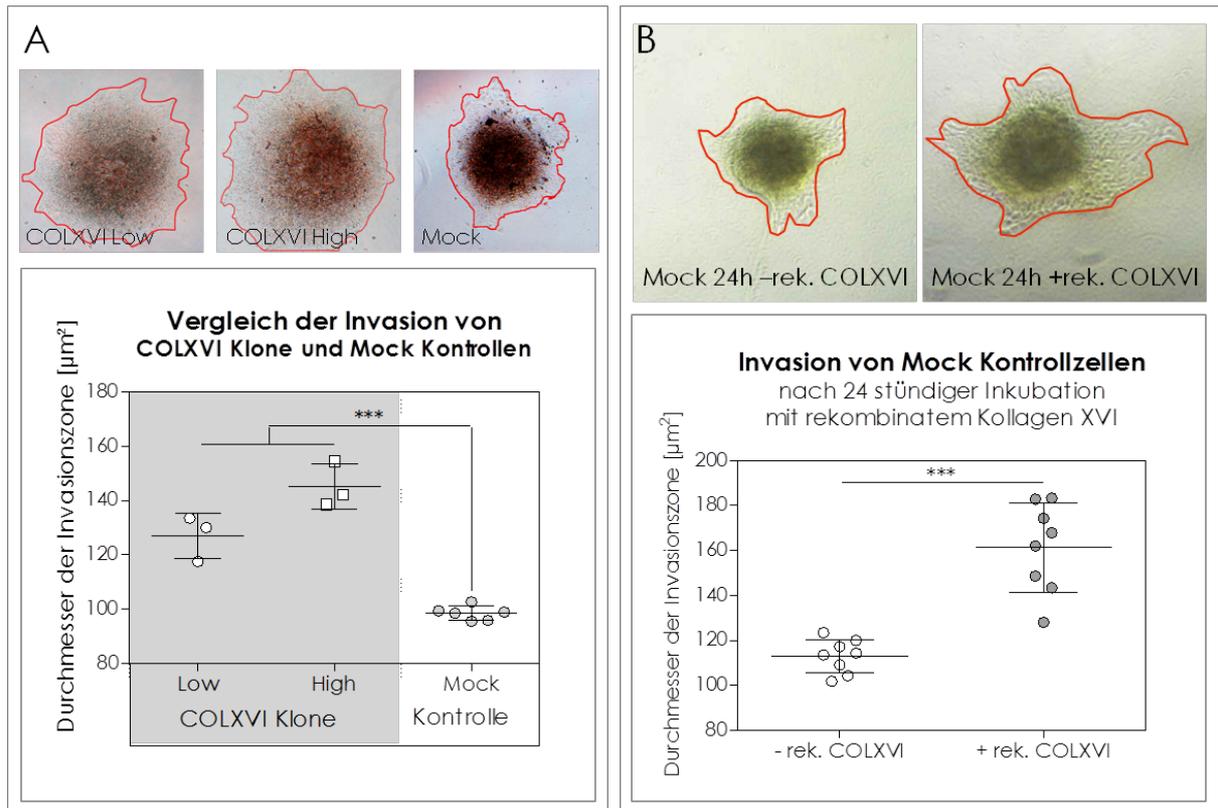


Abb. 15: Kollagen XVI Überexpression und Applikation von rekombinatem Kollagen XVI führen zur verstärkten Invasion von OSCC Zellen

A. 3D *Micromass* Pellets von COLXVI Klonen verglichen mit 3D *Micromass* Pellets aus Mock Kontrollzellen nach 24-stündigem Wachstum auf partiell degradiertem Kollagen I Gel. COLXVI Klonen besitzen eine signifikant größere Invasionszone (orange Linie) als Mock Kontrollklone ($n = 10$; $p < 0,01$). Zusätzlich erscheinen die Kernbereiche der COLXVI-*Micromass* Pellets, wesentlich diffuser als die Kernbereiche der Mock Kontroll-*Micromass* Pellets. **B.** Vergleich von Mock Kontroll-*Micromass* Pellets, die während der Bildung der Pellets mit 500 ng/ml rekombinatem Kollagen XVI (+rek. COLXVI) behandelt wurden oder als Kontrolle ohne Zugabe von rekombinatem Kollagen XVI hergestellt wurden (-rek. COLXVI). Im Vergleich zu den Kontrollen weisen Mock Kontrollklone, die mit rekombinatem Kollagen XVI behandelt wurden (+rek. COLXVI), nach 24-stündiger Kultivierung auf partiell degradiertem Kollagen I Gel eine signifikant größere Invasionszone auf (orangene Linie; $n = 8$; $p < 0,001$).

III.1.10. Zusammenfassung Teil I

In diesem Teil der Dissertation wurde mit Hilfe der Überexpression von Kollagen XVI in der OSCC-Tumorzelllinie PCI13 (COLXVI Zellen) der Einfluss von Kollagen XVI auf die Invasion und das Zellwachstum des oralen Plattenepithelkarzinoms untersucht. Dabei führte eine Überexpression von Kollagen XVI in OSCC Zellen zu einer verstärkten *MMP9* Genexpression und *MMP9* Sekretion. Anschließend wurde der dafür verantwortliche Signalweg ermittelt und präzisiert: Nach der Kollagen XVI vermittelten Aktivierung der Zelloberflächenrezeptoren Integrin $\beta 1$ und $\beta 2$ (Ratzinger

et al., 2011) kommt es zur Aktivierung der ILK in den COLXVI Zellen und zur verstärkten Interaktion von ILK mit Kindlin-1 in Bereichen fokaler Adhäsionskontakte. Dies führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der Akt/PKB. Des Weiteren deckten Promotoruntersuchungen eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 bei der Kollagen XVI induzierten Hochregulierung der MMP9 Expression auf. Zu diesen Ergebnissen entstand bereits eine Publikation in einer international anerkannten wissenschaftlichen Fachzeitschrift (Bedal et al., 2014). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Kollagen XVI die Invasion der OSCC Zellen verstärkt.

III.2. TEIL 2:

Die NC11-Domäne von Kollagen XVI induziert vaskuläre Mimikry in OSCC Zellen

Wie schon im ersten Teil dieser Dissertation gezeigt wurde, findet man in Zellkulturüberständen von Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen neben anderen trunkierten Formen auch verstärkt die lösliche NC11-Domäne von Kollagen XVI. Die NC11-Domäne bildet den globulären Kopf von Kollagen XVI, ist verglichen mit den übrigen NC-Domänen von Kollagen XVI mit 312 Aminosäuren relativ groß und besitzt sowohl eine TSPN Domäne als auch eine PARP Region. Des Weiteren enthält sie zwei Konsensussequenzen für eine N-Glykosylierung. Zudem ist die NC11-Domäne resistent gegen den proteolytischen Abbau neutraler Proteasen wie beispielsweise Trypsin (Tillet et al., 1995; Kassner et al., 2004).

Die kontrollierte Proteolyse von Makromolekülen der ECM setzt bioaktive Fragmente frei oder demaskiert kryptische Proteindomänen. Diese Fragmente besitzen meist spezifische, von ihren Ursprungproteinen verschiedene, bioaktive Eigenschaften und werden entweder als Matrikine oder Matrikryptine bezeichnet. Eine Vielzahl dieser Matrikryptine und Matrikine beeinflussen Wachstum und invasive Eigenschaften von Tumoren (Tran et al., 2005; Ricard-Blum, 2011a; Ricard-Blum and Salza, 2014)(Tran et al., 2005; Ricard-Blum, 2011a)(Tran et al., 2005; Ricard-Blum, 2011a)(Tran et al., 2005; Ricard-Blum, 2011).

Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil dieser Arbeit der Einfluss der NC11-Domäne von Kollagen XVI auf die Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms analysiert. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse aus dieser Untersuchung vorgestellt.

III.2.1. Die Überexpression der NC11-Domäne von Kollagen XVI in der OSCC Zelllinie PCI13

Um den Einfluss der NC11-Domäne auf die Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms zu untersuchen, wurde die NC11-Domäne mit Hilfe eines Überexpressionsvektors mit kodierender Gensequenz der NC11-Domäne in der OSCC Zelllinie PCI13 überexprimiert. Da die Zelllinie PCI13 kein endogenes

Kollagen XVI exprimiert, wurde sie als Modell für unsere Analysen ausgesucht. Zur besseren Lokalisation und Detektion des Proteins wurde mit Hilfe eines GFP-Reportersystems ein NC11-GFP Fusionsprotein generiert wobei GFP an das C-terminale Ende der NC11-Domäne kloniert wurde. Es wurden drei NC11-GFP überexprimierende Zellklone (NC11-GFP Klon 1-3) und zwei Kontrollklone (Mock 1 und 2) mit Leervektor hergestellt, die nur GFP exprimieren. Das Fusionsprotein NC11-GFP besitzt ein molekulares Gewicht von 64 kDa. Anschließende Proteinexpressionsanalysen weisen eine hohe endogene Expression des Fusionsproteins NC11-GFP und eine schwächere Sezernierung des NC11-GFP Proteins in den NC11-GFP Klonen 1 bis 3 auf (siehe Abb. 16). Mock Kontrollklone exprimieren dagegen nur GFP mit einem Molekulargewicht von 30 kDa (Abb. 16).

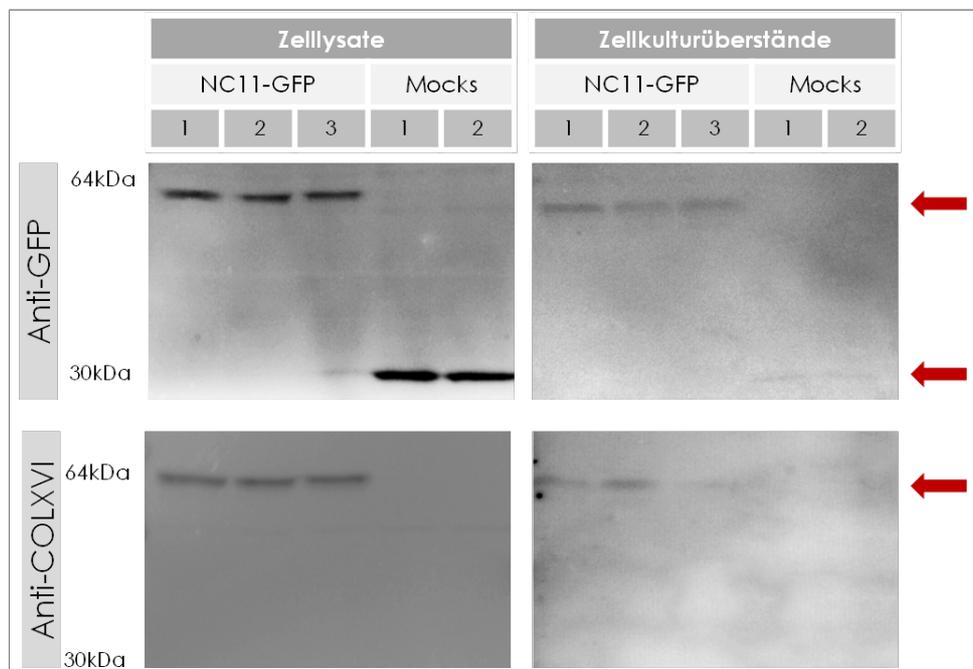


Abb. 16: Proteinexpression und Sezernierung des Fusionsproteins NC11-GFP in der OSCC Zelllinie PCI13

Western Blot Analyse von Zellkulturüberständen und Zelllysaten der NC11-GFP Zellklone mit einem GFP-Antikörper (Anti-GFP; erste Zeile) und mit Hilfe des Kollagen XVI Antikörpers (Anti COLXVI; zweite Zeile). In allen drei tPCI13 NC11-GFP Zellklonen kann sowohl in Zelllysaten als auch in Zellkulturüberständen GFP und die NC11-Domäne von Kollagen XVI nachgewiesen werden. In den Mock Kontrollklonen kann GFP mit einem molekularen Gewicht von 30 kDa in Zelllysaten und schwach in Zellkulturüberständen nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie konnte das Fusionsprotein NC11-GFP in NC11-GFP Klonen und das GFP in den Mock Kontrollklonen detektiert werden. Das NC11-GFP Fusionsprotein ist vor allem an der Zellmembran (weißer

Pfeil) und an zytoplasmatischen Strukturen (roter Pfeil) der NC11-GFP Klone lokalisiert. Im Gegensatz dazu sammelt sich das GFP-Protein der Mock Kontrollklone im Zellkern an (Abb. 17).

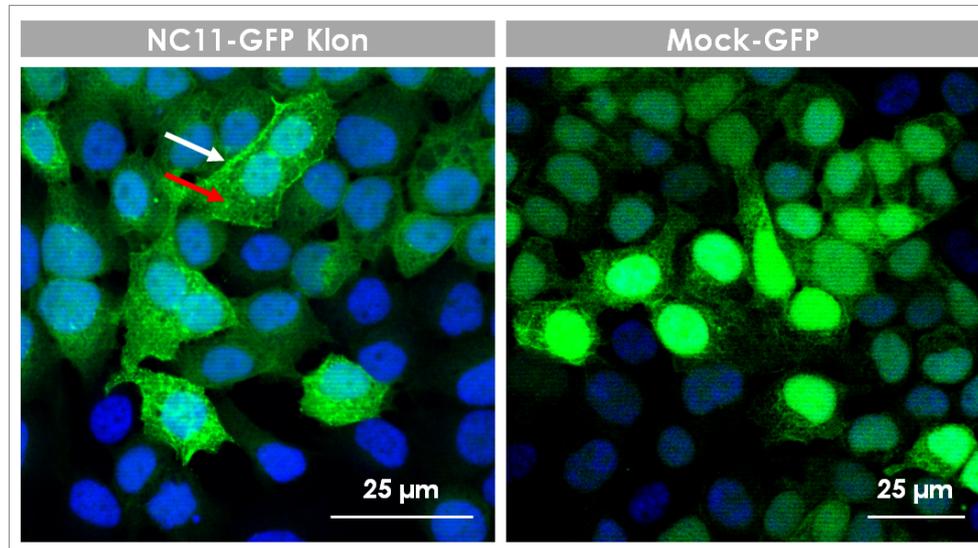


Abb. 17: Lokalisierung des Fusionsproteins NC11-GFP und des GFPs in OSCC Zellen
Fluoreszenzaufnahme von NC11-GFP und GFP in NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen mit konfokaler Laserscanmikroskopie (400x Vergrößerung). Das Fusionsprotein NC11-GFP ist in den NC11-GFP Zellen sowohl im Zytoplasma an spezifischen Strukturen lokalisiert (roter Pfeil), als auch an den Zellmembranen der OSCC Zellen (weißer Pfeil). Im Gegensatz dazu befindet sich das GFP in den Mock Kontrollzellen größtenteils im Nukleus.

III.2.2. Auswirkung der NC11-GFP Induktion in OSCC Zellen auf Zellmorphologie und zelluläre Wachstumsmuster

In Untersuchungen von NC11-GFP Klonen in 2D Kultur zeigt sich im Vergleich zu den Mock Kontrollklonen ein differenzielles Wachstumsverhalten. Bei der 2D Kultivierung bilden NC11-GFP Zellen dichte *Zellcluster*, im Unterschied dazu wachsen Mock Kontrollzellen in einem zusammenhängenden *Monolayer*.

Diese Beobachtungen legen einen Einfluss der NC11-Domäne auf die Zellform und das Wachstum der OSCC Zellen nahe.



Abb. 18: Einfluss der NC11-GFP Induktion auf Wachstumsmuster von OSCC Zellen
Durchlichtmikroskopie von NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen, die in Zellkulturflächen aus Polystyren kultiviert wurden (400x Vergrößerung). NC11-GFP Zellen bilden *Zellcluster* aus, Mock Kontrollzellen wachsen dagegen in einem zusammenhängenden Monolayer.

III.2.3. Einfluss der NC11-GFP Induktion in OSCC Zellen auf Zellgröße, Proliferation, Migration und die Fähigkeit Kolonien zu bilden

Vergleicht man die Zellgröße zwischen NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen mit Hilfe von Durchlichtmikroskopie, erweisen sich die NC11-GFP Zellen als wesentlich kleiner als Mock Kontrollzellen. Die Quantifizierung zeigt eine signifikante Abnahme der Zellgröße um fast 50% nach der NC11-GFP Expressionsinduktion in OSCC Zellen (Abb. 19 A; $p < 0,001$).

Vergleichende Untersuchungen der Zellproliferation von NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen mit Hilfe eines BrdU Assays deckten in NC11-GFP Zellen, im Vergleich zu Mock Kontrollzellen, eine signifikante, bis zu 50%ige Reduktion der Proliferationsrate auf (Abb. 19 B; $p < 0,01$).

Mit Hilfe eines Boyden-Kammer Migrationsassays können die Migrationseigenschaften der NC11-GFP Zellen mit denen der Mock Kontrollzellen verglichen werden. Dabei zeigt sich, dass die chemotaktische, migratorische Aktivität der OSCC Zellen durch eine NC11-GFP Überexpression negativ beeinflusst wird. Die Migrationsfähigkeit der OSCC Zellen verringerte sich nach NC11-GFP Induktion signifikant um fast 70% (siehe Abb. 19 C; $p < 0,05$).

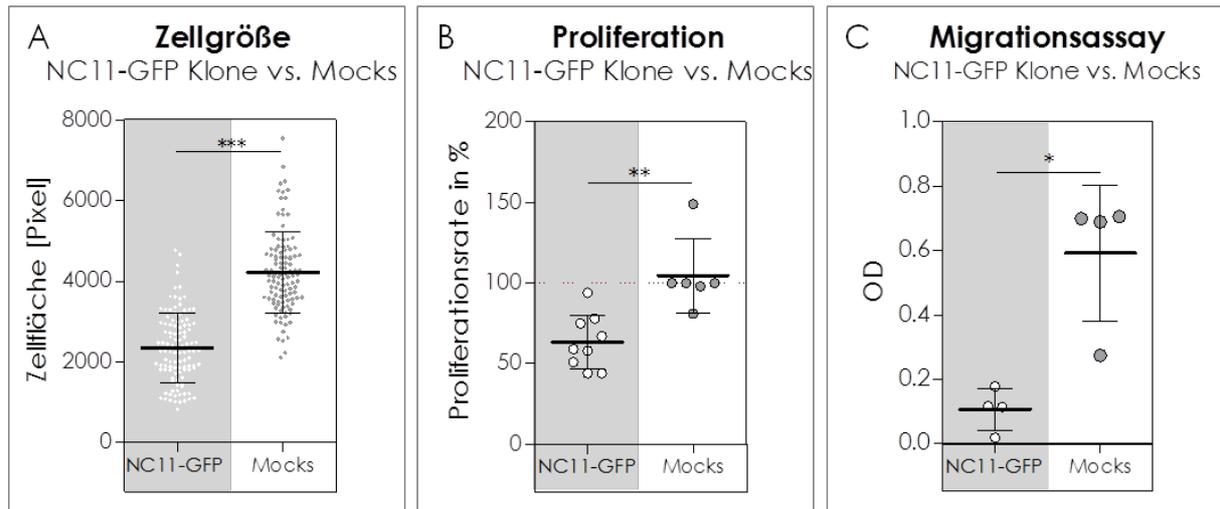


Abb. 19: Einfluss von NC11-GFP auf OSCC Zellen: Zellgröße, Proliferation und Migration

A. Größenvergleich der Zelloberfläche in Pixel. NC11-GFP Zellen sind signifikant kleiner als Mock Kontrollzellen ($n > 100$; $p < 0,001$). **B.** Vergleich der Proliferationsrate durch BrdU Assays. Die Proliferationsrate sinkt signifikant nach NC11-GFP Überexpression ($n > 5$; $p < 0,001$). **C.** Analyse der Zellmigration mit Hilfe des Boyden-Kammer Migrationsassays. Nach NC11-GFP Überexpression sinkt die Fähigkeit der Zellen zu migrieren signifikant ($n = 4$; $p < 0,05$).

In einem *Colony Forming Assay* wurde die Fähigkeit der OSCC Zellen Kolonien zu bilden, untersucht. Der *Colony Forming Assay* dient unter anderem als Indikator für den Verlust der Kontaktinhibition und für verankerungsunabhängiges Wachstum. Durch eine NC11-GFP Überexpression bilden OSCC Zellen signifikant mehr Kolonien als Mock Kontrollzellen ($p < 0,05$). Die Anzahl der kolonienbildenden Zellen erhöht sich bei NC11-GFP überexprimierenden OSCC Zellen im Vergleich zu Mock Kontrollzellen um das 3-4 fach. (siehe Abb. 20 A). Allerdings zeigt sich, dass sich die Fähigkeit der Zellen große Kolonien zu bilden sich durch eine Überexpression von NC11-GFP signifikant erniedrigte ($p < 0,05$). Nur 9% aller NC11-GFP Kolonien sind größer als 1000 Pixel, wohingegen 28% aller Mock Kolonien größer sind als 1000 Pixel (siehe Abb. 20 B und C).

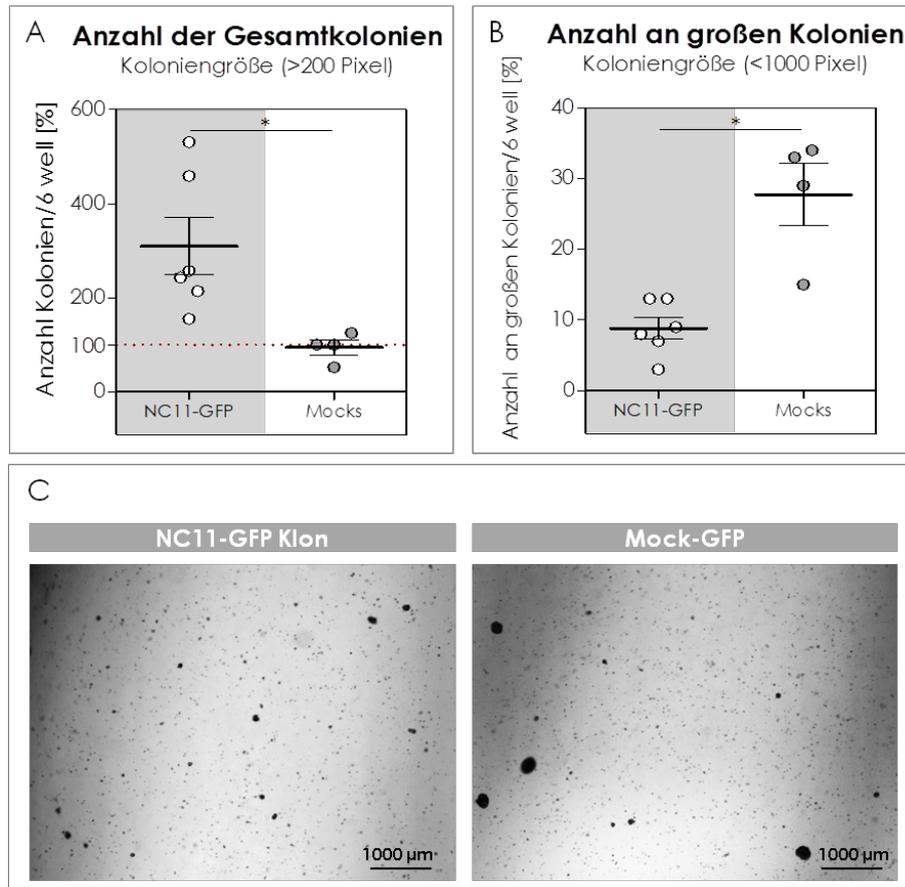


Abb. 20: Einfluss von NC11-GFP auf die Fähigkeit von OSCC Zellen Kolonien zu bilden

Colony Forming Assay zur Untersuchung des unkontrollierten, verankerungsunabhängigen Wachstums von Zellen und der Auflösung von Kontaktinhibition. **A.** Der *Colony Forming Assay* zeigt einen signifikanten Anstieg in der Anzahl der gebildeten Gesamtkolonien (> 200 Pixel) nach NC11-GFP Überexpression ($n \geq 4$; $p < 0,05$). **B.** Beim Vergleich der Anzahl großer Kolonien (> 1000 Pixel), bilden OSCC Zellen nach NC11-GFP Überexpression signifikant weniger große Kolonien als Mock Kontrollzellen ($n \geq 4$; $p < 0,05$). **C.** Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der OSCC Zellen nach dreiwöchigem Wachstum im Softagar in 20facher Vergrößerung. Auch hier ist deutlich zu sehen, dass die NC11-GFP Überexpression in OSCC Zellen die Bildung großer Kolonien verhindert (Maßstab entspricht 1000 μm).

Die Ergebnisse zeigen, dass die NC11-Domäne von Kollagen XVI sich negativ auf die Zellgröße, die Proliferation und die Migrationseigenschaften von OSCC Zellen auswirken kann. Zudem verstärkt eine Überexpression der NC11-Domäne die Fähigkeit zur kontaktunabhängigen klonalen Expansion einer einzelnen OSCC Zelle. Dagegen scheinen NC11 exprimierende Zellen ihre klonale Expansion nach einer gewissen Zeit zu stoppen, was auf eine Kontaktinhibition oder auf eine Differenzierung der Zellen schließen lässt.

III.2.4. NC11-GFP Induktion verursacht ein differenzielles Proliferationsmuster

Neben der signifikanten Reduktion der Proliferationsrate von NC11-GFP Zellen, legen Immunfluoreszenzfärbungen des Proliferationsmarker Ki67 zudem Unterschiede im Proliferationsmuster zwischen NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen offen. NC11-GFP Zellen proliferieren im Inneren der *Zellcluster* kaum, während sich Zellen im Randbereich weiter teilen. Im Gegensatz dazu findet man keine differenzielle Proliferationsaktivität der Mock Kontrollzellen bezogen auf ihre Lokalisierung im kohärenten Monolayer. Die Proliferation der Mock Kontrollen ist gleichmäßig über den Monolayer verteilt (siehe Abb. 21). Dies deutet auf eine ortsspezifische Zellorganisation hin, welche durch NC11-GFP bewirkt wird. NC11-GFP Zellen besitzen im Zellverband möglicherweise die Fähigkeit ihre Proliferation zu kontrollieren und sich anhand ihrer Lokalisation innerhalb der *Zellcluster* zu differenzieren. Diese Ergebnisse ergänzen sich zu denen des *Colony Forming Assays* aus Kapitel III.2.3. Auch hier stellen die Zellen durch Kontaktinhibition ihre Proliferation ein.

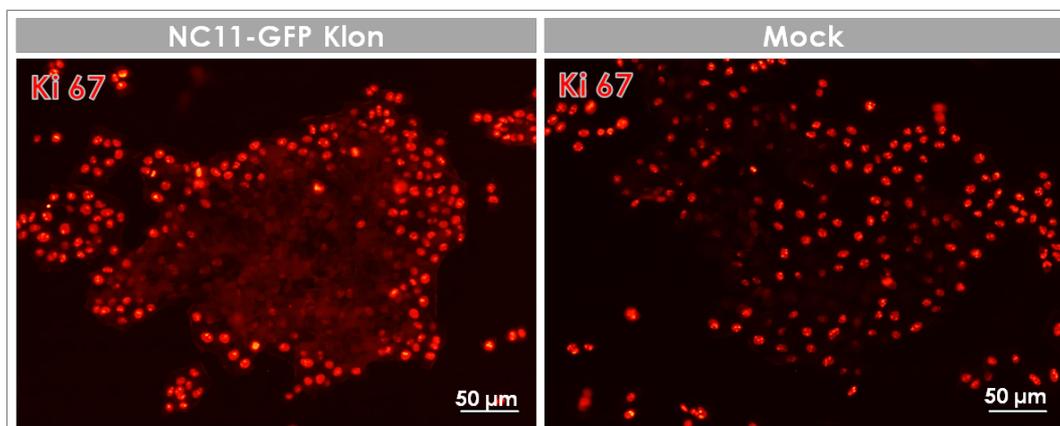


Abb. 21: Vergleich der Proliferationsmuster zwischen NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen

Immunfluoreszenzfärbung des Proliferationsmarkers Ki67 in NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen (200x Vergrößerung). NC11-GFP Zellen proliferieren lediglich in den äußeren Bereichen der Zellcluster. Im Unterschied dazu weisen Mock Kontrollzellen kein differenzielles Proliferationsmuster ausgehend von ihrer Lokalisation im kohärenten Monolayer auf.

III.2.5. NC11-GFP Überexpression beeinflusst das Wachstum in 3D Kultur auf GFR Matrigel

Die Kultivierung auf GFR Matrigel® mit 1% FKC bewirkt nach 24 oder 48 h bei NC11-GFP Zellen ein Endothel-ähnliches, netzförmiges Wachstumsmuster, wobei das Netz nach 48 h ausgeprägter ist. Im Gegensatz dazu wachsen sowohl Mock Kontrollzellen als auch Kollagen XVI überexprimierende OSCC Zellen auf GFR Matrigel® in einem dichten, kohärenten Monolayer (siehe Abb. 22). Dies deutet darauf hin, dass die NC11-Domäne von Kollagen XVI bei OSCC Zellen die Bildung von Endothel-ähnlichen, netzförmigen Wachstumsmustern der Kultivierung auf GFR Matrigel induziert. Volllänge Kollagen XVI ist dazu nur in geringem Maße in der Lage. Hier sind Netzstrukturen nur in den Randbereichen der 3D Kultur sichtbar (siehe Abb. 22, letzte Zeile).

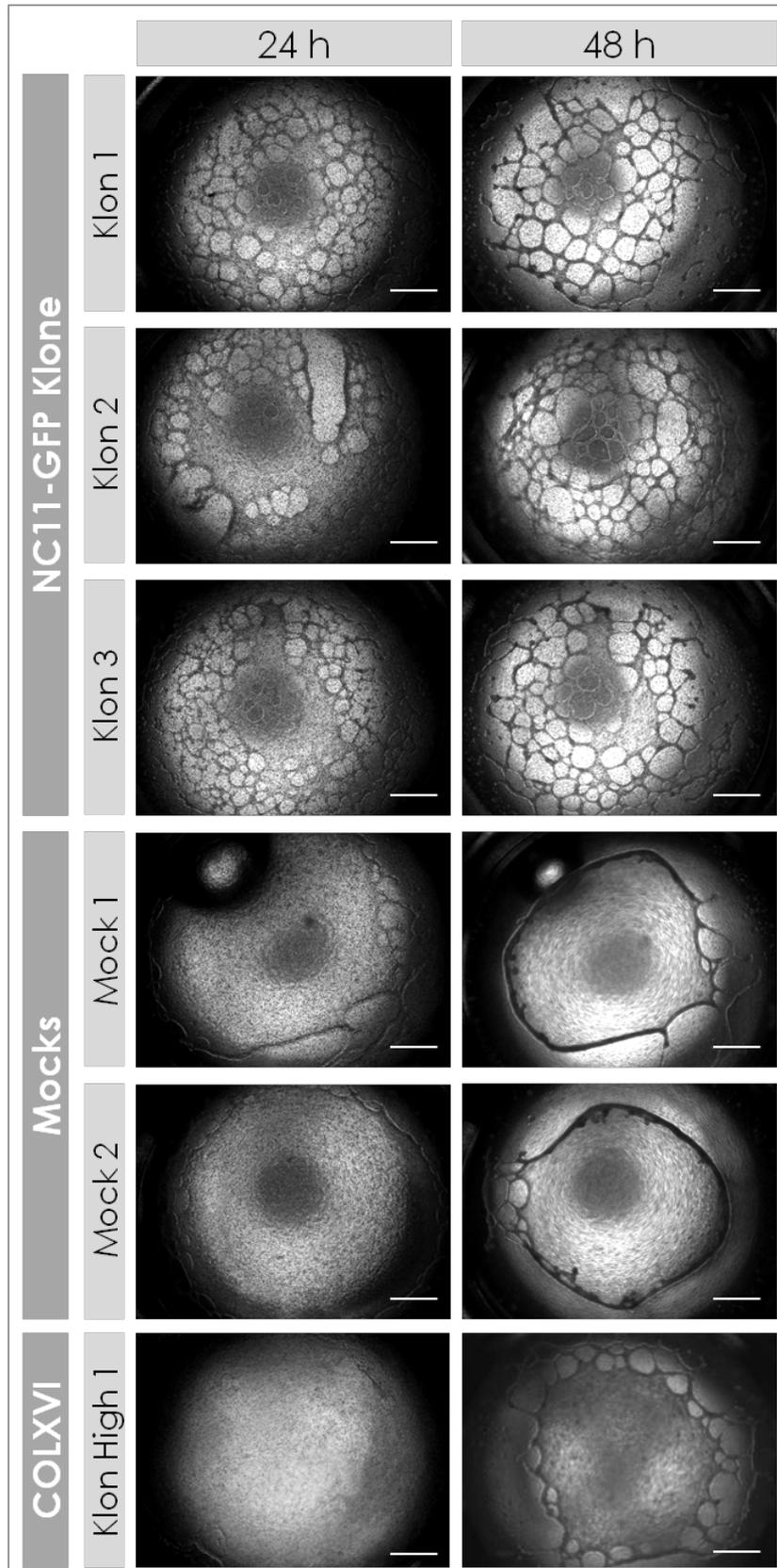


Abb. 22: Vergleich der Wachstums-muster zwischen NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen kultiviert auf GFR Matrigel®

Durchlichtmikroskopie von NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen nach 24-stündiger oder 48-stündiger Kultivierung auf GFR Matrigel® mit 1% FKC (20x Vergrößerung). NC11-GFP Zellen besitzen nach 24 h Endothel-ähnliche netzförmige Wachstums-strukturen, die sich nach einer 48-stündigen Kultivierung auf GFR Matrigel® deutlich weiter entwickelt haben. Sowohl Mock Kontrollzellen als auch COLXVI Zellen wachsen dagegen in einem dichten, kohärenten Monolayer. Der Maßstab entspricht 1000 µm.

III.2.6. Veränderte Genexpression in OSCC Zellen nach NC11-GFP Überexpression

Aufgrund der Ausbildung netzartiger Wachstumsstrukturen der NC11-GFP Zellen, welche auch Endothelzellen (z.B. HUVEC-Zellen) auf Matrigel aufweisen (siehe Abb. 22), wurde als nächster Schritt die Genexpression einiger Faktoren untersucht, die mit Endothelzellen assoziiert sind. Dabei unterschieden wir zwischen Zellen, die in Zellkulturflaschen aus Polystyren wuchsen (2D Kultivierung) und Zellen, die auf GFR Matrigel® kultiviert wurden (3D Kultivierung). Des Weiteren sollte analysiert werden, ob es Unterschiede in der Expression dieser Endothelzell- assoziierten Marker zwischen NC11-GFP überexprimierenden OSCC Zellen gibt und OSCC Zellen, welche Volllänge-Kollagen XVI überexprimieren (COLXVI Zellen). Damit sollte untersucht werden, ob eventuell beobachtbare Unterschiede zwischen Mock und NC11-GFP Zellen spezifische Eigenschaften der NC11-Domäne sind oder ob sie auch durch das Volllänge-Kollagen XVI hervorgerufen werden können.

Analysiert wurde die Genexpression von *VEGFR1* und *VEGFR2* (englisch: vascular endothelia growth factor receptor, VEGFR), *VEGF A*, *B* und *C* (englisch: *vascular endothelia growth factor*, VEGF), des *uPa Rezeptors* (englisch: Urokinase-*type plasminogen activator receptor*, uPa receptor) und des *vWF* (von Willebrand-Faktor, vWF). Bei alle untersuchten OSCC Zellen konnte keine *VEGF B* und *C* Genexpression detektiert werden.

NC11-GFP Zellen zeigen nach 48-stündiger 2D Kultivierung (erste Spalte der Abb. 23 auf Seite 85) eine signifikant erhöhte Genexpression ihres *VEGFR 1* und *uPa Rezeptors* verglichen mit Mock Kontrollzellen. Außerdem wird die Genexpression des *VEGF A* und des *vWF* in NC11-GFP Zellen im Vergleich zu Mock Kontrollzellen herunter reguliert. Allerdings können keine Unterschiede zwischen NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen in der *VEGFR 2* Genexpression nachgewiesen werden.

Nach der 48-stündigen 3D Kultivierung (zweite Spalte der Abb. 23 auf Seite 85) zeigen NC11-GFP Zellen einen starken Anstieg der Genexpression der *VEGFR 1*, *VEGFR 2* und *uPa Rezeptoren* verglichen mit der Genexpression der Mock Kontrollzellen. Dagegen ist zwischen NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen kein Unterschied mehr in der *VEGF A* Genexpression vorhanden. Die Genexpression des

vWFs in den NC11-GFP ist im Vergleich zu den Mock Kontrollzellen weiterhin signifikant reduziert.

Nach 48-stündiger 2D Kultivierung (dritte Spalte der Abb. 23 auf Seite 85) zeigen die Volllänge-Kollagen XVI überexprimierenden Zellen (COLXVI Zellen) keine differenzielle Genexpression der Endothelmarker *VEGFR 1 und 2*, *VEGF A*, *uPa Rezeptor* und *vWF* im Vergleich zur Genexpression der Mock Kontrollzellen.

Wenn COLXVI Zellen 48 h lang 3D kultiviert werden (3D Kultivierung, vierte Spalte der Abb. 23 auf Seite 85), sind keine Unterschiede in der Genexpression der getesteten Marker nachzuweisen. Zudem konnte bei diesem Experimentaufbau sowohl in COLXVI Zellen als auch in Mock Kontrollzellen keine *VEGF A* Genexpression detektiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Volllänge-Kollagen XVI die Genexpression des *VEGFR 1 und 2*, des *VEGF A*, des *uPa Rezeptors* und des *vWF* in OSCC Zellen nicht regulieren kann. Dagegen ist die NC11-Domäne des Kollagen XVI sehr wohl in der Lage die Genexpression dieser Endothelzellen-assoziierten Marker in OSCC Zellen zu beeinflussen. Dies scheint eine spezifische Eigenschaft der NC11-Domäne zu sein, die sich von denen des Volllänge-Kollagen XVI unterscheidet.

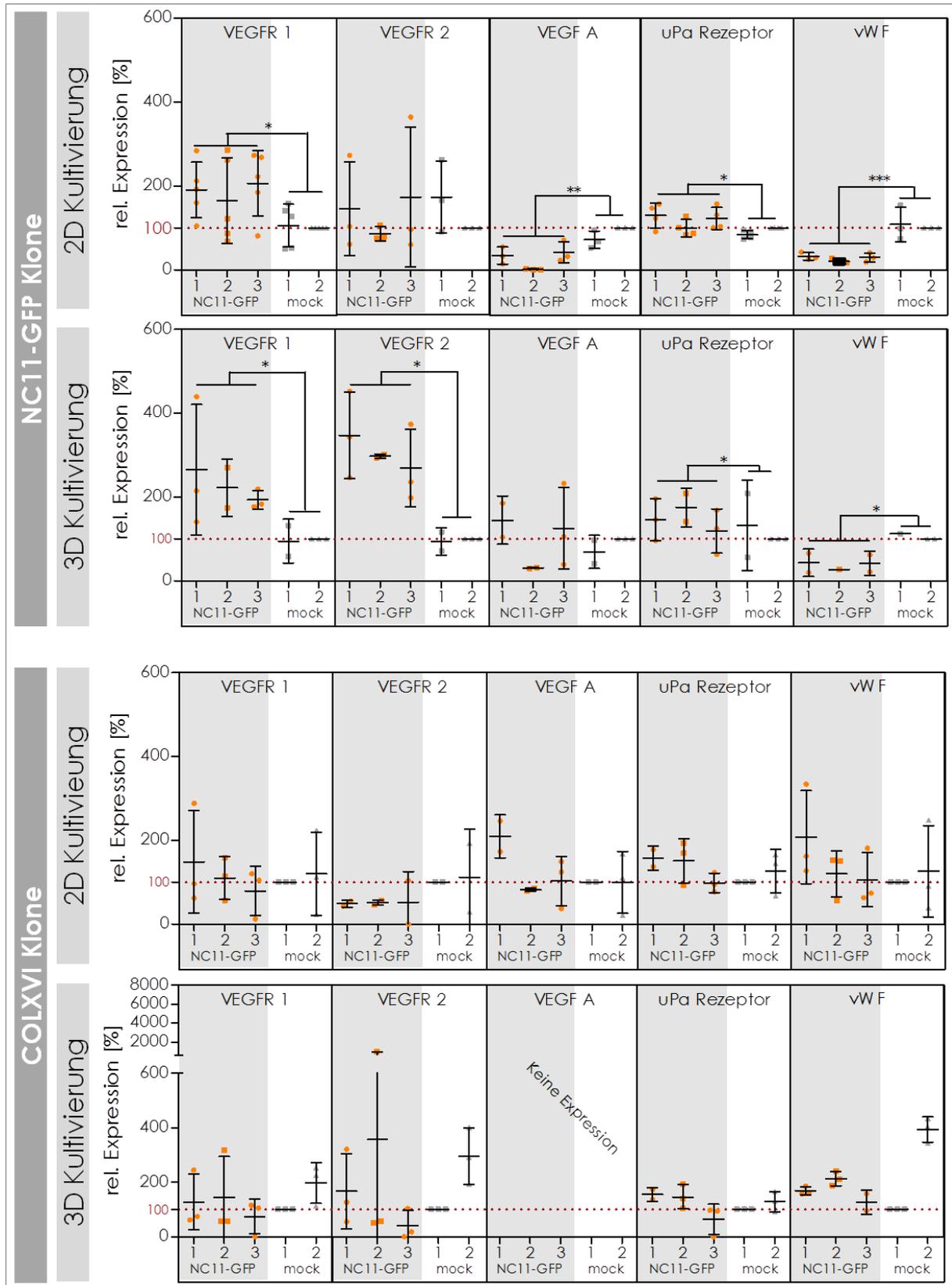


Abb. 23: Genexpression von Endothelzellen assoziierten Genen in 2D und 3D kultivierten NC11-GFP und Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen

Quantitative Taqman® PCR zum Nachweis der Genexpression von Endothelzellen-assoziierten Genen in NC11-GFP (NC11-GFP Zellen) und Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen (COLXVI Zellen) im Vergleich zu den jeweiligen Mock Kontrollzellen. **1. Zeile:** NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen wurden 48 h in Zellkulturflaschen aus Polystyren kultiviert (2D Kultivierung). Im Monolayer weisen die NC11-GFP Zellen eine

signifikant erhöhte *VEGFR 1* und *uPa Rezeptor* Genexpression auf. Dagegen erniedrigt sich die Genexpression von *VEGF A* und *vWF* signifikant im Vergleich zu den Mock Kontrollzellen. **2. Zeile:** NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen wurden 48h auf GFR Matrigel® kultiviert (3D Kultivierung). Die NC11-GFP Zellen zeigen wieder eine Hochregulierung der *VEGFR 1* und *uPa Rezeptor* Genexpression aber keine Herunterregulierung der *VEGF A* Genexpression. Zudem lässt sich nach NC11-GFP Induktion eine deutliche Zunahme der *VEGFR 2* Genexpression beobachten. Weiterhin findet man in den NC11-GFP Netzen eine signifikante Reduktion der *vWF* Genexpression. **3. Zeile:** COLXVI Zellen zeigen nach 2D Kultivierung keine Unterschiede in der Genexpression der von uns getesteten Marker. **4. Zeile:** COLXVI Zellen zeigen nach 3D Kultivierung keine differenzielle Genexpression der *VEGFR 1* und *2*, *uPa Rezeptoren* und des *vWFs* verglichen mit der Genexpression der Mock Kontrollzellen. Sowohl in COLXVI Zellen als auch in Mock Kontrollzellen ist keine Genexpression des *VEGF A* nachweisbar. (n ≥ 3; *: p < 0.05, **: p < 0.01, *** p < 0.001)

III.2.7. NC11-GFP Überexpression induziert eine erhöhte Proteinexpression des VEGFR 1, VEGFR 2 und des uPa Rezeptors in OSCC Zellen

Nachdem eine erhöhte Genexpression des VEGFR 1 und des uPa Rezeptors nach einer NC11-GFP Überexpression in OSCC Zellen sowohl in 2D als auch in 3D Kultur zu beobachten ist, sollte untersucht werden, ob auch eine erhöhte Proteinexpression des VEGFRs 1 und des uPa Rezeptors in den NC11-GFP Zellen zu detektieren ist. Tatsächlich kann in immunhistochemischen Färbungen von NC11 Zellen in 2D Monolayerkultur eine verstärkte Expression des VEGFR 1 und des uPa Rezeptors beobachtet werden. Dabei scheinen die Rezeptoren vor allem an den Zellmembranen exprimiert zu werden. NC11-GFP überexprimierenden OSCC Zellen exprimieren im Vergleich zu Mock Kontrollklonen zudem auch verstärkt das VEGFR 2 Protein an ihrer Zellmembran (siehe Abb. 24). Diese Ergebnisse zeigen, dass die NC11-Domäne des Kollagen XVI auch die Proteinexpression des VEGFR 1, VEGFR 2 und des uPa Rezeptors in OSCC Zellen induzieren kann.

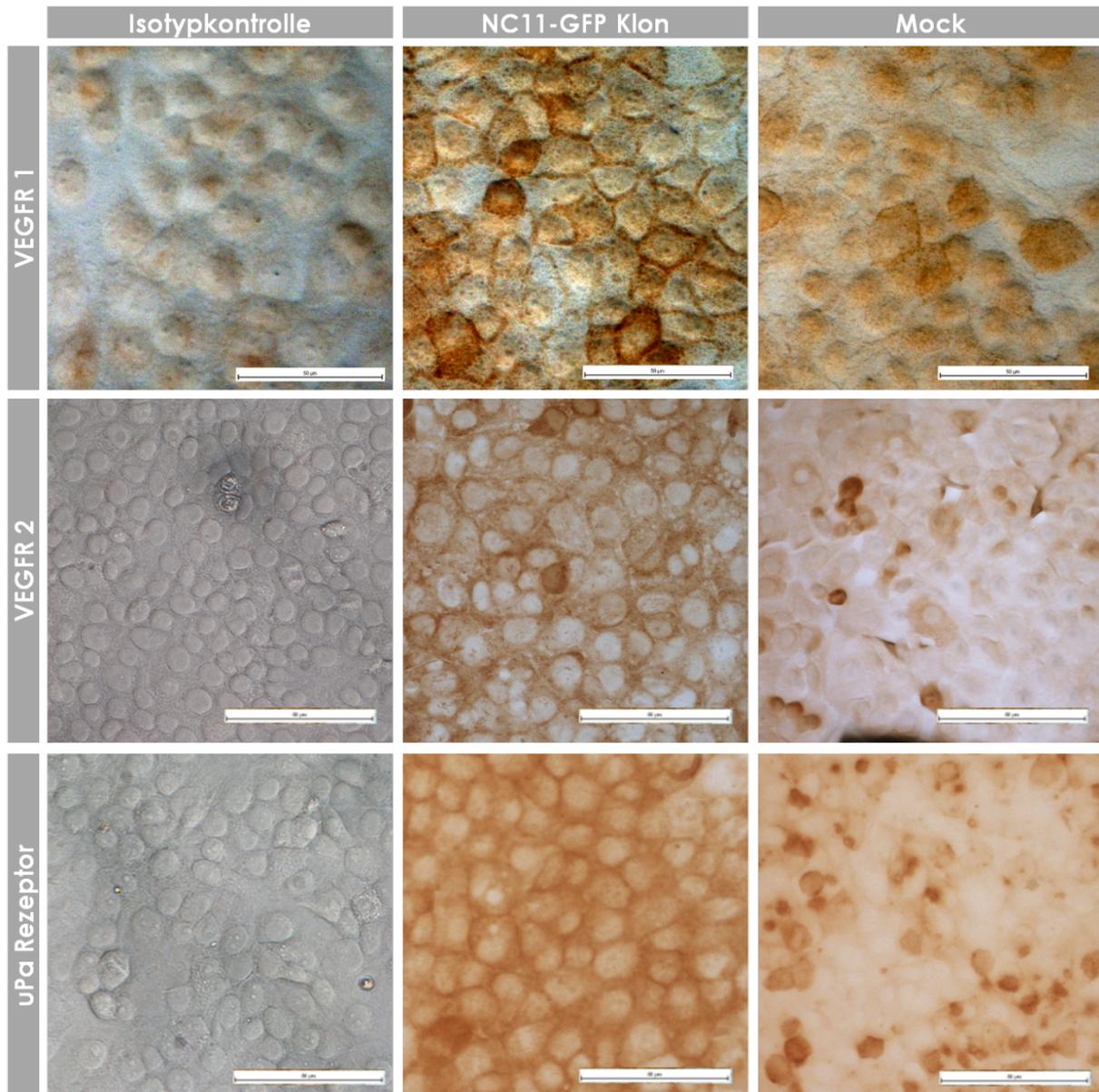


Abb. 24: NC11-GFP Überexpression führt in 2D Kultur zur erhöhten Proteinexpression des VEGFR 1, VEGFR 2 und des uPa Rezeptors

Immunohistochemische Färbung der NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen (400x Vergrößerung, Messskala entspricht 50 µm) von VEGFR 1 (erste Zeile), VEGFR 2 (zweite Zeile) und vom uPa Rezeptor (dritte Zeile). NC11-GFP Zellen (zweite Spalte) weisen vor allem an den Zellmembranen eine höhere VEGFR 1, VEGFR 2 und uPa Rezeptor Färbung auf als Mock Kontrollzellen (dritte Spalte).

Immunohistochemischen Färbungen von der Zellen in 3D Kultur bestätigen diese Ergebnisse. Auch hier findet man eine erhöhte Proteinexpression der vaskulären Rezeptoren VEGFR1, VEGFR2 und des uPa Rezeptors. Dabei wird vor allem der VEGFR2 Rezeptor an den Ränder zu den Netzzwischenräumen verstärkt exprimiert. Dies zeigt, dass die NC11-Domäne bei Zellen in 3D Kultur die Proteinexpression des VEGFR1, VEGFR2 und des uPa Rezeptors induzieren kann.

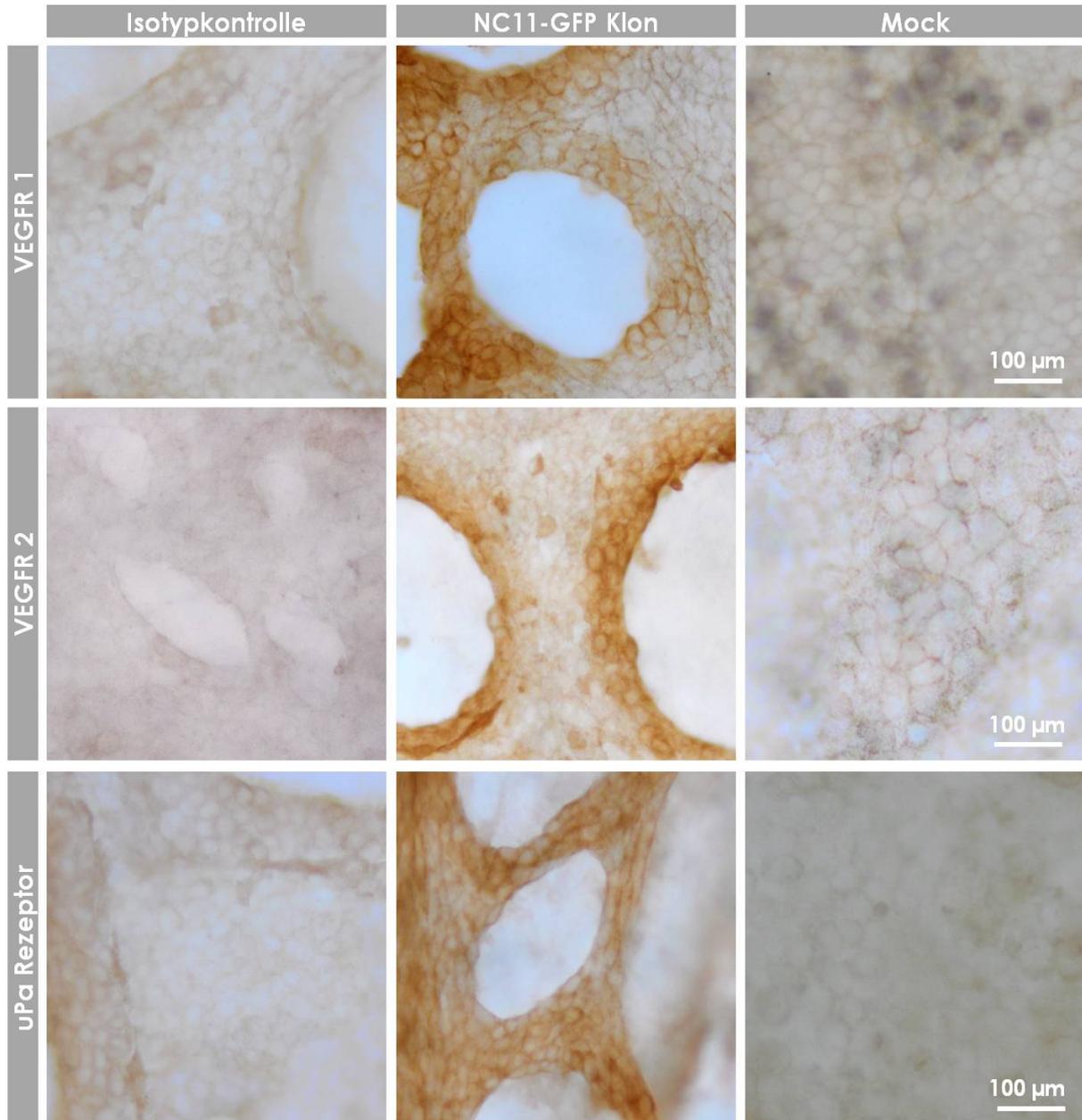


Abb. 25: NC11-GFP Überexpression führt in 3D Kultur zur erhöhten Proteinexpression des VEGFR 1, VEGFR 2 und des uPa Rezeptors

Immunohistochemische Färbung der NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen (100x Vergrößerung, Messskala entspricht 100 µm) von VEGFR 1 (erste Zeile), VEGFR 2 (zweite Zeile) und vom uPa Rezeptor (dritte Zeile). Die Zellen wurden 48h auf GFR Matrigel kultiviert. NC11-GFP Zellen (zweite Spalte) weisen höhere VEGFR 1, VEGFR 2 und uPa Rezeptor Färbungen auf als Mock Kontrollzellen (dritte Spalte).

III.2.8. NC11-GFP vermittelte VEGFR Expression induziert Endothel-ähnliche, netzförmige Wachstumsmuster in OSCC Zellen

In 2D Kultur konnte eine erhöhte Genexpression des *VEGFR 1* und in 3D Kultur eine Hochregulierung der Genexpression von *VEGFR 1* und *2* nachgewiesen werden. Zudem besitzen NC11-GFP Zellen in 2D und 3D Kultur im Bereich der Zellmembranen, verglichen mit Mock Kontrollzellen, eine erhöhte Proteinexpression beider Rezeptoren. Aus diesem Grund sollte im Folgenden überprüft werden, ob in NC11-GFP Zellen ein Zusammenhang zwischen der verstärkten VEGFR Expression und der Bildung der Endothel-ähnlichen Zellnetze besteht. Dazu wurden die VEGFRs durch die Zugabe von 30 nM Axitinib zum Zellkulturmedium während der 48-stündigen Kultivierung inhibiert. Die Inhibition der VEGFRs führt dazu, dass die NC11-GFP Zellen keine Endothel-ähnlichen, netzförmigen Wachstumsstrukturen mehr ausbilden (siehe Abb. 26).

Die Ausbildung der Endothel-ähnlichen, netzförmigen Wachstumsmuster der NC11-GFP Zellen wird zudem auch durch die Hitzeinaktivierung des im Kulturmedium enthaltenen FKS blockiert (siehe Abb. 26).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die NC11-GFP vermittelte VEGFR Expression für die Bildung von Endothel-ähnlichen, netzförmigen Wachstumsstrukturen in OSCC Zellen verantwortlich ist. Zusätzlich deutet das Ausbleiben der Endothel-ähnlichen Netze durch die Verwendung von hitzeinaktiviertem FKS darauf hin, dass exogene Liganden, die im FKS enthalten sind, wichtig für die VEGFR vermittelte Netzbildung in NC11-GFP Zellen sein könnten.

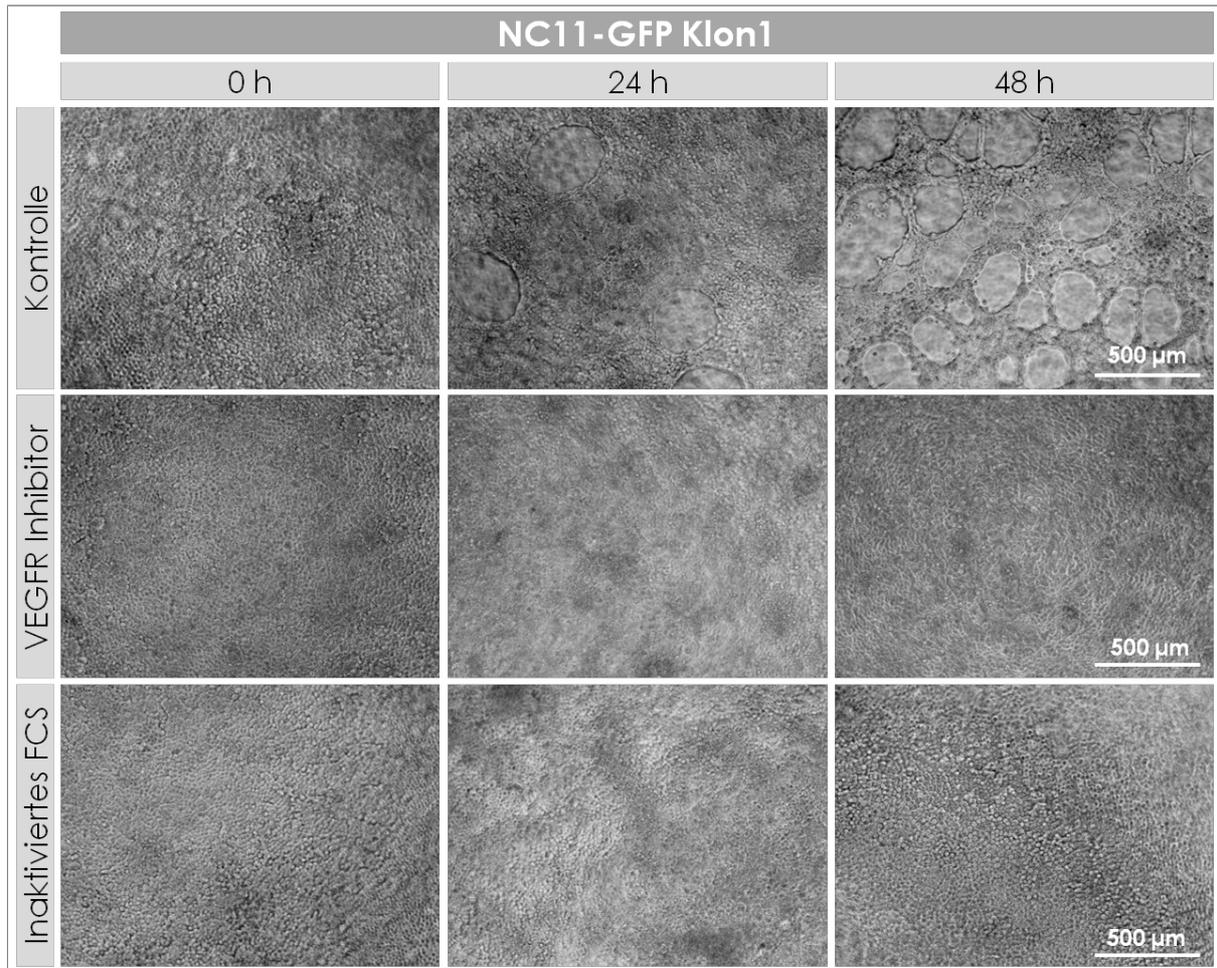


Abb. 26: Blockierung der Endothel-ähnlichen, netzförmigen Wachstumsstrukturen durch spezifische Inhibition der VEGFRs oder durch Hitzeinaktivierung des FCS

Analyse des 3D Wachstums von NC11-GFP Klon 1 auf GFR Matrigel® nach spezifischer VEGFR Inhibition oder FCS Hitzeinaktivierung. In der ersten Zeile ist der Kontrollversuch zu sehen. Die Zellen des NC11-GFP Klons 1 bilden nach 24 h erste zellfreie Bereiche aus, nach 48 h sind Endothel-ähnliche Netze zu beobachten. Durch die Zugabe des VEGFR Inhibitors Axitinib mit einer Endkonzentration von 30 nM kommt es zu keiner Bildung von Endothel-ähnlichen, netzförmigen Wachstumsstrukturen mehr. Die Verwendung von hitzeinaktiviertem FCS verursacht ebenfalls die Blockierung des Endothel-ähnlichen, netzförmigen Wachstums. Stattdessen wachsen die Zellen des NC11-GFP Klons in einem kohärenten Monolayer.

III.2.9. Analyse von Patientenseren

Zusätzlich wurden Seren von OSCC Patienten auf das Vorhandensein von Kollagen XVI und dessen Fragmente untersucht. Dazu wurden zuerst IgG Antikörper und Albumin aus allen Serenproben depletiert und anschließend die Seren eingengt. In Western Blot Analysen mit dem Kollagen XVI Antikörper sollte Kollagen XVI und dessen spezifische, N-terminale Fragmente sowohl in Seren von OSCC Patienten als auch in Kontrollseren gesunder Individuen detektiert werden. Alle getesteten Patientenseren weisen Proteinbanden mit einem molekularen Gewicht von zirka 250, 80, 60 und 35 kDa auf (siehe Abb. 27). Das 35 kDa Fragment stimmt in seiner Größe mit der NC11-Domäne von Kollagen XVI überein. Die oberste Bande des Western Blots mit einem Molekulargewicht von über 250 kDa (Abb. 27 Bande a) könnte die trimere Form des Kollagen XVI repräsentieren. Einige Patientenseren besitzen zudem das monomere Volllänge-Kollagen XVI (Abb. 27 Bande b; Patient 2, 3, 4 und 5) und weisen weitere N-terminale Kollagen XVI Fragmente mit einem Molekulargewicht von 120 kDa (Abb. 27 Bande c; Patient 3, 4, und 5), 50 kDa und 40 kDa (Abb. 28 Bande f und g; siehe Patient 5) auf. Nach Tillet et al. könnte es sich bei dem 40 kDa Fragment um eine noch nicht vollständig gespaltene Proform der NC11-Domäne handeln (Tillet et al., 1995). Im Vergleich zu den Kontrollseren gesunder Individuen, zeigen alle OSCC Patienten eine starke 35 kDa Bande (weißer Pfeil). Das 35 kDa Fragment ist zudem in Kontrollserum 1 und 2 nicht detektierbar. In allen Kontrollseren ist neben dem Kollagen XVI Trimer (Abb. 28 > 250 kDa; Bande a) das N-terminale Fragment mit einem molekularen Gewicht von 80 kDa nachweisbar. In dem Kontrollserum 3 ist die monomere $\alpha 1$ -Kette des Kollagen XVI (Bande b) verstärkt vorhanden, während sie in den restlichen Kontrollseren nur schwach nachweisbar ist. Zusätzlich besitzen alle Kontrollseren schwache Banden bei 120 (Abb. 27 Bande c), 60 (Abb. 27 Bande e), 50 (Abb. 27 Bande f) und 40 kDa (Abb. 27 Bande g). Diese Ergebnisse zeigen, dass Kollagen XVI und seine N-terminalen Fragmente in Blutseren enthalten sind. Zudem deuten diese Western Blot Analysen darauf hin, dass Seren von OSCC Patienten, im Vergleich zu Seren von gesunden Individuen, verstärkt die NC11-Domäne enthalten.

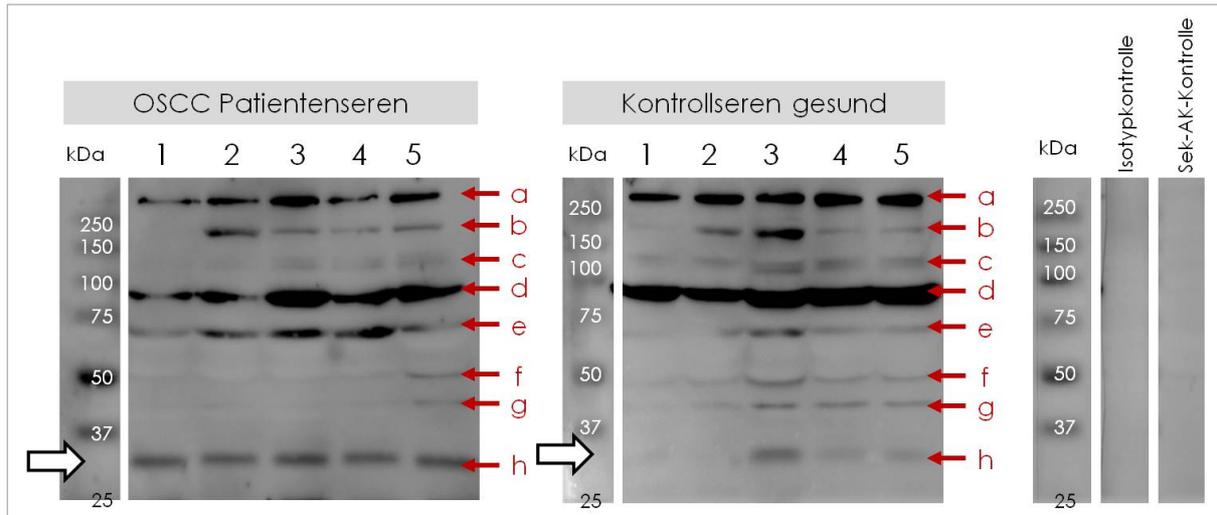


Abb. 27: Nachweis von Kollagen XVI und seinen N-terminalen Fragmenten in Blutseren von OSCC Patienten und gesunden Individuen.

Western Blot Analyse der Kollagen XVI Expression mittels eines Antikörpers, der den N-Terminus von Kollagen XVI erkennt. Alle Proben von Patienten zeigen Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von über 250 (a), 80 (d), 60 (e) und 35 kDa (h). Zusätzlich besitzen Patient 2, 3, 4 und 5 Proteinbanden mit einem Molekulargewicht zwischen 250 und 150 kDa (b) und 120 kDa (c). Patient 5 zeigt zudem N-terminale Kollagen XVI Fragmente mit einem Molekulargewicht von 50 (f) und 40 kDa (g). Das 35 kDa Fragment stimmt in seiner Größe mit der NC11-Domäne überein (weißer Pfeil, Bande h). Bei der Bande b handelt es sich wahrscheinlich um die monomere, ungespaltene $\alpha 1$ -Kette des Kollagen XVI. Die über 250 kDa große Bande a repräsentiert das Kollagen XVI Trimär. Alle Kontrollseren besitzen Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von über 250 kDa (a), zwischen 250 und 150 kDa (b), 120 kDa (c), 80 kDa (d), 60 kDa (e), 50 kDa (f) und 40 kDa (g). Bei Kontrollserum 3, 4 und 5 ist eine 35 kDa Bande (h) nachweisbar. Bei der Isotypkontrolle wurde OSCC Patientenserum 1 verwendet, bei der Sekundärantikörperkontrolle das Kontrollserum 1.

Anschließend sollte nachgewiesen werden, ob es sich bei den in den Western Blot Analysen beobachteten Fragmenten tatsächlich um Kollagenfragmente handelt. Dazu wurden Patientenserum mit einer Mixtur aus 0,1 U/ml Kollagenase D und 0,07 U/ml Kollagenase 2 für 1h bei 25°C verdaut und im Anschluss mit Hilfe des Kollagen XVI Antikörpers in Western Blot Analysen untersucht. Da auch die NC11-Domäne Schnittstellen für Kollagenasen enthält, kommt es auch zum Abbau der 35 kDa Bande. Daher ist nach dem Verdau außer einer 60 kDa Bande keine Proteinbande mehr detektierbar (siehe Abb. 28). Zusammenfassend kann deshalb davon ausgegangen werden, dass es sich bei den anderen beobachtbaren Kollagen XVI Fragmenten aus dem vorigen Experiment (<250, 210, 120, 80, 50, 40 und 35 kDa) tatsächlich um Kollagen Fragmente handelt. Vohingegen es sich bei der 60 kDa Bande wahrscheinlich um eine unspezifische Bande des Antikörpers handelt.

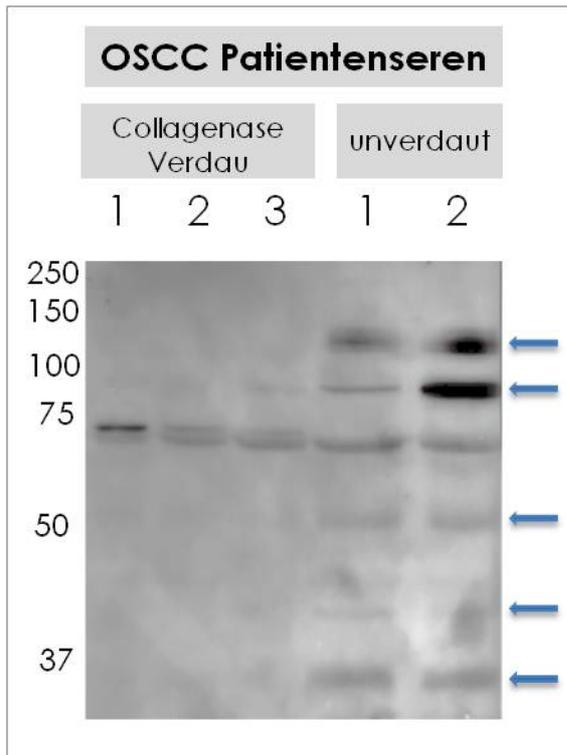


Abb. 28: Nachweis von Kollagen XVI in Blutseren von OSCC Patienten nach Kollagenaseverdau

Western Blot Analyse der Kollagen XVI Expression nach einem einstündigen Kollagenverdau (0,1 U/ml Kollagenase D und 0,07 U/ml Kollagenase 2). Nach dem Kollagenase Verdau ist nur noch die 60 kDa Bande detektierbar. Die 120, 80, 50, 40 und 35 kDa Banden sind nach dem Kollagenaseverdau nicht mehr detektierbar.

III.2.10. Zusammenfassung Teil II

In diesem Teil der Dissertation wurde mit Hilfe der Überexpression der NC11-Domäne des Kollagens XVI in der OSCC-Tumorzelllinie PCI13 (NC11-GFP Zellen) der Einfluss der NC11-Domäne auf Zellwachstum und Progression des OSCC untersucht. Dabei zeigt sich, dass eine Überexpression der NC11-Domäne in OSCC Zellen unter anderem zu einer Veränderung der Gen- und Proteinexpression verschiedener Tumor- und Endothelzellen-assoziierten Faktoren führt. Funktionell äußert sich dies in einer unterschiedlichen Differenzierung, einer reduzierten Zellgröße, einer gesenkten Proliferationsrate und einer Abnahme der Migrationsaktivität. Zudem verstärkt eine Überexpression der NC11-Domäne die Fähigkeit der OSCC Zellen zur klonalen Expansion. Des Weiteren beeinflusst eine Überexpression der NC11-Domäne in OSCC Zellen die Zellausbreitung und das Zellwachstum: 2D kultivierte NC11-GFP Zellen bilden ein fleckenförmiges Wachstumsmuster (*Zellcluster*), während Kontrollzellen in einem kohärenten Monolayer wachsen. Die Kultivierung auf GFR Matrigel® verursacht bei NC11-Zellen ein Endothel-ähnliches, netzförmiges Wachstumsmuster. Im Gegensatz dazu

wachsen Mock Kontrollzellen auf GFR Matrigel® in einem zusammenhängenden Monolayer.

Genexpressionsanalysen von NC11-GFP Zellen und COLXVI Zellen zeigen, dass die NC11-Domäne im Gegensatz zum Volllänge-Kollagen XVI, die Expression verschiedener Endothelzellen-assoziierten Gene beeinflusst. NC11-GFP Zellen in 2D Kultur besitzen eine erhöhte *VEGFR 1*, *uPa Rezeptor* und *vWF* Genexpression. Des Weiteren wird die Genexpression von *VEGF A* in diesen NC11-Zellen, im Vergleich zu Mock Kontrollzellen, herunter reguliert. Dagegen unterscheiden sie sich nicht in ihrer *VEGFR 2* Genexpression von Mock Kontrollzellen. Nach 3D Kultivierung zeigen NC11-Zellen, verglichen mit Mock Kontrollzellen, einen starken Anstieg der Genexpression von *VEGFR 1*, *VEGFR 2*, *uPa Rezeptor* und *vWF*. Allerdings ist kein Unterschied zwischen NC11-Zellen und Mock Kontrollzellen in der Genexpression des *VEGF A* zu detektieren.

Nach Kollagen XVI Überexpression in OSCC Zellen sind keine Unterschiede in der Genexpression der getesteten Endothelzellen-assoziierten Gene sowohl in 2D als auch in 3D Kultivierung detektierbar. Die beobachtete Regulation der Endothelzellen-assoziierten Gene in OSCC Zellen scheint daher eine spezifische, von Volllänge-Kollagen XVI sich unterscheidende Eigenschaft der NC11-Domäne zu sein.

Auch auf Proteinebene findet man in OSCC Zellen einen Anstieg der *VEGFR 1*, *VEGFR 2* und *uPa Rezeptor* Expression nach NC11-GFP Überexpression. Eine Inhibition der *VEGFR* Aktivität verursacht ein Ausbleiben des Endothel-ähnlichen, netzförmigen Wachstumsmusters in 3D Kultur. Die über NC11-GFP Überexpression vermittelte *VEGFR* Expression ist vermutlich für die Bildung von Endothel-ähnlichen, netzförmigen Wachstumsstrukturen in OSCC Zellen verantwortlich. Zusätzlich deutet die durch die Inaktivierung des FKS verursachte Auflösung der Endothel-ähnlichen Netze darauf, dass exogene Faktoren, die im FKS enthalten sind, wichtig für die *VEGFR* vermittelte Netzbildung in NC11-GFP Zellen sein könnten.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass die NC11-Domäne des Kollagen XVI über die induzierte Expression des *VEGFR 1* und *VEGFR 2* zur vaskulogenen Mimikry der OSCC Zellen führt.

Bei der Untersuchung von OSCC-Patientenseren kann neben dem Volllänge-Kollagen XVI spezifische Kollagen XVI Trunkierungen detektiert werden, die

möglicherweise als Matrikryptine definiert werden können. Außer 120, 80, 60, 50 und 40 kDa großen N-terminalen Fragmenten kann auch die 35 kDa große NC11-Domäne von Kollagen XVI in Patientenseren nachgewiesen werden. Vergleiche mit Kontrollseren gesunder Individuen lassen eine verstärkte Abspaltung der NC11-Domäne von Kollagen XVI in OSCC Patienten vermuten.

IV. Diskussion

In der oralen Mukosa oder in der Haut wird Kollagen XVI von Fibroblasten und Keratinozyten produziert. Im gesunden Gewebe lagert es sich an strukturell und funktional unterschiedlichen Matrixaggregaten an. Dort ist es an der dermalen epidermalen Verbindungszone der papillären Dermis lokalisiert (Grässel et al., 1999; Kassner et al., 2003). Diese Lokalisation lässt vermuten, dass Kollagen XVI eine aktive Rolle bei der Verankerung von Mikrofibrillen an die Basalmembran spielt.

Im oralen Plattenepithelkarzinom und im Gliom ist eine erhöhte Expression von Kollagen XVI zu beobachten (Senner et al., 2008; Bauer et al., 2011; Ratzinger et al., 2011a). Um den Einfluss von Kollagen XVI auf die Progression des OSCCs zu untersuchen, sind daher im Rahmen dieser Dissertation Auswirkungen einer induzierten Kollagen XVI Expression in einer ursprünglich Kollagen XVI defizienten OSCC Zelllinie untersucht worden. Im ersten Abschnitt der Arbeit wurde die Wirkung von Volllänge Kollagen XVI auf die MMP9 Expression der OSCC Zellen analysiert und der dafür verantwortliche Signalweg herausgearbeitet. Der zweite Teil konzentrierte sich auf die funktionellen Aspekte der NC11-Domäne von Kollagen XVI bei der Progression des OSCC.

IV.1. Kollagen XVI und die Induktion der MMP9 Expression über den ILK/Akt/PKB/AP-1 Signalweg

Die Induktion von Kollagen XVI in einer Kollagen XVI defizienten OSCC Zelllinie verursacht eine erhöhte MMP9 Genexpression und Sezernierung. Schon Daniel et al. konnten einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Matrix Metalloproteasen und der Kollagen I Produktion in Fibroblasten beobachten. Durch die Inhibition der MMPs verringerte sich signifikant die Kollagenproduktion der Fibroblasten (Daniels et al., 2003). Ein weiteres Beispiel für einen Zusammenhang zwischen Kollagen Exposition und gesteigerter MMP Expression fanden Ronzière und Kollegen. Sie konnten zeigen, dass die Kultivierung von Chondrozyten der Zelllinie MC615 auf Kollagen I die MMP13 Expression induziert (Ronzière et al., 2005).

MMP9 nimmt Einfluss auf die Entstehung und Progression vieler Krebsarten. Beispielsweise kommt es während der frühen Tumorgenese des Melanoms zur

Aktivierung von MMP9. Die aktivierte MMP9 stammt dabei von Keratinozyten und nicht von den Melanomzellen selbst (Van Kilsdonk et al., 2010). Des Weiteren fördert MMP9 die Initiierung von Lebertumoren durch die proteolytische Freisetzung und Aktivierung des Matrix assoziierten TGF β und VEGF (Thieringer et al., 2012). In humanen Epithelzellen der Brust induziert MMP9 die Expression des Onkoproteins HER2/Neu, inhibiert die Apoptose und fördert die maligne Transformation der Epithelzellen (Fatumbi et al., 2012). Zusätzlich ist in neoplastischen Zellen an der Invasionsfront von Plattenepithelkarzinomen der Zunge eine erhöhte MMP9 Expression zu beobachten (Henriques et al., 2012). Hu et al. konnten zudem zeigen, dass die MMP9 Expression in humanen Ovarialtumoren hochreguliert ist. Dabei ist die MMP9 Expression mit dem Fortschritt der Krebserkrankung assoziiert und korreliert mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten. Der Inhibition der MMP9 Expression mit Hilfe von siRNA hat in Ovarialtumorzellen eine Reduktion der Adhäsion und Invasion dieser Zellen *in vitro* zur Folge und legt nochmal den Einfluss von MMP9 auf die Progression von Tumoren offen (Hu et al., 2012). Zusätzlich reduziert sich das Invasionspotential von OSCC Zellen nach einer transkriptionellen Suppression von MMP9 durch ESE-1 (Iwai et al., 2008). Darüber hinaus hat die spezifische Inhibition der Gelatinaseaktivität von MMP9 und MMP2 in Plattenepithelkarzinomzellen der Zunge eine klare Reduktion der Invasion und der Migration dieser Karzinomzellen zur Folge (Heikkilä et al., 2006). In histologisch unauffälligen Resektionsrändern von OSCC Tumoren dient MMP9 als Anzeichen für das Wiederauftreten des Tumors (Ogbureke et al., 2012). Diese Befunde legen die entscheidende Rolle der MMP9 Expression während der Entstehung von OSCC und anderer Krebsarten und ihren Einfluss auf den Verlauf dieser Erkrankungen dar.

Die Zugabe von rekombinantem Kollagen XVI zu OSCC Zellen führt zu einem weiteren Anstieg der *MMP9* Genexpression. Wahrscheinlich interagiert dabei das exogene Kollagen XVI mit spezifischen Zelloberflächenrezeptoren, bewirkt deren Aktivierung und nimmt auf diesem Weg Einfluss auf intrazelluläre Signalwege, was letztlich das Verhalten der Karzinomzellen verändert. Diese Vermutung wird sowohl von Eble et al. als auch von Ratzinger et al. gestützt, die beide zeigen konnten, dass Kollagen XVI mit den Oberflächenrezeptoren $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ Integrin interagiert und diese auch aktiviert. Diese Interaktion führt dabei zur Rekrutierung der Integrine in fokale Adhäsionsstellen, einem entscheidenden Schritt bei der Integrinaktivierung

und Signalweitergabe (Eble et al., 2006; Ratzinger et al., 2010). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass eine Kollagen XVI Überexpression in OSCC Zellen eine gesteigerte Proliferation der Zellen zur Folge hat. Eine Blockierung der Integrine durch spezifische Antikörper bewirkt schließlich eine Abnahme der Proliferationsrate in Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen. Kollagen XVI induziert folglich über die Aktivierung von Integrinen einen schnelleren Eintritt in die S-Phase der Zellen (Ratzinger et al., 2011a). In Tumorzellen führt eine Expression oder Aktivierung von Integrinen häufig zur gesteigerten Migration, Invasion und Proliferation. Integrin-induziert kommt es dabei zur Expression von Schlüsselproteinen des Zellzykluses, wie beispielweise dem Cyclin D1 oder Proteine der Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor-Familie. Diese wiederum regulieren den Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus (Desgrosellier and Cheresch, 2010).

Die verstärkte Aktivierung der ILK in Karzinomzellen nach Kollagen XVI Induktion stützt die Vermutung, dass Integrine an der Kollagen XVI vermittelten MMP9 Expression in OSCC Zellen beteiligt sind: ILK kann mit den intrazellulären Domänen von $\beta 1$ und $\beta 3$ Integrinen interagieren und ermöglicht dadurch die Signalweitergabe von aktivierten Integrinen ins Innere der Zelle (Persad and Dedhar, 2003).

Sowohl eine konstitutive Aktivierung als auch eine erhöhte Expression von ILK korreliert in vielen Krebsarten mit der Tumorprogression. Beispielsweise kann in vielen Tumoren und Tumorzelllinien ein Funktionsverlust des Tumorsuppressors PTEN beobachtet werden, der unter anderem die ILK Aktivierung in gesundem Gewebe negativ reguliert. Der Verlust von PTEN hat schließlich eine konstitutive Aktivierung der ILK in den Tumoren zur Folge (Dedhar, 2000; Persad and Dedhar, 2003).

Eine erhöhte ILK Expression korreliert in OSCC stark mit der Tumordinvasion, einem höheren Tumorgrad, einem fortgeschrittenen klinischen Stadium, einem positiven Lymphknotenstatus und einem erhöhten Risiko für das Wiederauftreten des Tumors (Zhao et al., 2012).

In nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen konnte Okamura et al. durch immunhistochemische Färbungen zeigen, dass eine verstärkte Expression von $\beta 1$ Integrinen mit einer erhöhten intrazellulären Expression der ILK und einem vermehrten Auftreten der aktivierten Proteinkinase B, die an Serin 473 phosphoryliert

vorliegt, assoziiert ist. Die gemeinsam auftretende Expressionsinduktion von $\beta 1$ Integrin, ILK und phosphorylierter Proteinkinase B steht dabei in direktem Zusammenhang mit einer schlechten Prognose für Patienten des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (Okamura et al., 2007). Des Weiteren kann eine Überexpression von ILK in humanen Gewebeproben von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich (englisch: *squamous cell carcinoma of head and neck*, SCCHN) beobachtet werden. Die Reduktion der ILK Aktivität mit Hilfe eines ILK Inhibitors vermindert die Phosphorylierung der Proteinkinase B, inhibiert das Zellwachstum und hat eine gesteigerte Apoptoserate in SCCHN Zelllinien zur Folge (Younes MN et al., 2007).

Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der nach einer Kollagen XVI vermittelten ILK Aktivierung auch eine Aktivierung der Proteinkinase B in OSCC Zellen beobachtet wurde. Die Inhibition der ILK Aktivität mittels eines spezifischen Inhibitors hatte in Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen eine Herunterregulierung der MMP9 Promotoraktivität, eine Abnahme der *MMP9* Genexpression und schließlich eine verminderte MMP9 Sezernierung zur Folge. Diese Ergebnisse deuten auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Aktivierung der ILK und der MMP9 Expression hin. Untermuert wird diese Vermutung auch von Zhu et al.: Sie konnten in humanen Blasenkrebszellen zeigen, dass nach einem ILK *Knockdown* (Inhibierung mittels siRNA) eine verminderte Phosphorylierung der Proteinkinase B und eine Abnahme der MMP9 Expression zu beobachten ist. Zusätzlich weisen humane Blasenkrebszellen nach einem ILK Knockdown eine Reduktion der Zellproliferation, Migration und Invasion auf (Zhu et al., 2012).

Es gibt zahlreiche Hinweise in der Literatur für eine Regulation der MMP9 Expression durch ILK. Beispielsweise inhibiert der ILK Knockdown in Zellen des Plattenepithelkarzinoms der Zunge die Phosphorylierung der Proteinkinase B, reduziert die MMP2- und MMP9 Expression und führt schließlich *in vivo* in Plattenepithelkarzinomen der Zunge zur Suppression der Tumorgenese und Metastasenbildung (Xing et al., 2013). In Podozyten induziert die ektopische Expression von ILK die MMP9 Expression und fördert die Zellwanderung (Kang et al., 2010). Des Weiteren führt eine Überexpression von ILK in Epithelzellen des Darms und der Brust zu einer Induktion der MMP9 Sezernierung und folglich zu

einem hoch invasiven Phänotyp der Zellen. Zudem kommt es nach ILK Inhibition in diesen Epithelzellen zu einer verminderten Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 und zu einer reduzierten MMP9 Promotoraktivität (Toussard et al., 2000).

Wie schon erwähnt, ist die Rekrutierung der Integrine in fokalen Adhäsionskontakten ein entscheidender Schritt bei der Integrinaktivierung. Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der Integrine an der Kollagen XVI vermittelten MMP9 Expression in OSCC Zellen ist die in dieser Arbeit gefundene, verstärkte Interaktion von ILK mit Kindlin-1 in fokalen Adhäsionskontakten nach Kollagen XVI Überexpression.

Die Interaktion von ILK mit Proteinen, die zur Familie der Kindline zählen, ist ein maßgeblicher Schritt in der Rekrutierung der ILK und der Kindline in fokale Adhäsionskontakte und somit im Allgemeinen von Bedeutung bei dem Aufbau von fokalen Adhäsionskontakten. In der Literatur lassen sich einige Hinweise auf eine Interaktion von ILK mit Kindlin-2, ein Kindlin-1 verwandtes Protein, finden: Beispielsweise konnte in Mausfibroblasten eine Interaktion von ILK mit Kindlin-2 nachgewiesen werden. Kindlin-2 scheint dabei für die Lokalisierung von ILK an der fokalen Adhäsion wichtig zu sein (Montanez et al., 2008). Huet-Calderwood et al. konnten zeigen, dass die Bindung von ILK an Kindlin-2 entscheidend für die Rekrutierung beider Proteine in fokale Adhäsionskontakte ist und für die dortige Aktivierung von $\beta 1$ Integrinen nötig ist. Dabei bindet Kindlin-2 mit seiner F2 Domäne an ILK (Huet-Calderwood et al., 2014). Zudem konnten Fukuda et al. erst vor kurzem aufdecken, dass die Interaktion von ILK und Kindlin-2 essentiell für die *outside-in* Signalgebung von Integrinen ist, nicht aber für das *inside-out signalling*. Während dessen bindet Kindlin-2 an die Pseudokinase Domäne von ILK. Diese Bindung ist entscheidend für den Aufbau von fokalen Adhäsionskontakten und die Zellenmorphologie (Fukuda et al., 2014).

In dieser Arbeit wurde erstmals der Nachweis erbracht, dass ILK mit Kindlin-1 interagieren kann. Sowohl *Proximity Ligation Assays* als auch Co-Immunpräzipitationen deckten eine Interaktion von ILK mit Kindlin-1 in Kollagen XVI überexprimierenden OSCC-Zellen auf. Im Gegensatz zu Kindlin-2 wird Kindlin-1 nicht ubiquitär exprimiert, sondern hauptsächlich von Epithelzellen produziert (Böttcher et al., 2012). Daher ist es nicht unerwartet, dass auch entartete Plattenepithelzellen Kindlin-1 exprimieren. Allen Kindlinen ist eine C-terminale FERM Domäne (englisch:

4.1 *protein, ezrin, radixin, moesin*) gemein, die sich in die drei Subdomänen F0, F1, F2 und F3 unterteilen lässt. Ein Kennzeichen der Kindline ist die Unterbrechung der F2 Subdomäne durch eine PH (englisch: *pleckstrin homolgy*) Domäne. Wie Kindlin-2 interagiert Kindlin-1 mit dem fokalen Adhäsionsprotein Migfilin. Zudem ist die Aminosäuresequenz von Kindlin-1 zu 62% mit der von Kindlin-2 identisch (Karaköse et al., 2010; Böttcher et al., 2012). Es wäre also denkbar, dass auch Kindlin-1 mit ILK über seine F2 Domäne interagieren kann. Weiterhin ist bekannt, dass die Überexpression von Kollagen XVI in OSCC-Zellen die Kindlin-1 Expression induziert und die Kindlin-1/ β 1 Integrin Interaktion verstärkt. Dies führt zu einer Aktivierung von β 1 Integrinen und schließlich zu einer gesteigerten Zellproliferation (Ratzinger et al., 2011). Mit diesen Ergebnissen im Einklang stehen die Befunde von Bauer et al., die nach einem *Knockdown* von Kollagen XVI in der humanen Glioblastomzelllinie U87MG eine Abnahme der Kindlin-1 und Kindlin-2 Expression beobachten und eine verringerte β 1 Integrin Aktivierung nachweisen. Zudem hat der *Knockdown* von Kollagen XVI in U87MG Zellen eine Reduktion von fokalen Adhäsionskontakten pro Zelle zur Folge (Bauer et al., 2011).

Interessanterweise führte die Blockierung von fokalen Adhäsionskontakten mit löslichen RGD-Peptiden zu einer Abnahme der ILK/Kindlin-1 Interaktionen in den Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen und hat eine verminderte *MMP9* Genexpression zur Folge. Dies legt nahe, dass die Interaktion von ILK mit Kindlin-1 in Bereichen von fokalen Adhäsionskontakten bei der Hochregulierung der *MMP9* Expression in Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen von Bedeutung ist. Durch die Blockierung der fokalen Adhäsionskontakte wird die Integrinaktivierung inhibiert. Die Bildung von fokalen Adhäsionskontakten und Aktivierung von Integrinen scheint somit entscheidend für eine intakte ILK/Kindlin-1 Interaktion in Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen zu sein.

Obwohl an Zellkulturoberflächen gebundene, immobilisierte RGD-Peptide sehr effektive Bindungspartner für Integrine sind, inhibieren RGD Peptide in löslicher Form die Bindung von Integrinen an ihr Substrat effektiv, verhindern auf diese Weise die Phosphorylierung der *focal adhesion kinase* (FAK) und folglich die Bildung von fokalen Adhäsionskontakten (Disatnik and Rando, 1999). Laut Literatur besitzt Kollagen XVI zwei potentielle α 1 β 1 Integrin Bindestellen in der zweiten kollagenen Domäne. Beide Bindestellen besitzen keine RGD-Sequenz (Eble et al., 2006). Daher

ist es unwahrscheinlich, dass der inhibitorische Effekt der löslichen RGD-Peptide in den Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen durch eine Verdrängung von Kollagen XVI von seinen Rezeptoren (kompetitive Hemmung) hervorgerufen wird.

Die verstärkte Aktivierung des *MMP9* Gens und die daraus resultierende gesteigerte *MMP9* Genexpression ist eine Folge der Kollagen XVI vermittelten Aktivierung des *MMP9* Promotors. Dabei ist die spezifische AP-1 (englisch: *activator protein 1*) Bindestelle des *MMP9* Promotors 98 bp vor dem Startcodon entscheidend. Da Zellklone mit einer höheren Kollagen XVI Expression, im Vergleich zu Zellklonen mit einer niedrigeren Kollagen XVI Expression, einen stärker aktivierten *MMP9* Promotor besitzen, scheint es auch hier einen Zusammenhang zwischen der Menge an vorhandenem Kollagen XVI und dem Aktivierungsgrad des *MMP9* Promotors zu geben. Dies stimmt mit den vorigen Untersuchungen der *MMP9* Genexpression und Sezernierung überein.

AP-1 ist ein dimerer Transkriptionsfaktor und besteht aus Mitgliedern der Proteinfamilien Jun, Fos, ATF (englisch: *activating transcription factor*) und MFA (englisch: *musculoaponeuric fibrosarcoma*), wobei die Jun und Fos Proteinfamilie die am häufigsten vorkommenden Mitglieder der AP-1 Familie sind. Auf Grund der unterschiedlichen Proteinfamilien, die an der Zusammensetzung des AP-1 Komplexes beteiligt sein können, existieren viele verschiedene Kombinationen des AP-1 Dimers. Diese vielen Kombinationsmöglichkeiten erhöhen zusätzlich die Anzahl von Genen, die von den AP-1 Dimeren reguliert werden (Eferl and Wagner, 2003).

Experimente mit dem AP-1 spezifischen Inhibitor Tanshinone II A bestätigen die Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 an der Kollagen XVI vermittelten Aktivierung der *MMP9* Genexpression. Nach der Inhibition der AP-1 Dimerisierung mittels Tanshinone II A und der daraus folgenden Inaktivierung von AP-1 sinkt die *MMP9* Expression in Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen auf das Niveau der Kontrollzellen. Diese Ergebnisse werden von Untersuchungen Toussards et al. untermauert: Sie stellen in Epithelzellen des Darms und der Brust nach ILK Überexpression eine AP-1 vermittelte Induktion der *MMP9* Expression fest. Zudem konnten sie zeigen, dass AP-1 in diesen Zellen die *MMP9* Promotoraktivität steigert und es schließlich zur vermehrten Expression und Sezernierung von *MMP9* kommt (Toussard et al., 2000).

Im Allgemeinen ist eine abnormale Jun und Fos Expression mit einer Vielzahl humaner Tumoren verknüpft (Lee and Kim, 2012). Mitglieder der AP-1 Proteinfamilie sind in oralen Plattenepithelkarzinomen häufig dereguliert. Dabei lässt sich eine konstitutive Aktivierung von AP-1 mit einer gleichzeitig verstärkten Expression bekannter Mitglieder der AP-1 Proteinfamilie (c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2) auf Protein- und RNA-Ebene beobachten und ist mit der malignen Transformation der Plattenepithelzellen assoziiert (Choi and Myers, 2008; Mishra et al., 2010). Zudem konnten Mishra et al. im OSCC zeigen, dass in Präkanzerosen vor allem JunD Homodimere vorkommen, wohingegen im fortgeschrittenen Krebsstadium überwiegend c-Fos/JunD Heterodimere zu finden sind (Mishra et al., 2010). Dies lässt vermuten, dass nicht nur die Expression und Aktivierung der AP-1 Proteine bei der malignen Transformation von Plattenepithelzellen eine Rolle spielen, sondern auch die Zusammensetzung der AP-1 Dimere entscheidend ist und sich in verschiedenen Krebsstadien unterscheidet. Interessanterweise können in den Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen keine Unterschiede in der Genexpression der AP-1 Untereinheiten beobachtet werden. Allerdings gibt es Unterschiede in der nukleären Proteinlokalisierung. Dies ist nicht weiter erstaunlich, wenn man sich den Aktivierungsmechanismus des Transkriptionsfaktor vor Augen hält. Die AP-1 Aktivität wird nicht nur durch eine Erhöhung der Genexpression seiner Untereinheiten bewerkstelligt, sondern auch durch seine Phosphorylierung, Dimerisierung und schließlich durch seine Translokalisierung in den Kern kontrolliert (Eferl and Wagner, 2003).

Des Weiteren hat eine Kollagen XVI Überexpression in OSCC Zellen eine verstärkte nukleäre Lokalisation von JunB zur Folge und belegt nochmals die Bedeutung des Transkriptionsfaktors AP-1 in der Kollagen XVI vermittelten MMP9 Expression. Eine Deregulierung der JunB Expression ist in vielen Krebsarten zu beobachten. So ist laut Vallone et al. in der Ratte eine Überexpression von JunB mit der neoplastischen Transformation von Schilddrüsenzellen assoziiert (Vallone et al., 1997). Eine JunB Überexpression ist auch in Hodgkin Lymphomen, in anaplastischen großzelligen Lymphomen, in lymphomatoiden Papulosen (Mathas et al., 2002; Rassidakis et al., 2005) und in kutanen Lymphomen (Mao et al., 2003, 2004) zu beobachten. Außerdem findet man eine signifikant erhöhte JunB Proteinexpression in humanen, kolorektalen Adenokarzinomen (Wang et al., 2000). Nach der Induktion von

Plattenepithelkarzinomen der Zunge in Ratten mittels 4-Nitroquinolin-1-Oxid (4NQO), kommt es zur gesteigerten Genexpression von JunB und schließlich zu vermehrter nukleärer Lokalisation von JunB in den Plattenepithelzellen (Ohyama et al., 2004). Interessanterweise konnten Robinson et al. in Keratinozyten aus 4NQO Ratten, einem Rattenmodell für aggressive orale Kanzerogenesen, einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten JunB Expression und einem aggressiven, tumorösen Phänotyp der Keratinozyten herstellen. Nach einer Überexpression von JunB in Keratinozyten der 4NQO Ratte lässt sich eine deutlich gesteigerte MMP9 Aktivität nachweisen. Zudem steigert die Induktion einer JunB Überexpression die Invasivität der Keratinozyten (Robinson et al., 2001). Des Weiteren deckten Lee et al. auch in Magenkarzinomzellen eine JunB vermittelte Induktion der MMP9 Expression auf und vermuteten, dass eine Überexpression von JunB durch die Hochregulierung der MMP9 Expression mit einem malignen Phänotyp des Magenkarzinoms assoziiert ist (Lee and Kim, 2012). Diese Befunde ergänzen sich mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen.

In Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen konnte auch eine Interaktion des AP-1 Proteins c-Fos mit Dyskerin, unter anderem ein wichtiger Bestandteil des Telomerasekomplexes, beobachtet werden. Diese c-Fos/Dyskerin Interaktion wurde bis heute in der Literatur nicht beschrieben und ihre Entdeckung stellt möglicherweise den ersten Schritt für ein neues Verständnis der Funktion des AP-1 und des Dyskerins dar.

Dyskerin ist ein Nukleusprotein, das zusammen mit anderen Faktoren für die Biosynthese von Ribonukleotidproteinen (RNPs), die H/ACA RNAs enthalten, zuständig ist. Während der Entstehung der RNPs bindet und stabilisiert Dyskerin die H/ACA RNAs. Bis heute sind mehr als 100 H/ACA RNAs bekannt. Eine dieser RNAs ist die Telomerase RNA (TERC), somit ist Dyskerin für die Funktionalität der Telomerase RNPs zuständig und wichtig für die Aufrechterhaltung der Telomerlänge (Alawi and Lin, 2011). Aufgrund seiner entscheidenden Rolle bei der Zusammensetzung von RNPs besitzt Dyskerin pleiotrope Eigenschaften, die wesentliche zelluläre Prozesse, wie beispielsweise Proteinexpression, Zellwachstum und Proliferation beeinflussen (Montanaro, 2010).

Die Dimerisierungsdomäne von c-Fos ist eine *basic leucine zipper* Domäne (Eferl and Wagner, 2003). In Computer unterstützten Analysen möglicher Interaktionspartner

von Proteinen mit *basic leucin zipper* findet man mit Hilfe des Programmes von He et al. auch Dyskerin (He et al., 2009). Bei einer genaueren Untersuchung der Aminosäuresequenz von Dyskerin findet man sehr kurze Sequenzmotive, die einem *basic leucin zipper* Motiv ähneln (siehe Abb. 29, Analyse nach (Miller, 2009)). Daher wäre es möglich, dass Dyskerin mit c-Fos über diese Aminosäuresequenzen interagieren kann.

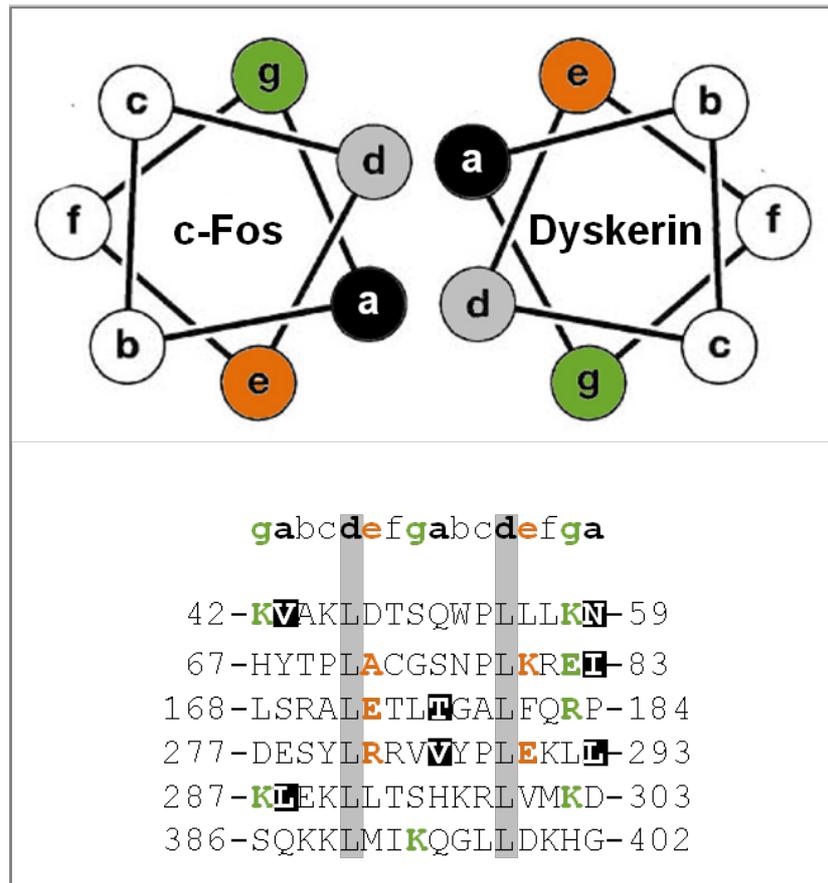


Abb. 29: Möglicher Dimerisierungsmechanismus von c-Fos mit Dyskerin
 Die obere Abbildung ist eine schematische Darstellung der α -Helix des *basic leucin zipper* Motivs, wobei die Buchstaben die Position der Aminosäure darstellen. An Position d befindet sich immer Leucin. Die unteren Aminosäuresequenzen sind Ausschnitte aus der Aminosäuresequenz von Dyskerin. Alle farblich markierten Aminosäuren entsprechen Aminosäuren, die mit der Sequenz eines *basic leucin zipper* Motivs übereinstimmen. Wobei die Aminosäuren an Position g und e gegenüber denen an Position a und d eine untergeordnete Rolle spielen. Analyse nach Miller et al, 2009

Mutationen des Gens Dyskerin sind mit Dyskeratosis congenita assoziiert. Dyskeratosis congenita Patienten, die eine Genmutation des Dyskerins aufweisen, besitzen ein hohes Risiko an Krebs zu erkranken, vor allem an Karzinomen im Kopf- und Nackenbereich, an Karzinomen der Haut und des Gastrointestinaltraktes als auch an Lymphomen und Leukämie (Alter et al., 2009). Aber auch eine erhöhte Expression von Dyskerin scheint eine Rolle bei der Tumorprogression zu spielen. So konnten Sieron et al. zeigen, dass Dyskerin im Prostatakarzinom überexprimiert wird und dabei mit der Progression des Tumors assoziiert ist. Ein *Knockdown* von Dyskerin mit Hilfe von siRNA in Prostatakarzinomzelllinien führt zu einer verminderten Proliferation der Zellen. Daher vermuten Sieron et al. eine Beteiligung des Dyskerins am schnellen Tumorwachstum von Prostatakarzinomzellen (Sieron et al., 2009). Im Leberzellkarzinom korreliert die Überexpression von Dyskerin mit einem weiter fortgeschrittenen Krebsstadium und einer schlechteren Prognose für die Patienten. Vergleiche zwischen Leberzellkarzinompatienten zeigen, dass Patienten mit einer hohen Dyskerinexpression eine signifikant niedrigere Fünfjahresüberlebensrate besitzen als Patienten mit einer geringen Dyskerinexpression (Liu et al., 2012). Laut Alawi et al. lässt sich auch in oralen Plattenepithelkarzinomen und in immortalisierten und transformierten Keratinozyten eine Überexpression von Dyskerin beobachten. Die Überexpression von Dyskerin korreliert dabei mit einer gesteigerten Proliferation der Zellen. Dieser Effekt ist unabhängig von der TERT (englisch: *telomerase reverse transcriptase*) oder der Telomerase Aktivität (Alawi et al., 2011). Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, denn neben der Interaktion von c-Fos mit Dyskerin induziert die Kollagen XVI Überexpression in OSCC Zellen auch eine gesteigerte nukleäre Proteinlokalisierung von Dyskerin. Schon Ratzinger et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression von Kollagen XVI in OSCC Zellen über Integrinaktivierung zu einem proliferativen Phänotyp der Zellen führt (Ratzinger et al., 2011). Möglicherweise spielt bei der Steigerung der Proliferation auch die Kollagen XVI vermittelte Dyskerinexpression eine Rolle. Ob die Regulierung der Dyskerinexpression direkt über die Kollagen XVI/Integrin/ILK/AP-1 Achse oder über einen anderen Kollagen XVI/Integrin vermittelten Signalweg bewerkstelligt wird, muss in weiterführenden Untersuchungen beantwortet werden.

IV.1.1. Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigt der erste Teil dieser Arbeit, dass eine Überexpression von Kollagen XVI in OSCC Zellen zur verstärkten Genexpression und Sekretion der MMP9 führt, wobei Kollagen XVI autokrin auf die Zellen einwirkt (siehe Abb. 30): Nach der Kollagen XVI vermittelten Aktivierung der Zelloberflächenrezeptoren Integrin $\beta 1$ (Eble et al., 2006; Ratzinger et al., 2011) kommt es zur Aktivierung der ILK. Dabei führt die Integrinaktivierung zunächst zur verstärkten Interaktion der ILK mit Kindlin-1 und der dadurch vermittelten Rekrutierung der ILK/Kindlin-1 Komplexe in fokale Adhäsionskontakte. Dort kommt es zur Aktivierung der ILK und der anschließenden Phosphorylierung und Aktivierung der Akt/PKB. Im Folgendem führt dies zur Aktivierung und Translokalisierung des Transkriptionsfaktors AP-1 in den Nukleus. AP-1 bindet im Nukleus an seine Konsensussequenz im MMP9 Promotor und steigert dadurch die MMP9 Genexpression. Schließlich führt dies zur vermehrten Proteinexpression und Sezernierung von MMP9 in Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen, was die Invasivität dieser Zellen steigert.

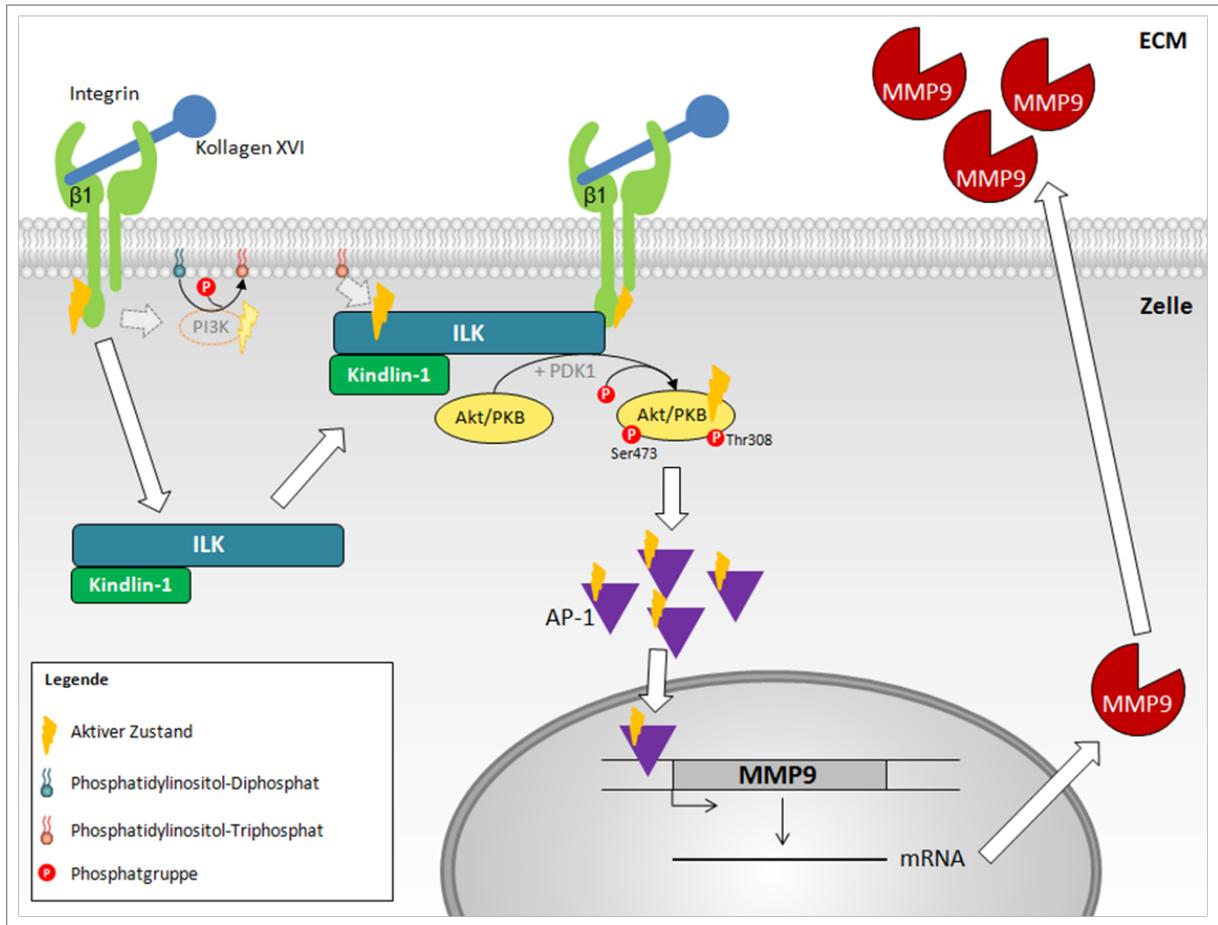


Abb. 30: Hypothetisches Modell des Kollagen XVI induzierten Signalweges, der zu MMP9 Genexpression und Sekretion in OSCC Zellen führt

Durch die Bindung von Kollagen XVI an $\alpha\beta 1$ Integrine kommt es in der Zelle zur Interaktion der ILK mit Kindlin-1. Dies bewirkt die Rekrutierung des ILK/Kindlin-1 Komplexes in fokale Adhäsionskontakte. Dort kommt es zur PIP3 vermittelten Aktivierung der ILK. Die aktive ILK interagiert mit Akt/ PKB, agiert als PDK2 und phosphoryliert Akt/PKB an dem Serinrest 473. Die PDK1 phosphoryliert Akt/PKB an ihrem Threoninrest an Position 308. Durch die Doppelphosphorylierung wird Akt/PKB aktiv und es kommt folglich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktor AP-1. Aktives AP-1 transloziert in den Zellkern, bindet an seine Konsensussequenz (TRE-Sequenz: 5'-TGAGTCT-3') im Promotorbereich des MMP9 Gens, was zu einer verstärkten Genexpression und anschließenden Proteinexpression und Sekretion von MMP9 führt.

Abbildung vom Verfasser dieser Arbeit erstellt

IV.2. Die NC11-Domäne und die vaskuläre Mimikry

In Zellkulturüberständen von Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen (COLXVI Zellen) sind neben dem Volllänge Kollagen XVI auch verschieden große, N-terminale Fragmente von Kollagen XVI zu detektieren. In nicht unerheblicher Menge lässt sich vor allem die 35 kDa große NC11-Domäne in Zellkulturüberständen der COLXVI Zellen nachweisen (nachgewiesen mit Hilfe massenspektrometrischer Untersuchung). In der Literatur lassen sich viele Hinweise auf fragmentierte Kollagene finden. Diese Fragmente gehören zu den Matrikryptinen, eine Klasse von Fragmenten aus extrazellulären Matrixproteinen, die bioaktiv sind. Eine Vielzahl dieser Matrikryptine beeinflussen Wachstum und invasive Eigenschaften von Tumoren (siehe Kapitel I.6. und (Ricard-Blum, 2011a; Ricard-Blum and Salza, 2014)). Das bekannteste Beispiel für ein natürlich vorkommendes Kollagenfragment mit biologischer Aktivität ist Endostatin. Es wurde erstmals von O'Reilly et al. 1997 beschrieben, der es in Kulturüberständen von Hämangio-endotheliumzellen entdeckte. Endostatin ist ein Fragment der NC1-Domäne von Kollagen XVIII und inhibiert die Proliferation und Migration von Endothelzellen, besitzt Angiogenesehemmende Eigenschaften und fungiert als Tumorsuppressor (O'Reilly et al., 1997; Bellon et al., 2004).

In Untersuchungen von rekombinantem Kollagen XVI konnten Tillet et al. N-terminale Kollagen XVI Fragmente nachweisen, unter anderem auch die 35 kDa große NC11-Domäne (Tillet et al., 1995). Zudem konnten auch Kassner et al. Trunkierungen von rekombinantem Kollagen XVI in Zellkulturmedium von stabil transfizierten HEK 293 EBNA Zellen nachweisen (Kassner et al., 2004). Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein.

Die NC11-Domäne ist im Vergleich zu den anderen NC Domänen von Kollagen XVI mit 312 Aminosäuren relativ groß und enthält eine TSPN Domäne und eine Prolin-Arginin-reiche Proteinregion. Zudem ist die NC11-Domäne gegenüber proteolytischem Abbau durch neutrale Proteasen wie beispielsweise Trypsin resistent (Tillet et al., 1995; Kassner et al., 2004). Daher scheint die NC11-Domäne von Kollagen XVI ein mögliches Matrikryptin zu sein. Um die funktionellen Aspekte dieses potentiellen Matrikryptins auf die Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms zu untersuchen, wurde die Expression der NC11-Domäne von Kollagen XVI in OSCC Zellen induziert. Dabei wurde ein GFP-Reportersystem

verwendet, das zur genaueren intrazellulären Lokalisation der NC11-Domäne ein NC11-GFP Fusionsprotein generiert. Dieses Reportersystem ist in der Zellbiologie weit verbreitet und wird zur Analyse der subzellulären Proteinlokalisierung in lebenden Zellen verwendet (Lippincott-Schwartz et al., 2001; Snapp, 2005). Die NC11-Domäne lagert sich vor allem an der Zellmembran der OSCC Zellen an und ist im Inneren der Zellen an zytoplasmatischen Strukturen lokalisiert. Interessanterweise können in Mock Kontrollzellen, die nur GFP exprimieren, vor allem grün fluoreszierende Signale im Zellkern detektiert werden. Diese nukleäre Lokalisation von GFP konnte auch von Seibel et al. beobachtet werden. Dabei scheint GFP nicht aktiv in den Kern transportiert zu werden, sondern passiv durch die Kernporen zu diffundieren (Seibel et al., 2007). Ob GFP im Nukleus zelluläre Eigenschaften beeinflussen kann, konnte bislang nicht gezeigt werden.

Aufgrund der induzierten NC11 Expression in OSCC Zellen verändern die Zellen ihren Phänotyp: Sie sind wesentlich kleiner, proliferieren weniger und ihre migratorischen Fähigkeiten sind verringert. Im Allgemeinen nehmen Matrikryptine auf molekularer Ebene Einfluss auf die Proliferation, Migration, Adhäsion und Zellmorphologie von Zellen (Ricard-Blum and Salza, 2014). Väisänen et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die abgespaltene Ektodomäne des membranständigen Kollagen XIII die Zelladhäsion, Migration und Proliferation von Fibrosarkomzellen negativ beeinflusst (Väisänen et al., 2004). Bei Keratinozyten verursachte eine verstärkte Abspaltung der Ektodomäne von Kollagen XVII eine verminderte Zellmotilität (Franzke et al., 2002).

In *Colony Forming Assays* bilden NC11 überexprimierende OSCC Zellen eine wesentlich höhere Anzahl an Kolonien, allerdings sind diese aber auch wesentlich kleiner als die der Kontrollzellen. Zum Einen zeigt dies, dass die NC11-Domäne von Kollagen XVI das Zellwachstum, das unabhängig von der Zellverankerung ist, fördert und folglich die klonale Expansion von OSCC Zellen beeinflusst. Zum Anderen scheinen NC11 exprimierende Zellen ihre klonale Expansion nach einer gewissen Zeit zu stoppen, was auf eine Kontaktinhibition oder auf ein höheren Differenzierungsgrad der Zellen schließen lässt. Dies würde auch mit dem beobachteten Proliferationsmuster der NC11 exprimierenden Zellen in 2D Kultur übereinstimmen. Dort bilden NC11 exprimierende OSCC Zellen *Zellpatches*, deren Zellen im Inneren ihre Proliferation stoppen, während sich die Zellen im Randbereich

weiter ungehindert teilen. Einen Zusammenhang zwischen einem verstärkten Zellwachstum, das unabhängig von der Zellverankerung ist, und vaskulogener Mimikry konnten schon Hardy et al. in Melanomzellen feststellen (Hardy et al., 2010). Vaskulogene Mimikry bezeichnet einen Vorgang, in dem Tumorzellen Endothelzellen imitieren und vaskulogene Kanäle im Tumor bilden, um diesen mit Blut zu versorgen (Folberg et al., 2000; Hendrix et al., 2003; Folberg and Maniotis, 2004; Chung et al., 2010; Paulis et al., 2010). Bei der Bildung solcher Gefäß-ähnlichen, von Zellen umgebenen Hohlräumen ist es unabdingbar, dass sich die Zellen in einem gewissen Maße differenzieren. Der Proliferationsstopp der Zellen, die einen intakten Gefäß-ähnlichen Abschnitt bilden und somit im engen Kontakt miteinander stehen, wäre der Bildung gefäßähnlichen Hohlräumen förderlich. Würden diese Zellen sich weiterhin unkontrolliert teilen, käme es zu der Bildung eines unorganisierten Zellhaufens, der schließlich die neugebildeten vaskulogenen Kanäle wieder schließen würde. Zellen an den Rändern der neu gebildeten Gefäß-ähnlichen Abschnitte müssten, wie die Zellen an den Rändern der *Zellpatches* von NC11 exprimierenden OSCC Zellen, nach dieser Theorie weiterhin proliferieren, damit die vaskulären Kanäle weiter wachsen könnten (siehe Abb. 31).



Abb. 31: Theoretisches Modell zur Bildung vaskulärer Kanäle während der vaskulogenen Mimikry
Im mittleren, intakten Kanalabschnitt stoppen die Zellen ihre Proliferation durch Kontaktinhibition. An den äußeren Rändern des Kanalabschnittes sind die Zellen nicht vollständig von anderen Zellen umgeben, folglich findet keine Kontaktinhibition statt und die Zellen teilen sich. Dadurch wächst der Kanal weiter.

Abbildung vom Verfasser dieser Arbeit erstellt

Mittlerweile ist es weitgehend anerkannt, dass die proteolytische Spaltung von Makromolekülen der extrazellulären Matrix ein essentieller Schritt in der Initiierung von Tumorinvasion und Angiogenese ist. Während der Neubildung von vaskulogenen Kanälen spielen Matrikryptine eine wichtige Rolle. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Matrikryptine wichtige Funktionen von Endothelzellen wie Zelladhäsion, Migration und Proliferation beeinflussen können (Bellon et al., 2004). Daher könnten Matrikryptine auch einen Einfluss auf die Ausbildung der vaskulogenen Mimikry in Tumoren haben. Aus diesem Grund wurde getestet, ob die NC11-Domäne von Kollagen XVI, ein mögliches Matrikryptin, bei OSCC Zellen die vaskulogene Mimikry induzieren kann.

Tatsächlich führte die NC11 Expression zur Bildung von Endothel-ähnlichen, netzförmigen Wachstumsmustern bei OSCC Zellen, die auf GFR Matrigel kultiviert wurden. Matrigel besteht aus einer Anzahl von ECM Proteinen, die aus Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkom extrahiert wurden. Hauptsächlich besteht es aus Laminin, Kollagen IV und Enactin und dient als Ersatz für die Basalmembran zur Kultivierung von Zellen (Hughes et al., 2010). Ursprünglich diente die Kultivierung auf GFR Matrigel als Assay um die angiogene Aktivität von vaskulären Endothelzellen *in vitro* zu testen und wurde als *Tube Formation Assay* bezeichnet. Mittlerweile wird der Assay auch zur Bestimmung des vaskulären Potentials von Tumorzellen verwendet. Die Bildung von netzförmigen Wachstumsmustern und Kanälen *in vitro* korreliert dabei mit der beobachteten vaskulogenen Mimikry in Xenografttransplantaten, die aus den selben Tumorzellen bestehen. Daher dient der *Tube Formation Assay* heutzutage als Test für die vaskulogene Aktivität von Tumorzellen und als Indikator für das Potential dieser Zellen, den Prozess der vaskulogenen Mimikry zu vollziehen (Francescone et al., 2012). Folglich scheint die NC11-Domäne von Kollagen XVI die vaskulogene Aktivität der OSCC Zellen zu steigern und schließlich die vaskulogene Mimikry in Plattenepithelkarzinomen zu fördern. Während NC11 überexprimierende OSCC Zellen nach der Kultivierung auf GFR Matrigel Netze ausbildeten, waren Zellen, die das Volllänge Kollagen XVI überexprimierten, nur in geringem Maße dazu in der Lage. Hier konnten nur in den Randbereichen Netzstrukturen beobachtet werden. Dies lässt sich erklären, wenn man bedenkt, dass auch in den Zellkulturüberständen von Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen das NC11 Fragment in niedriger Konzentration vorhanden ist.

Ein weiterer Hinweis auf die Induktion der vaskulogenen Mimikry durch die NC11-Domäne geben Analysen der Genexpression verschiedener endothelzell-assoziiierter Marker in OSCC Zellen. Sowohl während der Kultivierung der OSCC Zellen in Zellkulturflaschen aus Polystyren (2D Kultivierung) als auch während der Kultivierung der OSCC Zellen auf GFR Matrigel (3D Kultivierung) bewirkt die Expression der NC11-Domäne eine erhöhte Genexpression des *VEGFR1* und des *uPa Rezeptors*. Die 3D Kultivierung bewirkt zudem in NC11 überexprimierenden OSCC Zellen eine verstärkte *VEGFR2* Genexpression. Diese Ergebnisse werden durch Proteinexpressionsanalysen bestätigt: Nach der 2D Kultivierung wird auch hier eine deutlich erhöhte Proteinexpression des wichtigen vaskulären Rezeptors VEGFR1 und des uPa Rezeptors in NC11 exprimierenden OSCC Zellen beobachtet. VEGFR2 ist auf Proteinebene in 2D Kultur auch erhöht. Zudem zeigen Färbungen von 3D Netzen eine deutlich erhöhte Proteinexpression der vaskulären Rezeptoren VEGFR1, VEGFR2 und des uPa Rezeptors in NC11 exprimierenden OSCC Zellen. Die Diskrepanz zwischen der Genexpression und der Proteinexpression des VEGFR2 in 2D Kultur lässt sich durchaus erklären. In zahlreichen Studien zeigt sich, dass die Proteinexpression nicht immer proportional zur Genexpression ist. In Säugetieren ist die Proteinkonzentration in 60% aller Fälle nicht allein durch die Quantität der kodierenden mRNA erklärbar. Vielmehr spielen regulatorische, posttranskriptionelle Prozesse eine wesentliche Rolle an der Endkonzentration eines Proteins (Vogel and Marcotte, 2012). Beispielsweise beeinflussen die Stabilität der mRNA, die Sekundärstruktur der mRNA und die Verfügbarkeit von Ribosomen die Translationsrate. Zudem nehmen auch die Proteinhalbwertszeit und -stabilität Einfluss auf die Endkonzentration von Proteinen (Maier et al., 2009). Bei membranständigen Rezeptoren kommt noch häufig der Recyclin-Zyklus hinzu, der dazu führt, dass Rezeptoren im Innerem der Zellen von gebundenen Liganden gelöst werden und wieder als ungebundene, recycelte Rezeptoren an die Zelloberfläche gelangen (Maxfield and McGraw, 2004).

Während der vaskulogenen Mimikry spielen die VEGFRs eine entscheidende Rolle. Beispielsweise bewirkt der *Knockdown* des VEGFR1 in Melanomzellen eine vollständige Aufhebung der netzartigen Wachstumsstruktur im *Tube Formation Assay* (Vartanian et al., 2011). Auch Frank et al. beschreiben VEGFR1 als kritischen Regulator der vaskulogenen Mimikry im Melanom. Melanomzellen, die zur

vaskulogenen Mimikry befähigt sind, exprimieren verstärkt VEGFR1. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass die Entstehung der vaskulogenen Mimikry *in vivo* durch den *Knockdown* von VEGFR1 verhindert wird (Frank et al., 2011). Zudem scheint VEGFR1 auch an der vaskulogenen Mimikry von Merkelzellkarzinomen beteiligt zu sein. Sowohl in experimentell induzierten Tumoren als auch in histologischen Untersuchungen von Tumoren, die aus Patienten isoliert wurden, findet man ein Netzwerk, das den vaskulogenen Mimikrynetzwerken von Melanomen sehr ähnelt und mit einer VEGFR1 Expression assoziiert ist (Lezcano et al., 2014). Des Weiteren kommt es in Glioblastomzellen zur vaskulogenen Mimikry durch die Aktivierung des VEGFR2 (Francescone et al., 2012). Ergänzend dazu zeigen Yao et al., dass der *Knockdown* von VEGFR2 in Glioblastomzellen, die normalerweise zur vaskulogenen Mimikry befähigt sind, die Fähigkeit dieser Zellen Gefäß-ähnliche Hohlräume und Netzwerke zu bilden, signifikant reduziert (Yao et al., 2013). Auch unsere Ergebnisse deuten auf die Beteiligung der VEGFR an der vaskulogenen Mimikry. Nach genereller Inhibition der VEGFR sind die NC11 überexprimierenden OSCC Zellen nicht mehr zur vaskulogenen Mimikry befähigt. Interessanterweise können in den NC11 überexprimierenden OSCC Zellen durch Genexpressions- und Proteinexpressionsanalysen nur sehr wenig bis keine Liganden der Rezeptoren nachgewiesen werden. Die erforderlichen Liganden der VEGFR stammen in unseren Experimenten wahrscheinlich aus dem fötalen Kälberserum. Die hohe Sensitivität der Netzbildung bezüglich der Lagerung des fötalen Kälberserums spiegelt dies deutlich wieder. Je länger das fötale Kälberserum aufgetaut ist, desto weniger ausgeprägt ist die Netzbildung der Zellen. Zudem verhindert eine Hitzeinaktivierung des fötalen Kälberserums die Ausbildung der vaskulogenen Netze.

Neben VEGFR1 und VEGFR2 gibt es auch Hinweise für die Beteiligung des uPa Rezeptors an der Tumorangio-genese. Das uPa-uPa Rezeptor System fördert beispielsweise die Angiogenese des Glioblastoms. Die Aktivierung dieses Systems bei Glioblastomzellen an der Invasionsfront führt zur Initiierung einer von Integrinen vermittelten Signalkaskade. Zudem hat die Interaktion von uPa mit seinem Rezeptor die Aktivierung von Plasmin zur Folge. Diese Protease ist in die Degradierung der extrazellulären Matrix involviert. An den uPa Rezeptor können auch Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Vitronektin, binden, was wiederum eine Aktivierung von anderen Signalkaskaden zur Folge hat (Kanse et al., 1996; Waltz et al., 1997).

Durch die Initiierung dieser Signalkaskaden kommt es schließlich zur Hochregulation von proangiogenen Faktoren (Lakka et al., 2005). MacDonald et al. konnten zeigen, dass eine erhöhte Expression des uPa Rezeptors auf der Zelloberfläche verschiedener humaner Gehirntumorzelllinien mit einer verstärkten Invasivität der Zellen korreliert (MacDonald et al., 1998). Die Blockierung des uPa Rezeptors führt *in vivo* im humanen Mammakarzinom zu einer Reduktion des Tumorwachstums und der Tumorangiogenese (Tressler et al., 1999). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vermindert der *Knockdown* des uPa Rezeptors mit Hilfe eines hp-RNA Expressionsplasmids die angiogene Aktivität von Gliomzellen (Gondi et al., 2007). Da der uPa Rezeptor eine entscheidende Rolle in der Angiogenese von Tumoren spielt und auf unterschiedlichste Weise diese Angiogenese fördert, könnte die durch die NC11-Domäne von Kollagen XVI hochregulierte Expression des uPa Rezeptors durchaus die vaskulogene Mimikry im Plattenepithelkarzinom begünstigen.

Neben der gesteigerten Genexpression verschiedener Endothel-assoziiierter Gene (VEGFR1, VEGFR2 und uPa Rezeptor) kann in NC11 exprimierenden OSCC Zellen auch eine reduzierte Genexpression des von Willebrand Faktors (vWF) nachgewiesen werden. Der vWF ist ein Glykoprotein, das vor allem von Endothelzellen produziert wird. Zusammen mit dem Blutgerinnungsfaktor VIII spielt der vWF eine wichtige Rolle in der Blutstillung. Kommt es zu einer Verletzung der Innenwand des Endothels, kann der vWF an Proteine der subendothelialen ECM, vor allem Kollagen I, binden. Dadurch wird der vWF aktiviert und Thrombozyten können an ihm haften. Der vWF ist somit das Bindeglied zwischen Thrombozyten und verletzter Gefäßwand (Ruggeri, 2007). Da es sich bei den vaskulogenen Kanälen im Tumorgewebe nicht um Gefäße handelt, die mit Endothelzellen ausgekleidet sind, sondern um Tumorzellen umgebene Hohlräume, könnte die Expression des vWF sich negativ auf die Entwicklung des vaskulären Systems des Tumors auswirken. Höchstwahrscheinlich würde der vWF an Proteine der extrazellulären Matrix des Tumors binden. Kommt es anschließend zum Anschluss der vaskulogenen Tumorzellen-umgebene Kanäle mit dem vaskulären System des Patienten, würden die im Blut enthaltenen Thrombozyten an den gebundenen vWFs haften bleiben. Dies würde die neuen, von Tumorzellen gebildeten Kanäle verstopfen. Die Durchblutung des Tumorgewebes wäre damit nicht gewährleistet. Folglich würde eine erhöhte vWF Expression der vaskulogenen Mimikry entgegen wirken.

Während man in 2D kultivierten NC11 exprimierenden OSCC Zellen eine verringerte VEGF A Genexpression beobachten kann, unterscheiden sich nach 3D Kultivierung NC11 exprimierende OSCC Zellen nicht von den Kontrollzellen in ihrer VEGF A Genexpression. Somit gleicht sich die VEGF A Genexpression in NC11 exprimierenden OSCC Zellen bei der 3D Kultivierung wieder den Kontrollwerten an. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Bildung von Endothel-ähnlichen Netzen die NC11 vermittelte Expressionsreduktion von VEGF A in 3D Kultur auf hebt. Offen bleibt, ob die Sezernierung von VEGF A daraufhin in NC11 exprimierenden OSCC Zellen auch steigt. Dies wäre ein Indiz eine indirekte vaskulogene Wirkung der NC11-Domäne. Denn damit würde nicht nur die Expression der wichtigen vaskulären Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 durch die NC11-Domäne induziert werden, sondern durch die Bildung der vaskulogene Netze auch deren Aktivierung durch die autokrine Sekretion eines ihrer Liganden, des VEGF A.

Im Allgemeinen scheint die NC11-Domäne von Kollagen XVI die vaskulogene Mimikry von OSCC Zellen zu begünstigen. Dabei ist zu erwähnen, dass die vaskulogene Mimikry in Krebserkrankungen mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert ist: Im Gliom korreliert ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit dem Auftreten der vaskulogenen Mimikry. Zudem weisen Patienten, bei denen ein Gliom mit vaskulogener Mimikry diagnostiziert wurde, eine geringere Überlebensrate auf als bei Gliompatienten ohne vaskulogener Mimikry (Liu et al., 2011). Cao et al. konnten 2013 in einer Studie zeigen, dass die Ausbidung von vaskulogener Mimikry die Prognose von Patienten verschiedener Krebsarten entscheidend verschlechtert (Cao et al., 2013). Die 5-Jahresüberlebensrate bei Patienten mit vaskulogener Mimikry liegt im Durchschnitt bei nur 31%. Im Vergleich dazu liegt die 5-Jahresüberlebensrate von Krebspatienten bei denen keine vaskulogene Mimikry nachgewiesen werden kann, bei etwa 56%. Weitere Analysen legen einen Zusammenhang zwischen der vaskulogenen Mimikry und der Metastasenbildung offen. Melanompatienten, bei denen Metastasen nachgewiesen werden, zeigen mit einer Wahrscheinlichkeit von 45,3% auch vaskulogene Mimikry, während Patienten ohne Metastasen nur zu 23,1% vaskulogene Mimikry aufweisen.

Neben anderen Kollagen XVI Fragmenten konnte in dieser Arbeit auch ein Fragment in Seren von Plattenepithelkarzinompatienten nachgewiesen werden, das in seinem molekularen Gewicht mit der NC11-Domäne von Kollagen XVI korrespondiert. Da es

sich um ein N-terminales Fragment handelt und die NC11-Domäne die N-terminale NC Domäne von Kollagen XVI ist, vermuten wir, dass es sich bei diesem Fragment um die NC11-Domäne von Kollagen XVI handelt. Zudem bestätigte ein Kollagenase Verdau, dass es sich bei den beobachteten Fragmenten tatsächlich um Kollagenfragmente handelt. Dabei ist zu bedenken, dass auch die N-terminale NC11-Domäne Kollagenaseschnittstellen besitzt und somit durch Kollagenasen abgebaut werden kann. Die Seren von OSCC Patienten enthalten im Vergleich zu Seren von gesunden Individuen verstärkt die NC11-Domäne. Dies ist ein Indiz für die Fragmentierung von Kollagen XVI *in vivo*. Möglicherweise könnte die NC11-Domäne als prognostischer Faktor dienen. Allerdings bleibt abzuwarten, ob das Auftreten der NC11-Domäne in Blutseren von Plattenepithelkarzinompatienten mit der Ausbildung von vaskulogener Mimikry und damit mit einer schlechten Prognose für die Patienten korreliert.

Auch die Wirkungsweise der NC11-Domäne bleibt offen: Interagiert die NC11-Domäne exogen mit Zelloberflächenrezeptoren oder bindet die NC11-Domäne schon im Innerem der Zelle an Effektoren? Möglicherweise spielen dabei die Thrombospondin N-terminal-ähnliche (TSPN) Proteinregion und Prolin-Arginin reiche Proteinregion (PARP) der NC11-Domäne eine Rolle. Li und Kollegen konnten zum Beispiel zeigen, dass das Prolin-Arginin reiche Peptid PR39 ein Regulator der Angiogenese ist. Dabei fördert PR39 *in vitro* die Bildung von vaskulären Strukturen und erhöht in Mäusen die myokardiale Vaskularisation (Li et al., 2000). Die pro-angiogene Wirkung des PR39 wurde auch von Gaczynska et al. bestätigt (Gaczynska et al., 2003). Zudem besitzt auch die TSPN Domäne einige pro-angiogene Eigenschaften. Sie vermittelt die Aufnahme und damit den Abbau des anti-angiogenen Thrombospondin-1 und Thrombospondin-2 und besitzt anti-adhäsive Aktivität (Tan et al., 2006).

IV.2.1. Schlussfolgerung

Zusammenfassend beschreibt der zweite Teil dieser Arbeit die vaskulogene Wirkung der NC11-Domäne von Kollagen XVI auf OSCC Zellen (siehe Abb. 32). Dabei zeigt sich, dass die Überexpression der NC11-Domäne eine Induktion der Gen- und Proteinexpression des Tumor- und Endothel-assoziierten VEGFR1 und VEGFR2 und des uPa Rezeptors die vaskulogene Mimikry der OSCC Zellen bewirkt.

Funktionell äußert sich die Überexpression der NC11-Domäne in einem unterschiedlichen Proliferationsmuster, einer kleineren Zellgröße, einer verminderten Proliferationsrate und einer Abnahme der Migrationsaktivität der OSCC Zellen. Zudem verstärkt eine Überexpression der NC11-Domäne die Fähigkeit der OSCC Zellen zur klonalen Expansion. Des Weiteren werden die Wachstumsstrukturen der OSCC Zellen beeinflusst. Durch die NC11 Überexpression besitzen die OSCC Zellen die Fähigkeit zur vaskulogenen Mimikry und bilden bei der 3D Kultivierung auf GFR Matrigel Endothel-ähnliche Netze aus. Nach Inhibition der VEGF Rezeptoren zeigt sich, dass die vaskulogene Mimikry der NC11 überexprimierenden OSCC Zellen VEGFR vermittelt ist.

Bei der Untersuchung von OSCC-Patientenseren können neben dem Volllänge-Kollagen XVI spezifische Kollagen XVI Trunkierungen detektiert werden, die möglicherweise als Matrikryptine definiert werden können. Außer 120, 80, 60, 50 und 40 kDa großen N-terminalen Fragmenten kann auch ein 35 kDa Fragment, das aufgrund seines molekularen Gewichts die NC11-Domäne sein könnte, in Patientenseren nachgewiesen werden. Vergleiche mit Kontrollseren gesunder Individuen lassen eine verstärkte Abspaltung der NC11-Domäne von Kollagen XVI in Seren von OSCC Patienten vermuten.

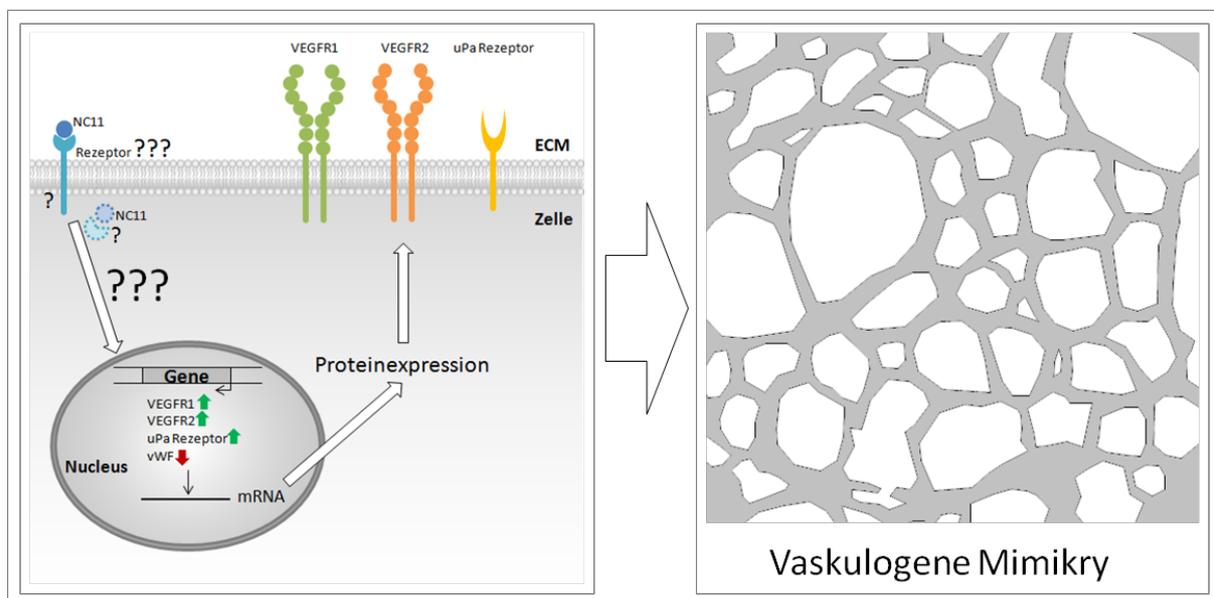


Abb. 32: Hypothetisches Modell zur NC11 induzierten vaskulogenen Mimikry in OSCC Zellen

NC11 induziert die Genexpression des Tumor- und Endothel-assoziierten VEGFR1, VEGFR2 und des uPa Rezeptors und reduziert die Genexpression des vWF. Dadurch kommt es zur Proteinexpression des VEGFR1, VEGFR2 und des uPa Rezeptors. Dies führt bei der 3D Kultivierung auf GFR Matrigel zur Bildung von Endothel-ähnlichen Netzen, der vaskulogenen Mimikry.

Abbildung vom Verfasser dieser Arbeit erstellt

Anhang

A.I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AFT	englisch: <i>activating transcription factor</i>
Akt/PKB	Akt/Proteinkinase B
AP-1	Aktivatorprotein 1
Asn	Asparagin
BCA	Bicinchoninsäure englisch: <i>bicinchoninic acid</i>
BMP	englisch: <i>bone morphogenic protein</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	Cyclin-abhängigen Kinase englisch: <i>Cyclin-dependent kinase</i>
COL Domäne	Kollagendomäne englisch: <i>collagenous domain</i>
COLXVI	Kollagen XVI
CRR Domäne	cysteinreiche Wiederholungsdomäne englisch: <i>cystein-rich repeat</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
D-CDK	Cyclin D - Cyclin-abhängigen Kinase - Komplex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	extrazelluläre Matrix englisch: <i>extracellular matrix</i>
EGF	epidermalen Wachstumsfaktor englisch: <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor englisch: <i>epidermal growth factor receptor</i>
FACITs	Fibrillen-assoziierte Kollagene mit unterbrochenen Triplehelices englisch: <i>fibril-associated collagens with interrupted triple helices</i>
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FERM	englisch: <i>4.1 protein, ezrin, radixin, moesin</i>
FKS	fötales Kälberserum
GAGs	Glykosaminoglykane

Abkürzung	Bedeutung
GF	Wachstumsfaktor englisch: <i>growth factor</i>
GFP	englisch: <i>green fluorescent protein</i>
GFR	Wachstumsfaktor reduziert englisch: <i>growth factor reduced</i>
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
HCC	Hepatozellulären Karzinoms englisch: <i>hepatocellular carcinoma</i>
HOKs	humane orale Keratinozyten
HPV	humaner Papillomviren
Hyp	4-Hydroxyprolin
ILK	englisch: <i>integrin-linked kinase</i>
luc	Luziferase
MACITS	Membran-assoziierte Kollagene mit unterbrochenen Triplehelices englisch: <i>membran-associated collagens with interrupted triple helices</i>
MFA	englisch: <i>musculoaponeuric fibrosarcoma</i>
MIDAS	Metallion-abhängigen Adhäsionsstelle englisch: <i>metal-ion-dependent adhesion site</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
MSCs	mesenchymale Stammzellen englisch: <i>mesenchymal stem cells</i>
MULTIPLEXINs	englisch: <i>multiple triple-helix domains and interruptions</i>
NC Domäne	nicht-Kollagendomäne englisch: <i>non-collagenous domain</i>
Neo	Neomycinresistenz
OSCC	orales Plattenepithelkarzinom englisch: <i>oral squamous cell carcinoma</i>
PARP	Prolin-Arginin-reiche Protein
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung englisch: <i>phosphate buffered saline</i>
PCI	University of Pittsburgh Cancer Institute
PDK1	PI3K-abhängige Kinase 1 englisch: <i>PI3K-dependent kinase 1</i>
PGs	Proteoglykane
PH	englisch: <i>pleckstrin homolgy</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase

Abkürzung	Bedeutung
PIP2	Phosphatidylinositol-(4,5)-Diphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat
PLA	englisch: <i>proximity ligation assay</i>
POD	Peroxidase
pRb	Retinoblastom-Protein
Pro	Prolin
PSI Domäne	Plexin-Semphorin-Integrin Domäne
Pten	englisch: <i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
qPCR	quantitativer Polymerase-Kettenreaktion
RGD-Sequenz	Arginin-Glycin-Asparaginsäure -Peptidsequenz
rlu	englisch: <i>relative light units</i>
RNP	Ribonukleotidproteinen
SCCHN	Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Nackenbereich englisch: <i>squamous cell carcinoma of head and neck</i>
SDS	englisch: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SPARC	sezernierte saure und Cystein-reiche Protein englisch: <i>secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
TERC	Telomerase RNA
TERT	englisch: <i>telomerase reverse transcriptase</i>
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor englisch: <i>transforming growth factor</i>
Thr	Threonin
TSPN Domäne	Thrombospondin N-terminal ähnliche Domäne englisch: <i>Thrombospondin N-terminal-like</i>
uPa	englisch: <i>Urokinase-type plasminogen activator</i>
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor englisch: <i>vascular endothelia growth factor</i>
VEGFR	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor englisch: <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
vWA Domäne	von Willebrand-Faktor A-ähnliche Domäne
vWF	von Willebrand-Faktor
WST	englisch: <i>water soluble tetrazolium</i>

A.II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematischer Aufbau eines mehrschichtigen keratinisierten oralen Platten-epithels (A) und eines mehrschichtigen nicht-keratinisierten oralen Plattenepithels (B)	8
Abb. 2:	Einteilung der Kollagene in Unterfamilien aufgrund ihrer supermolekularen Struktur und Lokalisation.....	18
Abb. 3:	Schematische Darstellung der molekularen Organisation von Kollagen XVI.....	21
Abb. 4:	Die verschiedenen Interaktionspartner von Kollagen XVI und seine Funktionen	23
Abb. 5:	Der ILK/Akt Signalweg.....	33
Abb. 6:	Kollagen XVI im Überstand von COLXVI Klonen und Mock Kontrollklonen	57
Abb. 7:	MMP9 Genexpression und Sezernierung von COLXVI Klonen und Mock Kontrollklonen.	59
Abb. 8:	Kollagen XVI Überexpression induziert MMP9 Genexpression und Sezernierung über ILK Aktivierung	61
Abb. 9:	PKB/Akt Phosphorylierung	62
Abb. 10:	Kollagen XVI Überexpression induziert ILK/Kindlin-1 Interaktion	63
Abb. 11:	ILK/Kindlin-1 Interaktion induziert MMP9 Expression.....	65
Abb. 12:	Promotoraktivität der jeweils unterschiedlich langen MMP9 Promotorfragmente.....	67
Abb. 13:	Kollagen XVI Überexpression führt zu einer Interaktion von c-Fos mit Dyskerin und induziert eine verstärkte nukleäre Lokalisation von JunB... ..	69
Abb. 14:	Inhibition der AP-1 Dimerisierung	70
Abb. 15:	Kollagen XVI Überexpression und Applikation von rekombinantem Kollagen XVI führen zur verstärkten Invasion von OSCC Zellen.....	72
Abb. 16:	Proteinexpression und Sezernierung des Fusionsproteins NC11-GFP in der OSCC Zelllinie PCI13	75
Abb. 17:	Lokalisierung des Fusionsproteins NC11-GFP und des GFPs in OSCC Zellen	76
Abb. 18:	Einfluss der NC11-GFP Induktion auf Wachstumsmuster von OSCC Zellen	77

Abb. 19: Einfluss von NC11-GFP auf OSCC Zellen: Zellgröße, Proliferation und Migration	78
Abb. 20: Einfluss von NC11-GFP auf die Fähigkeit von OSCC Zellen Kolonien zu bilden	79
Abb. 21: Vergleich der Proliferationsmuster zwischen NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen.....	80
Abb. 22: Vergleich der Wachstums-muster zwischen NC11-GFP Zellen und Mock Kontrollzellen kultiviert auf GFR Matrigel®	82
Abb. 23: Genexpression von Endothelzellen assoziierten Genen in 2D und 3D kultivierten NC11-GFP und Kollagen XVI überexprimierenden OSCC Zellen	85
Abb. 24: NC11-GFP Überexpression führt in 2D Kultur zur erhöhten Proteinexpression des VEGFR 1, VEGFR 2 und des uPa Rezeptors.....	87
Abb. 25: NC11-GFP Überexpression führt in 3D Kultur zur erhöhten Proteinexpression des VEGFR 1, VEGFR 2 und des uPa Rezeptors.....	88
Abb. 26: Blockierung der Endothel-ähnlichen, netzförmigen Wachstumsstrukturen durch spezifische Inhibition der VEGFRs oder durch Hitzeinaktivierung des FKC	90
Abb. 27: Nachweis von Kollagen XVI und seinen N-terminalen Fragmenten in Blutseren von OSCC Patienten und gesunden Individuen.	92
Abb. 28: Nachweis von Kollagen XVI in Blutseren von OSCC Patienten nach Kollagenaseverdau	93
Abb. 29: Möglicher Dimerisierungsmechanismus von c-Fos mit Dyskerin	105
Abb. 30: Hypothetisches Modell des Kollagen XVI induzierten Signalweges, der zu MMP9 Genexpression und Sezernierung in OSCC Zellen führt.....	108
Abb. 31: Theoretisches Modell zur Bildung vaskulärer Kanäle während der vaskulogenen Mimikry	111
Abb. 32: Hypothetisches Modell zur NC11 induzierten vaskulogenen Mimikry in OSCC Zellen.....	118

A.III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Matrikine und Matrikryptine, die aus Kollagenen hervor gehen.....	26
Tabelle 2	Zusammensetzung der Kulturmedien für die verwendeten Zellen	36

Tabelle 3	Sequenzcode der Protein kodierende cDNA Sequenz von humanem Kollagen XVI.....	38
Tabelle 4	Sequenzcode der cDNA Sequenz der NC11-Domäne von Kollagen XVI.....	39
Tabelle 5	Übersicht über die verwendeten Luciferase-Reporter-Vektoren	39
Tabelle 6	Primersequenzen für die Herstellung der MMP9-Promotorfragmente ...	44
Tabelle 7	Verwendete Primer zur Deletion der AP-1 Bindestelle im pGL4.17 (luc2/Neo) MMP9b Reporter-Vektor	45
Tabelle 8	Temperaturprofil für die Phusion™ Hot Start PCR.....	45
Tabelle 9	Zusammensetzung von LB-Medium Agar Platten; pH 7 mit NaOH eingestellt.....	45
Tabelle 10	Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die cDNA-Synthese	46
Tabelle 11	Temperaturprofil der quantitativen TaqMan-PCR.....	47
Tabelle 12	Reaktionsansatz der quantitativen Taqman-PCR	47
Tabelle 13	Für die quantitative PCR verwendete Primer und TaqMan-Sonden	47
Tabelle 14	Zusammensetzung der Trenn-, Sammelgele, des Elektronenpuffers und des 5xLaemmli-Puffers.....	50
Tabelle 15	Zusammensetzung des Blotpuffers	50
Tabelle 16	Zusammensetzung TBST	51
Tabelle 17	Zusammensetzung der gelatinehaltigen PAA Gele, Puffer und Lösungen.....	52
Tabelle 18	Für den PLA verwendete Antikörper.....	55

A.IV. Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Antigen	Spezies	Hersteller	Katalognummer	Konzentration	Verwendung
Akt/PKB	Kaninchen, polyklonal	SantaCruz	sc-1618-R	0,2 mg/ml	WB 1:200 16h 4°C
c-Fos	Kaninchen, polyklonal	SantaCruz	sc-52	0,2 mg/ml	WB 1:200 16h 4°C IF 1:100 16h 4°C
Dyskerin	Maus, monoklonal	SantaCruz	sc-365731	0,2 mg/ml	WB 1:200 16h 4°C IF 1:100 16h 4°C
GFP	Kaninchen, polyklonal	Thermo Fisher	A11122	2 mg/ml	WB 1:1000 16h 4°C
Histon H3	Kaninchen, monoklonal	Cell Signalling	4620	0,1 mg/ml	WB 1:100 16h 4°C

Antigen	Spezies	Hersteller	Katalognummer	Konzentration	Verwendung
ILK	Ziege, polyklonal	SantaCruz	sc-7516	0,2 mg/ml	WB 1:200 16h 4°C PLA 1:100 1h 37°C
JunB	Maus, monoklonal	SantaCruz	c-8051	0,2 mg/ml	WB 1:200 16h 4°C IF 1:100 16h 4°C
Ki67	Rabbit, polyklonal	Thermo Fisher	PA5-19462	1 mg/ml	IF 1:500 16h 4°C
Kindlin-1	Kaninchen, polyklonal	Abcam	ab68041	1 mg/ml	WB 1:200 16h 4°C PLA 1:100 1h 37°C
Kollagen XVI	Kaninchen, polyklonal	Sigma	HPA027237	0,2 mg/ml	WB 1:1000 16h 4°C
P-Akt/PKB	Kaninchen, polyklonal	SantaCruz	sc-7985_r	0,2 mg/ml	WB 1:500 16h 4°C
P-ILK	Kaninchen, polyklonal	SantaCruz	sc-130196	0,2 mg/ml	WB 1:200 16h 4°C
uPa Rezeptor	Kaninchen, monoklonal	Cell Signalling	12713	0,1 mg/ml	IHC 1:50 16h 4°C
VEGFR1	Kaninchen, polyklonal	Sigma	HPA014290	0,05 mg/ml	IHC 1:12,5 16h 4°C
VEGFR2	Kaninchen, monoklonal	Cell Signalling	9698	0,1 mg/ml	IHC 1:1600 16h 4°C
β-Aktin	Kaninchen, monoklonal	Abcam	ab8227	1 mg/ml	WB 1:10.000 16h 4°C

WB: Western Blot; IF: Immunfluoreszenzfärbung; PLA: Proximity Ligation Assay; IHC: Immunhistochemische Färbung

Sekundärantikörper	Hersteller	Katalognummer	Verwendung	Konjugat
Anti-Kaninchen IgG	Thermo Fisher	32460	WB 1:1000 1h RT	HRP
Anti-Kaninchen IgG	Thermo Fisher	A21069	IF 1:500 1h 37°C	Alexa Fluor 568
Anti-Maus IgG	Thermo Fisher	A11019	IF 1:500 1h 37°C	Alexa Fluor 568
Anti-Maus IgG	Thermo Fisher	A11017	IF 1:500 1h 37°C	Alexa Fluor 488
Anti-Maus IgG	Thermo Fisher	32430	WB 1:1000 1h RT	HRP
Anti-Ziege IgG	SantaCruz	sc-2033	WB 1:1000 1h RT	HRP

WB: Western Blot; IF: Immunfluoreszenzfärbung

A.V. verwendete Proteasen

Protease	Hersteller	Katalognummer
MMP9, aktiv	Millipore	PF024
Pro-MMP2	Millipore	PF023
Kollagenase D	Roche	11088866001
Kollagenase 2	PAA (Cölbe, Deutschland)	K21-240

A. VI. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben und die durch ihre Unterstützung und Motivation zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der größte Dank gilt **Herrn PD Dr. Richard Bauer**, ohne ihn wäre diese Arbeit nie in dieser kurzen Zeit entstanden. Vielen Dank für die engagierte Anleitung und Betreuung, für die konstruktiven Diskussionen, vielen hilfreichen Ideen und Ratschläge, die den Entstehungsprozess meiner Arbeit maßgeblich geformt haben, aber auch für das Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten. Danke für die gute Zusammenarbeit, für die Hilfe beim Formulieren und Korrigieren meiner Arbeit und für die Möglichkeit meine Kreativität ausleben zu können.

Ein weiteres herzliches Dankeschön gilt meiner Zweitgutachterin **Prof. Dr. Susanne Grässel** für die Hilfestellungen und die Anregungen zu meiner Arbeit. Auch möchte ich mich bei meiner Mentorin **Prof. Dr. Marina Kreuz** für die Unterstützung, Ermunterung und Beratung während meiner Kolloquien bedanken.

Zudem danke ich **Herrn Prof. Torsten Reichert**, der mir als Direktor der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Regensburg die Möglichkeit gegeben hat, an seinem Institut meine Dissertation zu erstellen.

Mein besonderer Dank gilt **Brigitta Hauer** und **Maxi Bleicher**, die mich so herzlich in ihr Team aufgenommen haben und bei denen ich mich vom ersten Tag an wohl gefühlt habe. Danke auch für die hilfreichen Tipps und Tricks im Labor, für die anregenden Gespräche und die herausragende praktische Unterstützung meiner Arbeit. Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des ZMB für ihre fachliche, wie auch freundschaftliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft herzlich bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken, auf deren Unterstützung ich mich stets verlassen kann und die zeitlebens hinter mir standen. An dieser Stelle möchte ich auch meinem Mann **Thomas** danken, für seinen unerschütterlichen Glauben an mich, für die Geborgenheit in der ich mich entfalten kann und dafür, dass er mir in dieser Zeit immer den Rücken frei gehalten hat.

A.VII. Beruflicher Werdegang

Promotion: 2012 bis 2015

Arbeit an der Doktorarbeit:

„Funktionelle Aspekte von Kollagen XVI und seiner NC11-Domäne bei der Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms“

an der Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie

Arbeitsgruppe: Richard Bauer

seit Januar 2013

Studentenvertreterin der Biomedical International Graduate School BIOMEDIGS der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg

Studium: November 2005 bis April 2012

Studium der Diplombiologie an der Universität Regensburg

Abschlussnote: 1.6

Schwerpunkte während des Hauptstudiums:

Genetik (Hauptfach)	1.0
Immunologie (Nebenfach)	2.0
Zoologie (Nebenfach)	1.3

Mai 2011 bis April 2012

Arbeit an der Diplomarbeit:

„Die Bedeutung der Makrophagenfusion für die Replikation des obligat intrazellulären Parasiten *Leishmania major*“

am Institut für Immunologie, Universität Regensburg;

Arbeitsgruppe: Infektionsimmunologie

Note: 1.7

August 2009 bis Januar 2010

Erasmus-Auslandsemester

an der University of Southern Denmark, Odense

Institute of Biology, Professor Steffen Madsen

Erasmus-Programm beinhaltete das Forschungspraktikum:

“Blocking of the water transport in the intestine of saltwater rainbow trout with mercury and tetraethylammonium“,

Aktive Teilnahmen an Konferenzen

DGMB 2013; Tübingen, Deutschland

Vortrag: "The influence of collagen XVI on cell growth and invasion in oral squamous cell carcinoma"

Forschungssymposium Experimentelle Orthopädie, Bad Abbach 2013, Deutschland

Vortrag: "Kollagene im Zellwachstum und der Invasion des oralen Plattenepithelkarzinoms"

DÖSAK, 2013; München, Deutschland

Vortrag: "Der Einfluss von Kollagen XVI auf Invasion und Proliferation des oralen Plattenepithelkarzioms"

DGMB 2014; Regensburg, Deutschland

Poster: "Collagen XVI fragments in oral squamous cell carcinoma: a new matrikine/matricryptin?"

Publikationen: *"Collagen XVI induces expression of MMP9 via modulation of AP-1 transcription factors and facilitates invasion of oral squamous cell carcinoma"*
Konstanze B. Bedal, Susanne Grässel, Peter J. Oefner, Joerg Reinders, Torsten E. Reichert and Richard Bauer in PLOSONE; 2014

"Functional characterization of water transport and cellular 1 localization of three aquaporin paralogs in the salmonid intestine"
SS Madsen, JH Olesen, K Bedal, MB Engelund, YM. Velasco-Santamaria and CK Tipsmark in Frontiers of Aquatic Physiology; 2011

A.VIII. Literatur

- ADAIR-KIRK, T.L., AND R.M. SENIOR. 2008. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40: 1101–1110.
- ADZHUBEI, A.A., M.J.E. STERNBERG, AND A.A. MAKAROV. 2013. Polyproline-II Helix in Proteins: Structure and Function. *Journal of Molecular Biology* 425: 2100–2132.
- AIKIO, M., I. ALAHUHTA, S. NURMENNEMI, J. SUOJANEN, R. PALOVUORI, S. TEPPU, T. SORSA, ET AL. 2012. Arresten, a Collagen-Derived Angiogenesis Inhibitor, Suppresses Invasion of Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 7: . Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3515547/> [Accessed September 2, 2014].
- AKAGI, A., S. TAJIMA, A. ISHIBASHI, Y. MATSUBARA, M. TAKEHANA, S. KOBAYASHI, AND N. YAMAGUCHI. 2002. Type XVI collagen is expressed in factor XIIIa+ monocyte-derived dermal dendrocytes and constitutes a potential substrate for factor XIIIa. *The Journal of investigative dermatology* 118: 267–274.
- ALAWI, F., AND P. LIN. 2011. Dyskerin is required for tumor cell growth through mechanisms that are independent of its role in telomerase and only partially related to its function in precursor rRNA processing. *Molecular Carcinogenesis* 50: 334–345.
- ALAWI, F., P. LIN, B. ZIOBER, AND R. PATEL. 2011. Correlation of dyskerin expression with active proliferation independent of telomerase. *Head & Neck* 33: 1041–1051.
- ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, AND P. WALTER. 2002. The Extracellular Matrix of Animals. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/> [Accessed July 25, 2014].
- ALTER, B.P., N. GIRI, S.A. SAVAGE, AND P.S. ROSENBERG. 2009. Cancer in dyskeratosis congenita. *Blood* 113: 6549–6557.
- ARGIRIS, A., M.V. KARAMOUZIS, D. RABEN, AND R.L. FERRIS. 2008. Head and neck cancer. *The Lancet* 371: 1695–1709.
- ASKARI, J.A., P.A. BUCKLEY, A.P. MOULD, AND M.J. HUMPHRIES. 2009. Linking integrin conformation to function. *Journal of Cell Science* 122: 165–170.
- BAATENBURG DE JONG, R.J., J. HERMANS, J. MOLENAAR, J.J. BRIAIRE, AND S. LE CESSIE. 2001. Prediction of survival in patients with head and neck cancer. *Head & neck* 23: 718–724.
- BAGAN, J., G. SARRION, AND Y. JIMENEZ. 2010. Oral cancer: Clinical features. *Oral Oncology* 46: 414–417.
- BARCZYK, M., S. CARRACEDO, AND D. GULLBERG. 2010. Integrins. *Cell and Tissue Research* 339: 269–280.
- BAUER, R., S. RATZINGER, L. WALES, A. BOSSERHOFF, V. SENNER, J. GRIFKA, AND S. GRÄSSEL. 2011. Inhibition of Collagen XVI Expression Reduces Glioma Cell Invasiveness. *Cellular Physiology and Biochemistry* 27: 217–226.
- BEDAL, K.B., S. GRÄSSEL, P.J. OEFNER, J. REINDERS, T.E. REICHERT, AND R. BAUER. 2014. Collagen XVI Induces Expression of MMP9 via Modulation of AP-1 Transcription Factors and Facilitates Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 9: e86777.
- BELLON, G., L. MARTINY, AND A. ROBINET. 2004. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 49: 203–220.
- BERNIER, J. 2011. Head and Neck Cancer: Multimodality Management. Springer Science & Business Media.
- BLOT, W.J., J.K. MCLAUGHLIN, D.M. WINN, D.F. AUSTIN, R.S. GREENBERG, S. PRESTON-MARTIN, L. BERNSTEIN, ET AL. 1988. Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. *Cancer Research* 48: 3282–3287.
- BÖTTCHER, R.T., A. LANGE, AND R. FÄSSLER. 2012. How ILK and kindlins cooperate to orchestrate integrin signaling. *Current opinion in cell biology* 21: 670–675.
- BOYDEN, S. 1962. The Chemotactic Effect of Mixtures of Antibody and Antigen on Polymorphonuclear Leucocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 115: 453–466.
- BRASSART-PASCO, S., K. SÉNÉCHAL, J. THEVENARD, L. RAMONT, J. DEVY, L. DI STEFANO, A. DUPONT-DESHORGUE, ET AL. 2012. Tetrastatin, the NC1 Domain of the α 4(IV) Collagen Chain: A Novel Potent Anti-Tumor Matrikine. *PLoS ONE* 7: e29587.
- CALDERWOOD, D.A., I.D. CAMPBELL, AND D.R. CRITCHLEY. 2013. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14: 503–517.
- CAMPBELL, I.D., AND M.J. HUMPHRIES. 2011. Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a004994.

- CAO, Z., M. BAO, L. MIELE, F.H. SARKAR, Z. WANG, AND Q. ZHOU. 2013. Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: A systemic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer* 49: 3914–3923.
- CHOI, S., AND J.N. MYERS. 2008. Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy. *Journal of Dental Research* 87: 14–32.
- CHUNG, A.S., J. LEE, AND N. FERRARA. 2010. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* 10: 505–514.
- CRITCHLEY, D.R., AND A.R. GINGRAS. 2008. Talin at a glance. *Journal of Cell Science* 121: 1345–1347.
- CROWE, D.L., AND T.N. BROWN. 1999. Transcriptional Inhibition of Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) Activity by a c-fos/Estrogen Receptor Fusion Protein is Mediated by the Proximal AP-1 Site of the MMP-9 Promoter and Correlates with Reduced Tumor Cell Invasion. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 1: 368–372.
- DANIELS, J.T., A.D. CAMBREY, N.L. OCCLESTON, Q. GARRETT, R.W. TARNUZZER, G.S. SCHULTZ, AND P.T. KHAW. 2003. Matrix Metalloproteinase Inhibition Modulates Fibroblast-Mediated Matrix Contraction and Collagen Production In Vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44: 1104–1110.
- DAVIS, G.E. 2010. Matricryptic sites control tissue injury responses in the cardiovascular system: relationships to pattern recognition receptor regulated events. *Journal of molecular and cellular cardiology* 48: 454–460.
- DAVIS, G.E., K.J. BAYLESS, M.J. DAVIS, AND G.A. MEININGER. 2000. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *The American journal of pathology* 156: 1489–1498.
- DEDHAR, S. 2000. Cell–substrate interactions and signaling through ILK. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 250–256.
- DESGROSELLIER, J.S., AND D.A. CHERESH. 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer* 10: 9–22.
- DISATNIK, M.-H., AND T.A. RANDO. 1999. Integrin-mediated Muscle Cell Spreading THE ROLE OF PROTEIN KINASE C IN OUTSIDE-IN AND INSIDE-OUT SIGNALING AND EVIDENCE OF INTEGRIN CROSS-TALK. *Journal of Biological Chemistry* 274: 32486–32492.
- DKHISSI, F., H. LU, C. SORIA, P. OPOLON, F. GRISCELLI, H. LIU, P. KHATTAR, ET AL. 2003. Endostatin exhibits a direct antitumor effect in addition to its antiangiogenic activity in colon cancer cells. *Human Gene Therapy* 14: 997–1008.
- DOME, B., M.J.C. HENDRIX, S. PAKU, J. TOVARI, AND J. TIMAR. 2007. Alternative Vascularization Mechanisms in Cancer. *The American Journal of Pathology* 170: 1–15.
- EBLE, J.A., A. KASSNER, S. NILAND, M. MÖRGELIN, J. GRIFKA, AND S. GRÄSSEL. 2006. Collagen XVI Harbors an Integrin $\alpha 1\beta 1$ Recognition Site in Its C-terminal Domains. *Journal of Biological Chemistry* 281: 25745–25756.
- EFERL, R., AND E.F. WAGNER. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 3: 859–868.
- FARINA, A.R., AND A.R. MACKAY. 2014. Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. *Cancers* 6: 240–296.
- FATUNMBI, M., J. SHELTON, AND S.M. ARONICA. 2012. MMP-9 increases HER2/neu expression and alters apoptosis levels in human mammary epithelial cells (HMEC). *Breast Cancer Research and Treatment* 135: 519–530.
- FELLER, L. 2012. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. *Journal of Cancer Therapy* 03: 263–268.
- FOLBERG, R., M.J.C. HENDRIX, AND A.J. MANIOTIS. 2000. Vasculogenic Mimicry and Tumor Angiogenesis. *The American Journal of Pathology* 156: 361–381.
- FOLBERG, R., AND A.J. MANIOTIS. 2004. Vasculogenic mimicry. *APMIS* 112: 508–525.
- FORASTIERE, A., W. KOCH, A. TROTTI, AND D. SIDRANSKY. 2001. Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine* 345: 1890–1900.
- FRANCESCONE, R., S. SCULLY, B. BENTLEY, W. YAN, S.L. TAYLOR, D. OH, L. MORAL, AND R. SHAO. 2012. Glioblastoma-Derived Tumor Cells Induce Vasculogenic Mimicry through Fik-1 Activation. *Journal of Biological Chemistry* jbc.M111.334540.
- FRANKEN, N.A.P., H.M. RODERMOND, J. STAP, J. HAVEMAN, AND C. VAN BREE. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* 1: 2315–2319.

- FRANK, N.Y., T. SCHATTON, S. KIM, Q. ZHAN, B.J. WILSON, J. MA, K.R. SAAB, ET AL. 2011. VEGFR-1 Expressed by Malignant Melanoma-Initiating Cells Is Required for Tumor Growth. *Cancer Research* 71: 1474–1485.
- FRANTZ, C., K.M. STEWART, AND V.M. WEAVER. 2010. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science* 123: 4195–4200.
- FRANZKE, C.-W., K. TASANEN, H. SCHÄCKE, Z. ZHOU, K. TRYGGVASON, C. MAUCH, P. ZIGRINO, ET AL. 2002. Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *The EMBO journal* 21: 5026–5035.
- FRATZL, P. 2008. Collagen: Structure and Mechanics. Springer Science & Business Media.
- FUKUDA, K., K. BLEDEZKA, J. YANG, H.D. PERERA, E.F. PLOW, AND J. QIN. 2014. Molecular basis of kindlin-2 binding to integrin-linked kinase (ILK) pseudokinase for regulating cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry* jbc.M114.596692.
- GACZYNSKA, M., P.A. OSMULSKI, Y. GAO, M.J. POST, AND M. SIMONS. 2003. Proline- and arginine-rich peptides constitute a novel class of allosteric inhibitors of proteasome activity. *Biochemistry* 42: 8663–8670.
- GATTAZZO, F., A. URCIUOLO, AND P. BONALDO. 2014. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840: 2506–2519.
- GIALELI, C., A.D. THEOCHARIS, AND N.K. KARAMANOS. 2011. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal* 278: 16–27.
- GILKES, D.M., G.L. SEMENZA, AND D. WIRTZ. 2014. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nature Reviews Cancer* 14: 430–439.
- GONDI, C.S., S.S. LAKKA, D.H. DINH, W.C. OLIVERO, M. GUJRATI, AND J.S. RAO. 2007. Intraperitoneal Injection of a Hairpin RNA–Expressing Plasmid Targeting Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) Receptor and uPA Retards Angiogenesis and Inhibits Intracranial Tumor Growth in Nude Mice. *Clinical Cancer Research* 13: 4051–4060.
- GORDON, M.K., AND R.A. HAHN. 2010. Collagens. *Cell and tissue research* 339: 247–257.
- GRADY, W.M. 2005. Transforming Growth Factor- β , Smads, and Cancer. *Clinical Cancer Research* 11: 3151–3154.
- GRÄSSEL. 2009. Gene and protein expression profile of naive and osteo-chondrogenically differentiated rat bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *International Journal of Molecular Medicine* 23: . Available at: <http://www.spandidos-publications.com/ijmm/23/6/745> [Accessed August 21, 2014].
- GRÄSSEL, S., AND R.J. BAUER. 2013. Collagen XVI in health and disease. *Matrix Biology* 32: 64–73.
- GRÄSSEL, S., R. TIMPL, E.M. TAN, AND M.L. CHU. 1996. Biosynthesis and processing of type XVI collagen in human fibroblasts and smooth muscle cells. *European journal of biochemistry / FEBS* 242: 576–584.
- GRÄSSEL, S., C. UNSÖLD, H. SCHÄCKE, L. BRUCKNER-TUDERMAN, AND P. BRUCKNER. 1999a. Collagen XVI is expressed by human dermal fibroblasts and keratinocytes and is associated with the microfibrillar apparatus in the upper papillary dermis. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* 18: 309–317.
- GRÄSSEL, S., C. UNSÖLD, H. SCHÄCKE, L. BRUCKNER-TUDERMAN, AND P. BRUCKNER. 1999b. Collagen XVI is expressed by human dermal fibroblasts and keratinocytes and is associated with the microfibrillar apparatus in the upper papillary dermis. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* 18: 309–317.
- GUNDA, V., R.K. VERMA, AND Y.A. SUDHAKAR. 2013. Inhibition of Elastin Peptide-Mediated Angiogenic Signaling Mechanism(s) in Choroidal Endothelial Cells by the $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ Collagen Fragment. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54: 7828–7835.
- HAMANO, Y., AND R. KALLURI. 2005. Tumstatin, the NC1 domain of alpha3 chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333: 292–298.
- HANNIGAN, G.E., C. LEUNG-HAGESTEIJN, L. FITZ-GIBBON, M.G. COPPOLINO, G. RADEVA, J. FILMUS, J.C. BELL, AND S. DEDHAR. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new $\beta 1$ -integrin-linked protein kinase. *Nature* 379: 91–96.
- HANNIGAN, G., A.A. TROUSSARD, AND S. DEDHAR. 2005. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nature Reviews Cancer* 5: 51–63.
- HARBURGER, D.S., AND D.A. CALDERWOOD. 2009. Integrin signalling at a glance. *Journal of Cell Science* 122: 159–163.

- HARDISSON, D. 2003. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 260: 502–508.
- HARDY, K.M., D.A. KIRSCHMANN, E.A. SEFTOR, N.V. MARGARYAN, L.-M. POSTOVIT, L. STRIZZI, AND M.J.C. HENDRIX. 2010. Regulation of the Embryonic Morphogen Nodal by Notch4 Facilitates Manifestation of the Aggressive Melanoma Phenotype. *Cancer Research* 70: 10340–10350.
- HASHIMOTO, T., T. WAKABAYASHI, A. WATANABE, H. KOWA, R. HOSODA, A. NAKAMURA, I. KANAZAWA, ET AL. 2002. CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *The EMBO Journal* 21: 1524–1534.
- HEIKKILÄ, P., J. SUOJANEN, E. PIRILÄ, A. VÄÄNÄNEN, E. KOIVUNEN, T. SORSA, AND T. SALO. 2006. Human tongue carcinoma growth is inhibited by selective antigelatinolytic peptides. *International Journal of Cancer* 118: 2202–2209.
- HEINO, J. 2007. The collagen family members as cell adhesion proteins. *BioEssays* 29: 1001–1010.
- HEINZ, A., M.C. JUNG, L. DUCA, W. SIPPL, S. TADDESE, C. IHLING, A. RUSCIANI, ET AL. 2010. Degradation of tropoelastin by matrix metalloproteinases – cleavage site specificities and release of matrikines. *FEBS Journal* 277: 1939–1956.
- HEINZELLER, T., AND C.M. BÜSING. 2001. Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg. Georg Thieme Verlag.
- HE, M., Y. WANG, AND W. LI. 2009. PPI Finder: A Mining Tool for Human Protein-Protein Interactions. *PLoS ONE* 4: e4554.
- HENDRIX, M.J.C., E.A. SEFTOR, A.R. HESS, AND R.E.B. SEFTOR. 2003. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nature Reviews Cancer* 3: 411–421.
- HENDRIX, M.J.C., E.A. SEFTOR, P.S. MELTZER, L.M.G. GARDNER, A.R. HESS, D.A. KIRSCHMANN, G.C. SCHATTEMAN, AND R.E.B. SEFTOR. 2001. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: Role in vasculogenic mimicry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 8018–8023.
- HENRIQUES, A.C.G., F.R. DE MATOS, H.C. GALVÃO, AND R. DE A. FREITAS. 2012. Immunohistochemical expression of MMP-9 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue. *Journal of oral science* 54: 105–111.
- HESS, A.R., E.A. SEFTOR, L.M.G. GARDNER, K. CARLES-KINCH, G.B. SCHNEIDER, R.E.B. SEFTOR, M.S. KINCH, AND M.J.C. HENDRIX. 2001. Molecular Regulation of Tumor Cell Vasculogenic Mimicry by Tyrosine Phosphorylation Role of Epithelial Cell Kinase (Eck/EphA2). *Cancer Research* 61: 3250–3255.
- HE, X.-P., Z.-S. LI, R.-M. ZHU, Z.-X. TU, J. GAO, X. PAN, Y.-F. GONG, ET AL. 2006. Effects of recombinant human canstatin protein in the treatment of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 12: 6652–6657.
- HORNEBECK, W., H. EMONARD, F.-X. MAQUART, AND G. BELLON. 2003. [Proteolysis directed by the extracellular matrix]. *Journal de la Société de biologie* 197: 25–30.
- HUBERT, T., S. GRIMAL, S. RATZINGER, I. MECHALY, S. GRASSEL, AND A. FICHARD-CARROLL. 2007. Collagen XVI is a neural component of the developing and regenerating dorsal root ganglia extracellular matrix. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* 26: 206–210.
- HUET-CALDERWOOD, C., N.N. BRAHME, N. KUMAR, A.L. STIEGLER, S. RAGHAVAN, T.J. BOGGON, AND D.A. CALDERWOOD. 2014. Differences in binding to the ILK complex determines kindlin isoform adhesion localization and integrin activation. *Journal of Cell Science* 127: 4308–4321.
- HUGHES, C.S., L.M. POSTOVIT, AND G.A. LAJOIE. 2010. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *PROTEOMICS* 10: 1886–1890.
- HULLMANN, M., M. KUNKEL, AND P.D.D.T.E. REICHERT. 2010. Diagnostik und Therapie oraler präkanzeröser Läsionen. *Der MKG-Chirurg* 3: 7–15.
- HUMPHRIES, J.D., A. BYRON, AND M.J. HUMPHRIES. 2006. Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science* 119: 3901–3903.
- HU, X., D. LI, W. ZHANG, J. ZHOU, B. TANG, AND L. LI. 2012. Matrix metalloproteinase-9 expression correlates with prognosis and involved in ovarian cancer cell invasion. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 286: 1537–1543.
- HYNES, R.O. 2009. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science* 326: 1216–1219.
- IWAI, S., S. AMEKAWA, K. YOMOGIDA, T. SUMI, M. NAKAZAWA, Y. YURA, Y. NISHIMUNE, AND M. NOZAKI. 2008. ESE-1 inhibits the invasion of oral squamous cell carcinoma in conjunction with MMP-9 suppression. *Oral diseases* 14: 144–149.

- JHA, P., B. MANICKAM, B. MATTA, P.S. BORA, AND N.S. BORA. 2009. Proteolytic cleavage of type I collagen generates an autoantigen in autoimmune uveitis. *The Journal of biological chemistry* 284: 31401–31411.
- KADLER, K.E., C. BALDOCK, J. BELLA, AND R.P. BOOT-HANDFORD. 2007. Collagens at a glance. *Journal of Cell Science* 120: 1955–1958.
- KANG, Y.S., Y. LI, C. DAI, L.P. KISS, C. WU, AND Y. LIU. 2010. Inhibition of integrin-linked kinase blocks podocyte epithelial–mesenchymal transition and ameliorates proteinuria. *Kidney International* 78: 363–373.
- KANSE, S.M., C. KOST, O.G. WILHELM, P.A. ANDREASEN, AND K.T. PREISSNER. 1996. The Urokinase Receptor Is a Major Vitronectin-Binding Protein on Endothelial Cells. *Experimental Cell Research* 224: 344–353.
- KARAKÖSE, E., H.B. SCHILLER, AND R. FÄSSLER. 2010. The kindlins at a glance. *Journal of Cell Science* 123: 2353–2356.
- KASSNER, A., U. HANSEN, N. MIOGGE, D.P. REINHARDT, T. AIGNER, L. BRUCKNER-TUDERMAN, P. BRUCKNER, AND S. GRÄSSEL. 2003. Discrete integration of collagen XVI into tissue-specific collagen fibrils or beaded microfibrils. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* 22: 131–143.
- KASSNER, A., K. TIEDEMANN, H. NOTBOHM, T. LUDWIG, M. MÖRGELIN, D.P. REINHARDT, M.-L. CHU, ET AL. 2004. Molecular structure and interaction of recombinant human type XVI collagen. *Journal of molecular biology* 339: 835–853.
- VAN KILSDONK, J.W.J., M. BERGERS, L.C.L.T. VAN KEMPEN, J. SCHALKWIJK, AND G.W.M. SWART. 2010. Keratinocytes drive melanoma invasion in a reconstructed skin model. *Melanoma research* 20: 372–380.
- KOHFELDT, E., P. MAURER, C. VANNAHME, AND R. TIMPL. 1997. Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS letters* 414: 557–561.
- KOJIMA, T., D.T. AZAR, AND J.-H. CHANG. 2008. Neostatin-7 regulates bFGF-induced corneal lymphangiogenesis. *FEBS Letters* 582: 2515–2520.
- KOSKIMAKI, J.E., E.D. KARAGIANNIS, B.C. TANG, H. HAMMERS, D.N. WATKINS, R. PILI, AND A.S. POPEL. 2010. Pentastatin-1, a collagen IV derived 20-mer peptide, suppresses tumor growth in a small cell lung cancer xenograft model. *BMC Cancer* 10: 1–7.
- KOWALSKI, L.P., AND A.L. CARVALHO. 2001. Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. *Oral Oncology* 37: 94–98.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- LAI, K.K.Y., S. SHANG, N. LOHIA, G.C. BOOTH, D.J. MASSE, N. FAUSTO, J.S. CAMPBELL, AND L. BERETTA. 2011. Extracellular Matrix Dynamics in Hepatocarcinogenesis: a Comparative Proteomics Study of PDGFC Transgenic and Pten Null Mouse Models. *PLoS Genet* 7: e1002147.
- LAKKA, S.S., C.S. GONDI, AND J.S. RAO. 2005. Proteases and Glioma Angiogenesis. *Brain Pathology* 15: 327–341.
- LAUER, J.L., AND G.B. FIELDS. 2010. Collagen in Cancer. In R. G. Bagley [ed.], *The Tumor Microenvironment*, 477–507. Springer New York. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-6615-5_23 [Accessed March 7, 2013].
- LEE, K.H., AND J.-R. KIM. 2012. Regulation of HGF-mediated cell proliferation and invasion through NF- κ B, JunB, and MMP-9 cascades in stomach cancer cells. *Clinical & Experimental Metastasis* 29: 263–272.
- LEEMANS, C.R., B.J.M. BRAAKHUIS, AND R.H. BRAKENHOFF. 2011. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* 11: 9–22.
- LEGATE, K.R., E. MONTAÑEZ, O. KUDLACEK, AND R. FÜSSLER. 2005. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 20–31.
- LEZCANO, C., S. KLEFFEL, N. LEE, A.R. LARSON, Q. ZHAN, A. DOROSARIO, L.C. WANG, ET AL. 2014. Merkel cell carcinoma expresses vasculogenic mimicry: demonstration in patients and experimental manipulation in xenografts. *Laboratory Investigation* 94: 1092–1102.
- LI, F.-L., R. XU, Q. ZENG, X. LI, J. CHEN, Y.-F. WANG, B. FAN, ET AL. 2012. Tanshinone IIA Inhibits Growth of Keratinocytes through Cell Cycle Arrest and Apoptosis: Underlying Treatment Mechanism of Psoriasis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 1–14.
- LI, J., M. POST, R. VOLK, Y. GAO, M. LI, C. METAIS, K. SATO, ET AL. 2000. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nature Medicine* 6: 49–55.
- LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., E. SNAPP, AND A. KENWORTHY. 2001. Studying protein dynamics in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 444–456.
- LIU, B., J. ZHANG, C. HUANG, AND H. LIU. 2012. Dyskerin Overexpression in Human Hepatocellular Carcinoma Is Associated with Advanced Clinical Stage and Poor Patient Prognosis. *PLoS ONE* 7: e43147.

- LIU, X., Q. ZHANG, Y. MU, X. ZHANG, K. SAI, J.C.-S. PANG, H.-K. NG, AND Z. CHEN. 2011. Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 105: 173–179.
- LIVAK, K.J., S.J. FLOOD, J. MARMARO, W. GIUSTI, AND K. DEETZ. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research* 4: 357–362.
- LODISH, H., A. BERK, S.L. ZIPURSKY, P. MATSUDAIRA, D. BALTIMORE, AND J. DARNELL. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. W. H. Freeman.
- LU, P., V.M. WEAVER, AND Z. WERB. 2012. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology* 196: 395–406.
- MACDONALD, T.J., Y.A. DECLERCK, AND W.E. LAUG. 1998. Urokinase induces receptor mediated brain tumor cell migration and invasion. *Journal of Neuro-Oncology* 40: 215–226.
- MAEGDEFRAU, U., AND A.-K. BOSSERHOFF. 2012. BMP activated Smad signaling strongly promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Experimental and Molecular Pathology* 92: 74–81.
- MAIER, T., M. GÜELL, AND L. SERRANO. 2009. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters* 583: 3966–3973.
- MANIOTIS, A.J., R. FOLBERG, A. HESS, E.A. SEFTOR, L.M.G. GARDNER, J. PE'ER, J.M. TRENT, ET AL. 1999. Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells in Vivo and in Vitro: Vasculogenic Mimicry. *The American Journal of Pathology* 155: 739–752.
- MANNARINI, L., V. KRATOCHVIL, L. CALABRESE, L. GOMES SILVA, P. MORBINI, J. BETKA, AND M. BENAZZO. 2009. Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature. *Acta Otorhinolaryngologica Italica* 29: 119–126.
- MAO, X., G. ORCHARD, D. M. LILLINGTON, F. J. CHILD, E. C. VONDERHEID, P. C. NOWELL, M. BAGOT, ET AL. 2004. BCL2 and JUNB abnormalities in primary cutaneous lymphomas. *British Journal of Dermatology* 151: 546–556.
- MAO, X., G. ORCHARD, D.M. LILLINGTON, R. RUSSELL-JONES, B.D. YOUNG, AND S.J. WHITTAKER. 2003. Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 101: 1513–1519.
- MAQUART, F.X., G. BELLON, S. PASCO, AND J.C. MONBOISSE. 2005. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie* 87: 353–360.
- MAQUART, F.X., A. SIMÉON, S. PASCO, AND J.C. MONBOISSE. 1999. [Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrikines]. *Journal De La Société De Biologie* 193: 423–428.
- MARUR, S., G. D'SOUZA, W.H. WESTRA, AND A.A. FORASTIERE. 2010. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology* 11: 781–789.
- MATHAS, S., M. HINZ, I. ANAGNOSTOPOULOS, D. KRAPPMANN, A. LIETZ, F. JUNDT, K. BOMMERT, ET AL. 2002. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF- κ B. *The EMBO Journal* 21: 4104–4113.
- MAXFIELD, F.R., AND T.E. MCGRAW. 2004. Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 121–132.
- MCDONALD, P.C., A.B. FIELDING, AND S. DEDHAR. 2008. Integrin-linked kinase – essential roles in physiology and cancer biology. *Journal of Cell Science* 121: 3121–3132.
- MEURMAN, J.H., AND J. UITTAMO. 2008. Oral micro-organisms in the etiology of cancer. *Acta Odontologica Scandinavica* 66: 321–326.
- MILLER, M. 2009. The Importance of Being Flexible: The Case of Basic Region Leucine Zipper Transcriptional Regulators. *Current protein & peptide science* 10: 244–269.
- MISHRA, A., A.C. BHARTI, D. SALUJA, AND B.C. DAS. 2010. Transactivation and expression patterns of Jun and Fos/AP-1 super-family proteins in human oral cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 126: 819–829.
- MITRA, S.K., D.A. HANSON, AND D.D. SCHLAEPFER. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6: 56–68.
- MOHAMMADI, M., S.K. OLSEN, AND R. GOETZ. 2005. A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an à la carte menu of heparan sulfate motifs. *Current Opinion in Structural Biology* 15: 506–516.
- MONTANARO, L. 2010. Dyskerin and cancer: more than telomerase. The defect in mRNA translation helps in explaining how a proliferative defect leads to cancer. *The Journal of Pathology* 222: 345–349.
- MONTANEZ, E., S. USSAR, M. SCHIFFERER, M. BÖSL, R. ZENT, M. MOSER, AND R. FÄSSLER. 2008. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes & Development* 22: 1325–1330.

- MORSE, D.E., W.J. PSOTER, D. CLEVELAND, D. COHEN, M. MOHIT-TABATABAI, D.L. KOSIS, AND E. EISENBERG. 2007. Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia. *Cancer causes & control: CCC* 18: 919–929.
- MÜLHARDT, C. 2009. *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*. 6th ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. Available at: <http://www.springer.com/springer+spektrum/biowissenschaften/molekular-%2C+zellbiologie+%26+genetik/book/978-3-642-34635-4> [Accessed July 23, 2014].
- MUNDEL TM, Y.A. gms | 125. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie | Hexastatin, die NC1 Domäne der $\alpha 6$ -Kette von Kollagen IV, ist ein neuer endogener Angiogenese-Inhibitor und hemmt das Tumorwachstum. Available at: <http://www.egms.de/static/de/meetings/dgch2008/08dgch321.shtml> [Accessed September 2, 2014].
- MUNDEL, T.M., A.-M. YLINIEMI, Y. MAESHIMA, H. SUGIMOTO, M. KIERAN, AND R. KALLURI. 2008. Type IV collagen $\alpha 6$ chain-derived noncollagenous domain 1 ($\alpha 6$ (IV)NC1) inhibits angiogenesis and tumor growth. *International Journal of Cancer* 122: 1738–1744.
- NANCI, A. 2003. *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*. 6th Edition. Mosby, St. Louis, MO.
- NYBERG, P., L. XIE, AND R. KALLURI. 2005. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer research* 65: 3967–3979.
- OGBUREKE, K.U.E., P.M. WEINBERGER, S.W. LOONEY, L. LI, AND L.W. FISHER. 2012. Expressions of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), dentin sialophosphoprotein (DSPP), and osteopontin (OPN) at histologically negative surgical margins may predict recurrence of oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 3: 286–298.
- OHYAMA, M., Y. HIRAYAMA, J. TANUMA, M. HIRANO, I. SEMBA, H. SHISA, H. HIAI, ET AL. 2004. Expressions of junB and c-fos are enhanced in 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue cancers. *Pathology International* 54: 35–40.
- OKAMURA, M., S. YAMAJI, Y. NAGASHIMA, M. NISHIKAWA, N. YOSHIMOTO, Y. KIDO, Y. IEMOTO, ET AL. 2007. Prognostic value of integrin $\beta 1$ -ILK-pAkt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Human Pathology* 38: 1081–1091.
- O'REILLY, M.S., T. BOEHM, Y. SHING, N. FUKAI, G. VASIOS, W.S. LANE, E. FLYNN, ET AL. 1997. Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* 88: 277–285.
- PAN, T.C., R.Z. ZHANG, M.G. MATTEI, R. TIMPL, AND M.L. CHU. 1992. Cloning and chromosomal location of human alpha 1(XVI) collagen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 6565–6569.
- PARK, J., AND P.E. SCHERER. 2012. Endotrophin – Linking Obesity with Aggressive Tumor Growth. *Oncotarget* 3: 1487–1488.
- PAULIS, Y.W.J., P.M.M.B. SOETEKOUW, H.M.W. VERHEUL, V.C.G. TJAN-HEIJNEN, AND A.W. GRIFFIOEN. 2010. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1806: 18–28.
- PERSAD, S., S. ATTWELL, V. GRAY, N. MAWJI, J.T. DENG, D. LEUNG, J. YAN, ET AL. 2001. Regulation of Protein Kinase B/Akt-Serine 473 Phosphorylation by Integrin-linked Kinase CRITICAL ROLES FOR KINASE ACTIVITY AND AMINO ACIDS ARGININE 211 AND SERINE 343. *Journal of Biological Chemistry* 276: 27462–27469.
- PERSAD, S., AND S. DEDHAR. 2003. The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Reviews* 22: 375–384.
- RAMCHANDRAN, R., M. DHANABAL, R. VOLK, M.J.F. WATERMAN, M. SEGAL, H. LU, B. KNEBELMANN, AND V.P. SUKHATME. 1999. Antiangiogenic Activity of Restin, NC10 Domain of Human Collagen XV: Comparison to Endostatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 255: 735–739.
- RAMONT, L., S. BRASSART-PASCO, J. THEVENARD, A. DESHORGUE, L. VENTEO, J.Y. LARONZE, M. PLUOT, ET AL. 2007. The NC1 domain of type XIX collagen inhibits in vivo melanoma growth. *Molecular Cancer Therapeutics* 6: 506–514.
- RASSIDAKIS, G.Z., A. THOMAIDES, C. ATWELL, R. FORD, D. JONES, F.-X. CLARET, AND L.J. MEDEIROS. 2005. JunB expression is a common feature of CD30+ lymphomas and lymphomatoid papulosis. *Modern Pathology* 18: 1365–1370.
- RATZINGER, S., J.A. EBLE, A. PASOLDT, A. OPOLKA, G. ROGLER, J. GRIFKA, AND S. GRÄSSEL. 2010. Collagen XVI induces formation of focal contacts on intestinal myofibroblasts isolated from the normal and inflamed intestinal tract. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* 29: 177–193.

- RATZINGER, S., S. GRÄSSEL, A. DOWEJKO, T.E. REICHERT, AND R.J. BAUER. 2011a. Induction of type XVI collagen expression facilitates proliferation of oral cancer cells. *Matrix Biology* 30: 118–125.
- RATZINGER, S., S. GRÄSSEL, A. DOWEJKO, T.E. REICHERT, AND R.J. BAUER. 2011b. Induction of type XVI collagen expression facilitates proliferation of oral cancer cells. *Matrix Biology* 30: 118–125.
- REHM, H., AND T. LETZEL. 2009. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Auflage: 6. Aufl. 2010. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- REUNANEN, N., AND V. KÄHÄRI. 2000. Matrix Metalloproteinases in Cancer Cell Invasion. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6598/> [Accessed November 27, 2014].
- REYMOND, N., B.B. D' ÁGUA, AND A.J. RIDLEY. 2013. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer* 13: 858–870.
- RICARD-BLUM, S. 2011a. Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. *Frontiers in Bioscience* 16: 674.
- RICARD-BLUM, S. 2011b. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a004978.
- RICARD-BLUM, S., F. RUGGIERO, AND M. VAN DER REST. 2005. The Collagen Superfamily. In J. Brinckmann, H. Notbohm, and P. K. Müller [eds.], *Collagen*, 35–84. Springer Berlin / Heidelberg. Available at: <http://www.springerlink.com/content/va7jb0x12a0tamr8/abstract/> [Accessed October 9, 2012].
- RICARD-BLUM, S., AND R. SALZA. 2014. Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix. *Experimental Dermatology* 23: 457–463.
- ROBINSON, C.M., S.S. PRIME, S. HUNTLEY, A.M. STONE, M. DAVIES, J.W. EVESON, AND I.C. PATERSON. 2001. Overexpression of JunB in undifferentiated malignant rat oral keratinocytes enhances the malignant phenotype in vitro without altering cellular differentiation. *International Journal of Cancer* 91: 625–630.
- RONZIÈRE, M.-C., E. AUBERT-FOUCHER, J. GOUTTENOIRE, J. BERNAUD, D. HERBAGE, AND F. MALLEIN-GERIN. 2005. Integrin $\alpha 1\beta 1$ mediates collagen induction of MMP-13 expression in MC615 chondrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1746: 55–64.
- ROVENSKY, Y.A. 2011. *Adhesive Interactions in Normal and Transformed Cells*. Humana Press, Totowa, NJ.
- RUGGERI, Z.M. 2007. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thrombosis research* 120: S5–S9.
- SCHAEFER, L., AND R.M. SCHAEFER. 2010. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell and Tissue Research* 339: 237–246.
- SCULLY, C., AND J. BAGAN. 2009. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncology* 45: 301–308.
- SEFTOR, R.E.B., A.R. HESS, E.A. SEFTOR, D.A. KIRSCHMANN, K.M. HARDY, N.V. MARGARYAN, AND M.J.C. HENDRIX. 2012. Tumor Cell Vasculogenic Mimicry: From Controversy to Therapeutic Promise. *The American Journal of Pathology* 181: 1115–1125.
- SEFTOR, R.E.B., E.A. SEFTOR, N. KOSHIKAWA, P.S. MELTZER, L.M.G. GARDNER, M. BILBAN, W.G. STETLER-STEVENSON, ET AL. 2001. Cooperative Interactions of Laminin 5 $\gamma 2$ Chain, Matrix Metalloproteinase-2, and Membrane Type-1-Matrix/Metalloproteinase Are Required for Mimicry of Embryonic Vasculogenesis by Aggressive Melanoma. *Cancer Research* 61: 6322–6327.
- SEIBEL, N.M., J. ELJOUNI, M.M. NALASKOWSKI, AND W. HAMPE. 2007. Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Analytical Biochemistry* 368: 95–99.
- SENNER, V., S. RATZINGER, S. MERTSCH, S. GRÄSSEL, AND W. PAULUS. 2008. Collagen XVI expression is upregulated in glioblastomas and promotes tumor cell adhesion. *FEBS letters* 582: 3293–3300.
- SHI, Y., AND J. MASSAGUÉ. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685–700.
- SHOULDERS, M.D., AND R.T. RAINES. 2009. COLLAGEN STRUCTURE AND STABILITY. *Annual review of biochemistry* 78: 929–958.
- SIERON, P., C. HADER, J. HATINA, R. ENGERS, A. WLAZLINSKI, M. MÜLLER, AND W.A. SCHULZ. 2009. DKC1 overexpression associated with prostate cancer progression. *British Journal of Cancer* 101: 1410–1416.
- SNAPP, E. 2005. Design and Use of Fluorescent Fusion Proteins in Cell Biology. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]* CHAPTER: Unit–21.4.
- STRANSKY, N., A.M. EGLOFF, A.D. TWARD, A.D. KOSTIC, K. CIBULSKIS, A. SIVACHENKO, G.V. KRYUKOV, ET AL. 2011. The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Science (New York, N.Y.)* 333: 1157–1160.
- SU, Y., AND J. ZHU. 2004. Canstatin, a endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Chinese Journal of Cancer Research* 16: 229–234.

- TABE, Y., L. JIN, Y. TSUTSUMI-ISHII, Y. XU, T. MCQUEEN, W. PRIEBE, G.B. MILLS, ET AL. 2007. Activation of Integrin-Linked Kinase Is a Critical Prosurvival Pathway Induced in Leukemic Cells by Bone Marrow-Derived Stromal Cells. *Cancer Research* 67: 684–694.
- TAN, K., M. DUQUETTE, J. LIU, R. ZHANG, A. JOACHIMIAK, J. WANG, AND J. LAWLER. 2006. The Structures of the Thrombospondin-1 N-Terminal Domain and Its Complex with a Synthetic Pentameric Heparin. *Structure* 14: 33–42.
- THIERINGER, F.R., T. MAASS, B. ANTHON, E. MEYER, P. SCHIRMACHER, T. LONGERICH, P.R. GALLE, ET AL. 2012. Liver-specific overexpression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in transgenic mice accelerates development of hepatocellular carcinoma. *Molecular Carcinogenesis* 51: 439–448.
- TIERNEY, E.P., S. TULAC, S.-T.J. HUANG, AND L.C. GIUDICE. 2003. Activation of the protein kinase A pathway in human endometrial stromal cells reveals sequential categorical gene regulation. *Physiological genomics* 16: 47–66.
- TILLET, E., K. MANN, R. NISCHT, T. PAN, M.-L. CHU, AND R. TIMPL. 1995. Recombinant Analysis of Human $\alpha 1(XVI)$ Collagen. *European Journal of Biochemistry* 228: 160–168.
- TOUSSARD, A.A., P. COSTELLO, T.N. YOGANATHAN, S. KUMAGAI, C.D. ROSKELLEY, AND S. DEDHAR. 2000. The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). , *Published online: 16 November 2000*; | doi:10.1038/sj.onc.1203928 19: . Available at: <http://www.nature.com/onc/journal/v19/n48/full/1203928a.html> [Accessed October 9, 2012].
- TRAN, K.T., P. LAMB, AND J.-S. DENG. 2005. Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *Journal of Dermatological Science* 40: 11–20.
- TRESSLER, R.J., P.A. PITOT, J.R. STRATTON, L.D. FORREST, S. ZHUO, R.J. DRUMMOND, S. FONG, ET AL. 1999. Urokinase receptor antagonists: discovery and application to in vivo models of tumor growth. *APMIS* 107: 168–173.
- VÄISÄNEN, M.-R. 2005. Type XIII collagen : characterization of ectodomain shedding and its biological implications in mammalian cells, characterization of type XIII collagen expression in human cancers.
- VÄISÄNEN, M.-R., T. VÄISÄNEN, AND T. PIHLAJANIEMI. 2004. The shed ectodomain of type XIII collagen affects cell behaviour in a matrix-dependent manner. *Biochemical Journal* 380: 685.
- VALLONE, D., S. BATTISTA, G.M. PIERANTONI, M. FEDELE, L. CASALINO, M. SANTORO, G. VIGLIETTO, ET AL. 1997. Neoplastic transformation of rat thyroid cells requires the junB and fra-1 gene induction which is dependent on the HMGI-C gene product. *The EMBO Journal* 16: 5310–5321.
- VARTANIAN, A., E. STEPANOVA, I. GRIGORIEVA, E. SOLOMKO, A. BARYSHNIKOV, AND M. LICHINITSER. 2011. VEGFR1 and PKC[alpha] signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VEGFR2 kinase-independent manner. *Melanoma Research April 2011* 21: 91–98.
- VEIT, G., E.P. ZIMINA, C.-W. FRANZKE, S. KUTSCH, U. SIEBOLDS, M.K. GORDON, L. BRUCKNER-TUDERMAN, AND M. KOCH. 2007. Shedding of Collagen XXIII Is Mediated by Furin and Depends on the Plasma Membrane Microenvironment. *Journal of Biological Chemistry* 282: 27424–27435.
- VOGEL, C., AND E.M. MARCOTTE. 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics* 13: 227–232.
- V SANDHU, S., S. GUPTA, H. BANSAL, AND K. SINGLA. 2012. Collagen in Health and Disease N. S. Yadav [ed.],. *Journal of Orofacial Research* 2: 153–159.
- WALTZ, D.A., L.R. NATKIN, R.M. FUJITA, Y. WEI, AND H.A. CHAPMAN. 1997. Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *Journal of Clinical Investigation* 100: 58–67.
- WANG, H., M. BIRKENBACH, AND J. HART. 2000. Expression of Jun family members in human colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 21: 1313–1317.
- WANG, J. 2012. Pull and push: Talin activation for integrin signaling. *Cell Research* 22: 1512–1514.
- WATT, F.M., AND W.T.S. HUCK. 2013. Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14: 467–473.
- WECKMANN, M., L.M. MOIR, C.A. HECKMAN, J.L. BLACK, B.G. OLIVER, AND J.K. BURGESS. 2012. Lamstatin – a novel inhibitor of lymphangiogenesis derived from collagen IV. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16: 3062–3073.
- WEINBERG, R.A. 2013. *The Biology of Cancer*. Auflage: 2. Garland Pub, New York, NY, US.

- WU, C., AND S. DEDHAR. 2001. Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *The Journal of Cell Biology* 155: 505–510.
- XING, Y., J. QI, S. DENG, C. WANG, L. ZHANG, AND J. CHEN. 2013. Small interfering RNA targeting ILK inhibits metastasis in human tongue cancer cells through repression of epithelial-to-mesenchymal transition. *Experimental Cell Research* 319: 2058–2072.
- XU, D., C. MCKEE, Y. CAO, Y. DING, B.M. KESSLER, AND R.J. MUSCHEL. 2010. Matrix Metalloproteinase 9 Regulates Tumor Cell Invasion via Cleavage of Protease Nexin-1. *Cancer research* 70: 6988–6998.
- YAMAGUCHI, N., S. KIMURA, O.W. MCBRIDE, H. HORI, Y. YAMADA, T. KANAMORI, H. YAMAKOSHI, AND Y. NAGAI. 1992. Molecular Cloning and Partial Characterization of a Novel Collagen Chain, α (XVI), Consisting of Repetitive Collagenous Domains and Cysteine-Containing Non-Collagenous Segments. *Journal of Biochemistry* 112: 856–863.
- YAO, X., Y. PING, Y. LIU, K. CHEN, T. YOSHIMURA, M. LIU, W. GONG, ET AL. 2013. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2) Plays a Key Role in Vasculogenic Mimicry Formation, Neovascularization and Tumor Initiation by Glioma Stem-like Cells. *PLoS ONE* 8: e57188.
- YOUNES MN, YIGITBASI OG, YAZICI YD, AND ET AL. 2007. Effects of the integrin-linked kinase inhibitor qit0267 on squamous cell carcinoma of the head and neck. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 133: 15–23.
- ZAIN, R.B. 2001. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer — a brief overview. *Oral Oncology* 37: 205–210.
- ZHAO, D., X.-F. TANG, K. YANG, J.-Y. LIU, AND X.-R. MA. 2012. Over-expression of integrin-linked kinase correlates with aberrant expression of Snail, E-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: implications in tumor progression and metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* 29: 957–969.
- ZHU, J., X. PAN, Z. ZHANG, J. GAO, L. ZHANG, AND J. CHEN. 2012. Downregulation of integrin-linked kinase inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in bladder cancer cells. *Cellular Signalling* 24: 1323–1332.
- ZIMINA, E.P., L. BRUCKNER-TUDERMAN, AND C.-W. FRANZKE. 2005. Shedding of Collagen XVII Ectodomain Depends on Plasma Membrane Microenvironment. *Journal of Biological Chemistry* 280: 34019–34024.