

Aus der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Dr. Peter Sieg

**Differentielle Expression des Protoonkogens Vav3
und der Transkript Variante Vav3.1 in humanen
Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin
(Dr. med. dent.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Lübeck

vorgelegt von
Dr. med. Thomas Trenkle
aus Mannheim

Lübeck, 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Peter Sieg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Schiedeck

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15.09.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

-Dekan der Medizinischen Fakultät-

Für meine Brüder

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Orale Plattenepithelkarzinome.....	2
1.1.1	Epidemiologie.....	2
1.1.2	Klassifizierung oraler Plattenepithelkarzinome.....	3
1.1.3	Tumorigenese oraler Plattenepithelkarzinome.....	4
1.1.4	Therapie oraler Plattenepithelkarzinome.....	5
1.2	Vav Protoonkogene.....	6
1.2.1	Vav3.....	9
1.2.2	Vav3.1.....	10
1.3	EGF und TGFβ in oralen Plattenepithelkarzinomen.....	12
1.4	Zielsetzung.....	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Chemikalien, Enzyme, molekulare Größenmarker.....	17
2.2	Verbrauchsmaterialien, Computer-Programme, Kits.....	18
2.3	Geräte.....	18
2.4	Tumorgewebeproben.....	19
2.4.1	Gewebe Gewinnung.....	19
2.4.2	TNM-Klassifizierung.....	19
2.4.3	Patientengut.....	19
2.4.4	Histologische Beurteilung der Gewebeproben.....	20
2.5	Molekulare Analyse der Gewebeproben.....	20
2.5.1	RNA Präparation.....	20
2.5.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	21
2.5.3	Bestimmung der RNA-Qualität.....	21
2.5.4	Analytische native Agarosegelelektrophorese.....	22
2.5.5	cDNA Erststrangsynthese.....	22
2.5.6	Quantitative <i>Real Time</i> Polymerasekettenreaktion (QRT-PCR).....	23
2.5.7	Primer- und Sonden-Design.....	24
2.5.8	Berechnung der relativen Genexpression.....	26

Inhaltsverzeichnis

3	Ergebnisse.....	27
3.1	Aufreinigung von Gesamt RNA.....	27
3.2	Etablierung der QRT-PCR.....	31
3.3	Überprüfung der PCR-Produkte.....	34
3.4	Differentielle Genexpression.....	35
3.4.1	Differentielle Genexpression von Vav3.....	35
3.4.2	Differentielle Genexpression von Vav3.1.....	36
3.4.3	Differentielle Genexpression Vav3.1/Vav3.....	37
4	Diskussion.....	39
5	Zusammenfassung.....	44
6	Literaturverzeichnis.....	46
7	Danksagung.....	55
8	Anhang.....	56
9	Lebenslauf.....	57

Abkürzungen

Abkürzungsverzeichnis

AC	<i>acidic rich domain</i>
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CH	<i>Calponin homology domain</i>
CP	<i>crossing point</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DH	<i>Dbl homology domain</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
k	Kilo
kb	Kilobase = 1000 Basenpaare
l	Liter
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	Meter
M	Fernmetastasen
M	Molarität (mol/l)
Min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	Lymphknoten
N	Normalgewebe
n	nano (10 ⁻⁹)
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
Non-RT	Kontroll-Ansatz bei der cDNA-Synthese ohne Reverse-Transkriptase
OD	optische Dichte
PDGFR	<i>plateled derived</i> Wachstumsfaktorrezeptor
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PH	<i>pleckstrin homology domain</i>
PR	<i>prolin rich domain</i>
RAP-PCR	<i>RNA arbitrarily primed</i> PCR
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
QRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase PCR
sec	Sekunde
SH2	<i>Src homology domain 2</i>
SH3	<i>Src homology domain 3</i>
T	Tumor
TGFβ	<i>Transforming growth factor, beta</i>
TGFβR	<i>Transforming growth factor beta, receptor 1</i>
U	Unit
V	Volt
WHO	<i>World Health Organization</i>
x	mal
ZF	<i>zinc finger domain</i>

1. Einleitung

Das erste *Vav*-Gen wurde als Onkogen in Zell-Transformierungsexperimenten identifiziert (Katzav *et al.*, 1989).

Mittlerweile sind drei Proteine *Vav1*, *Vav2* und *Vav3* bekannt. Die *Vav*-Proteine zeichnen sich durch eine charakteristische Anordnung von neun strukturellen Domänen (CH- AC- DH- PH- ZF- PR- SH3- SH2- SH3) aus, welche Interaktionen mit einer Vielzahl anderer Proteine bei der Signaltransduktion ermöglichen.

Als phosphorylierungsabhängige GDP-GTP Austauschfaktoren aktivieren die *Vav*-Proteine beispielsweise über die DH (*Dbl homology*) Domäne Rho- und Rac-GTPasen. Hierüber werden Veränderungen des Zytoskeletts sowie die Induktion von Genexpressionen zur Zellentwicklung und Proliferation reguliert.

Durch Expression von punktmutierten oder verkürzten Varianten konnten transformierende Effekte nachgewiesen werden (Zeng *et al.*, 2000, Katzav, 2007).

Von *Vav3* existiert eine natürliche, verkürzte Variante, *Vav3.1*, welche nur für das carboxyterminale Motiv SH3-SH2-SH3 (*Src-homology 2* und 3) codiert. Über *Vav3.1* ist noch wenig bekannt; zum einen wurde ein im Vergleich zu *Vav3* unterschiedliches Expressionsmuster in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen, zum anderen konnte in Wachstums-Experimenten mit humanen Keratinozyten durch Stimulation mit den Wachstumsfaktoren EGF und TGF β das *Vav3.1* Transkript herunterreguliert werden (Trenkle *et al.*, 2000).

Die einzigen bisher veröffentlichten Daten bezüglich der Expression von *Vav3* oder *Vav3.1* in Karzinomen zeigen eine Überexpression von *Vav3* in Prostatakarzinomen und Mammakarzinomen (Dong *et al.*, 2006; Lyons und Burnstein, 2006; Lee *et al.*, 2008). Über die Expression von *Vav3* oder *Vav3.1* in oralen Plattenepithelkarzinomen liegen bisher keine Daten vor.

1.1 Orale Plattenepithelkarzinome

1.1.1 Epidemiologie

Die häufigsten malignen Neoplasien der Mundhöhle sind mit über 90% Plattenepithelkarzinome, welche aus der die Mundhöhle auskleidenden Schleimhaut entstehen. Die möglichen Lokalisationen der oralen Plattenepithelkarzinome sind Lippen, Wangen, Alveolarfortsatz, Retromolargegend, Sulcus buccomandibularis und –maxillaris, Alveolarfortsatz und Gingiva der Maxilla und Mandibula, harter Gaumen, Zunge (vordere zwei Drittel) und der gesamte Mundboden. Eine eindeutige Abgrenzung zu den Oropharynxkarzinomen (Weichgaumen, Zungengrund, Tonsillenloge sowie übrige Oropharynx Vorder-, Seiten- und Hinterwand) ist bei ausgedehnteren Befunden unter Umständen nicht möglich. Die häufigsten Lokalisationen des oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinoms sind der Mundboden, der ventrolaterale Zungenrand und die Weichgaumen-Retromolarregion (Mashberg und Samit, 1995).

Weltweit erkranken jährlich ca. 274.000 Menschen an Mundhöhlenkrebs. Dies entspricht ca. 2-3% aller Krebsneuerkrankungen. In ungefähr zwei Drittel der Fälle sind Männer betroffen (Parkin *et al.*, 2005). In Deutschland gibt es jährlich ca. 10.000 Neuerkrankungen des Mundhöhlen- und Rachenkrebses, Männer sind hier sogar etwa 3mal so häufig betroffen wie Frauen (Krebs in Deutschland, 2006). Für das Jahr 2008 liegt bei den Männern die prognostizierte Inzidenz der Malignome der Mund und Rachenhöhle an achter Stelle bezüglich aller bösartigen Erkrankungen in den USA (Jemal *et al.*, 2008). Die höchsten Erkrankungsraten treten im Alter zwischen 55 und 65 Jahren auf. Die 5-Jahres Überlebensraten haben sich in den letzten Jahrzehnten nicht entscheidend geändert und betragen durchschnittlich ca. 50%. Die individuelle Prognose ist jedoch auch entscheidend von der Tumorlokalisierung und vom Tumorstadium abhängig (Kovács *et al.*, 2007). Ein Grund für die ungleiche Geschlechterverteilung liegt in der geringeren Prävalenz des Missbrauchs von Tabak und Alkohol bei Frauen. Tabak und Alkohol gelten als die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Mundhöhlenkarzinoms. Weitere Risikofaktoren sind Virusinfektionen,

1. Einleitung

Ernährungsgewohnheiten, ionisierende Strahlung, Mundhygiene und der Sanierungszustand des Gebisses (Talamini *et al.*, 2000; Campisi *et al.*, 2006; Kawanishi *et al.*, 2007).

1.1.2 Klassifizierung oraler Plattenepithelkarzinome

Orale Plattenepithelkarzinome wachsen lokal destruierend und können lymphogen, seltener auch hämatogen metastasieren. Unter Berücksichtigung dieses Wachstumsverhaltens erfolgt die Einteilung der oralen Plattenepithelkarzinome nach dem TNM- System der UICC (Union internationale contre le cancer) (Wittekind *et al.*, 2002). Hiermit werden der in der Mundhöhle gewachsene Tumor (T) sowie eventuelle Absiedlungen in regionären (zervikalen) Lymphknoten (N) und Fernmetastasen (M) nach Ausmaß der Befunde eingeteilt (Tab.1-1).

Tabelle 1-1 Klassifikation des nicht-invasiven und invasiven Plattenepithelkarzinoms

T– Primärtumor	
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 2 cm
T2	Tumor > 2 bis 4 cm
T3	Tumor > 4 cm
T4a	<i>Lippe:</i> Infiltration durch kortikalen Knochen, N. alveolaris inferior, Mundboden, Haut <i>Mundhöhle:</i> Infiltration durch kortikalen Knochen, in äußere Muskulatur der Zunge, Kieferhöhle, Haut
T4b	Infiltration von Spatium masticatorium, Processus pterygoideus, Schädelbasis, oder umschließt Arteria carotis interna
N– Regionäre Lymphknoten	
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten ≤ 3 cm
N2a	Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten > 3, maximal 6 cm
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, ≤ 6 cm
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, ≤ 6 cm
N3	Metastasen in Lymphknoten > 6 cm
M– Fernmetastasen	
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

1. Einleitung

Die TNM Klassifikation kann sowohl klinisch (c) als auch pathologisch (p) vorgenommen werden. Zunächst erfolgt eine präoperative klinische Beurteilung (cTNM), welche durch intraoperative Erkenntnisse und histopathologische Untersuchungen in die postoperative pathologische Beurteilung (pTNM) überführt werden kann.

Zur vereinfachten Einteilung in verschiedene Schweregrade der Tumorerkrankung kann aus der komplexen TNM-Klassifikation eine Gruppierung in Tumorstadien abgeleitet werden. (Tab.1-2).

Tabelle 1-2 Klassifikation des nicht-invasiven und invasiven Plattenepithelkarzinoms nach dem Tumorstadium

Stadium	TNM Klassifikation			Tumorprogression
0	Tis	N0	M0	Frühe Tumorstadien
I	T1	N0	M0	
II	T2	N0	M0	
III	T1,T2	N1	M0	Fortgeschrittene Tumorstadien
	T3	N0, N1	M0	
IVA	T1–T3	N2	M0	
	T4a	N0, N1, N2	M0	
IVB	Jedes T	N3	M0	
	T4b	Jedes N	M0	
IVC	Jedes T	Jedes N	M1	

Weiterhin erfolgt eine Einteilung anhand des Differenzierungsgrades (histopathologisches Grading, G). Dies reicht von gut differenziert (G1) über mäßig (G2), schlecht (G3) bis zu un- bzw. entdifferenziert (G4).

1.1.3 Tumorigenese oraler Plattenepithelkarzinome

Die Mehrzahl der oralen Plattenepithelkarzinome entstehen aus Vorläuferläsionen mit histopathologisch nachweisbaren Auffälligkeiten wie einer gestörten Plattenepithelarchitektur oder zytologischen Atypien. Durch Kumulation von weiteren genetischen Veränderungen können aus diesen Vorläuferläsionen schließlich Karzinome entstehen. Solche beschriebenen genetischen

1. Einleitung

Veränderungen resultieren in der Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen und der Aktivierung von Protoonkogenen wie beispielsweise p16, p53, Cyclin D1, p14, *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und Retinoblastoma Gen (Rb) (Perez-Ordoñez *et al.*, 2006). Zur Detektion weiterer, für die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms relevanter Gene, wurden großformatige Studien entwickelt (Patel *et al.*, 2001). In *screening* Experimenten zur Genanalyse von Neoplasien mittels Array-Technologien konnten für Plattenepithelkarzinome beispielsweise über 100 differentiell exprimierte Gene detektiert werden (Leethanakul *et al.*, 2003; Sok *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 2006). Die diagnostische oder therapeutische Relevanz dieser Gene muss größtenteils noch untersucht werden. Die Identifizierung molekularer Marker und therapeutischer Targets könnte, nicht zuletzt durch die Möglichkeit einer besseren Therapieplanung und -durchführung, von prognoserelevanter Bedeutung sein (Casparotto und Maestro, 2007).

1.1.4 Therapie oraler Plattenepithelkarzinome

Die konventionelle Therapie besteht in der radikalen chirurgischen Tumoresektion und Ausräumung der regionären Lymphknoten. Bei ausgedehnten Tumoren, unvollständiger chirurgischer Tumoresektion und/oder Tumorbefall von Lymphknoten wird zusätzlich eine Radiotherapie, gegebenenfalls in Kombination mit einer Chemotherapie, durchgeführt. Durch diese Therapieformen wird jeweils auch gesundes Gewebe zerstört. Neuartige Therapiemodelle zielen darauf ab, den Tumor über tumorspezifische molekulare Besonderheiten gezielter behandeln zu können, im Besonderen ohne Zerstörung von gesundem Nachbargewebe.

Rezeptortyrosinkinasen und deren Wachstumsfaktoren besitzen eine bedeutende Rolle bei der Tumorentstehung und Tumorprogression. In Plattenepithelkarzinomen sind fehlerhafte Expressionsmuster solcher Proteine mit einer schlechten Prognose und fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert. Beispielsweise besitzen die Wachstumsfaktoren EGF und TGF β sowie deren Rezeptoren Schlüsselrollen bei tumorbiologisch wichtigen Funktionen wie Zellproliferation, Zellwanderung und Invasion (Mishima *et al.*, 2002; Traxler *et al.*,

1. Einleitung

2004; Wilkins-Port und Higgins, 2007). Durch Blockierung solcher Rezeptortyrosinkinase-Signalwege besteht die Möglichkeit der Hemmung des Tumorwachstums. Tyrosinkinase-Inhibitoren können folglich bei Tumoren angewendet werden, deren Wachstum von der Aktivität eines Tyrosinkinase-Signalwegs beeinflusst wird.

Bei Patienten mit fortgeschrittenem oralem Plattenepithelkarzinom kann mittlerweile solch eine Therapieoption genutzt werden. Durch Blockierung der EGF Rezeptortyrosinkinase mit dem Antikörper Cetuximab (Erbix) kann in Kombinationstherapien mit Bestrahlung oder klassischen Chemotherapien die Überlebensrate erhöht werden (Astsaturov *et al.*, 2007, Murdoch und Sager, 2008). Weitere spezifische Inhibitoren werden derzeit untersucht (Reuter *et al.*, 2007). Es besteht die Hoffnung, dass durch die Entdeckung neuer, sowie durch die Kombination mehrerer verschiedener Therapeutika, weniger Nebenwirkungen und weniger therapieresistente Verläufe sowie insgesamt deutlich bessere Überlebensraten erzielt werden können.

1.2 Vav Protoonkogene

Die verschiedenen Vav-Gene gehören zu einer Familie von Signaltransduktionsmolekülen mit onkogenem Potential. Das erste Vav-Gen (*Vav*, *Vav1*) wurde auf der Suche nach Onkogenen in einem Transformierungsassay identifiziert (Katzav *et al.*, 1989). *Vav* war das sechste Onkogen, welches in dieser Arbeitsgruppe entdeckt wurde. Der Name Vav stammt aus dem hebräischen, der Muttersprache des Entdeckers, und ist der sechste Buchstabe im hebräischen Alphabet. *Vav1* ist hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert, wohingegen die später entdeckten Gene aus der Vav-Genfamilie *Vav2* (Henske *et al.*, 1995) und *Vav3* (Movilla und Bustelo, 1999; Trenkle *et al.*, 2000) in einer Vielzahl verschiedener Gewebe in unterschiedlicher Stärke exprimiert werden. Zusätzlich konnte von *Vav3* eine Transkript-Variante, *Vav3.1*, identifiziert werden. Interessanterweise kann die Expression dieser Transkriptvariante durch Wachstumsfaktoren reguliert werden (Trenkle *et al.*, 1998; 2000).

1. Einleitung

Mitglieder der Vav-Genfamilie kommen in allen vielzelligen Organismen vor. Wahrscheinlich sind sie entwicklungsgeschichtlich zusammen mit den Tyrosinkinase-Signalwegen entstanden, um eine optimale Überleitung extrazellulärer Signale in biologische Antworten zu ermöglichen.

Die Vav-Proteine der Säugetiere haben eine charakteristische Anordnung von neun bekannten strukturellen Domänen (CH- AC- DH- PH- ZF- PR- SH3- SH2- SH3) (Abb.1-1). Diese Vielzahl von Domänen ermöglicht den Vav-Proteinen, multiple Funktionen in verschiedenen Signalwegen auszuüben (Moores *et al.*, 2000; Bustelo, 2001). Die *calponin homology* (CH) Domäne kann Aktin binden. Die *acidic rich* (AC) Domäne enthält regulatorische Tyrosine. Die *Dbl homology* (DH) Domäne hat eine Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoraktivität. Hierüber wird der Aktivierungszustand von Rac/Rho GTPasen durch den Austausch von GDP nach GTP verändert. Die *pleckstrin homology* (PH) Domäne ist ebenfalls typischerweise bei Proteinen mit Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoraktivität zu finden, wodurch eine Lokalisierung an der Innenseite der Plasmamembran ermöglicht wird. Die *zinc finger* (ZF) Domäne ist typisch für Transkriptionsfaktoren. Die *prolin-rich* Domäne (PR) ermöglicht eine Bindung an weitere Proteine. Das sich an diese sechs Domänen anschließende SH3-SH2-SH3-Motiv bildet das carboxyterminale Ende des Proteins. Die beiden *Src homology 3* (SH3) Domänen können an Prolin-reiche Sequenzen anderer Proteine binden. Die SH2-Domäne bindet an phosphorylierte Tyrosine anderer interagierender Proteine.

Eine zentrale Rolle spielt die DH-Domäne. Diese katalysiert den GDP/GTP-Austausch an Proteinen der Rho-Familie. Hierzu zählen Rho-GTPasen wie Rho, Rac und Cdc42, welche schon lange als Signaltransduktionsmoleküle bekannt sind und eine Vielzahl von Funktionen ausüben. Solche, für die Tumorentstehung und Ausbreitung besonders wichtige Funktionen, wie die Zell-Zell Adhäsion, die Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts, die Regulierung der Gentranskription, das Zellüberleben und die Zellzykluskontrolle werden hierüber beeinflusst (Ridley, 2001; Etienne-Manneville und Hall, 2002). Die Rho-GTPasen können zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen, und einem inaktiven, GDP-gebundenen Status wechseln. Diese beiden Konformationen werden wiederum durch drei verschiedene Klassen von Proteinen reguliert. GTPase-aktivierende Proteine fördern den inaktiven GDP-Status, Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren

1. Einleitung

(GDI) verhindern die Aktivierung aus dem GDP Status, Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF) schließlich erleichtern den Austausch von GDP zu GTP und aktivieren somit die Rho-GTPasen. Die Proteine der Vav-Familie gehören zu diesen GEFs und regulieren über unterschiedliche Wege beispielsweise Veränderungen des Zytoskeletts, der Transkription, der Proliferation oder der Angiogenese (Bustelo, 2000; Hornstein *et al.*, 2004; Hunter *et al.*, 2006).

Die Vav-Proteine gehören zur Familie der Dbl-GEFs, wovon mittlerweile über 40 verschiedene Mitglieder bekannt sind (Zheng, 2001). Jedoch besitzen Die Vav-Proteine einen besonderen Status als Signaltransduktionsmoleküle, da sie neben der Dbl-Domäne noch mehrere funktionelle Domänen, wie bereits oben beschrieben, besitzen und somit zusätzlich mit einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine interagieren können (Billadeau, 2002).

Die Funktionen der unterschiedlichen Vav-Proteine (*Vav1*, *Vav2* und *Vav3*) sind zum einen isoformspezifisch, zum anderen besitzen die unterschiedlichen Proteine aber auch redundante Fähigkeiten und können sich teilweise gegenseitig substituieren (Fujikawa *et al.*, 2003; Pearce *et al.*, 2004).

Weiterhin werden Vav-Proteine in verschiedenen Geweben differentiell exprimiert. *Vav1* wird hauptsächlich in hämatopoietischen Zellen exprimiert. *Vav2* und *Vav3* werden in unterschiedlichen Ausmaßen in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Gewebespezifische Funktionen werden somit ermöglicht.

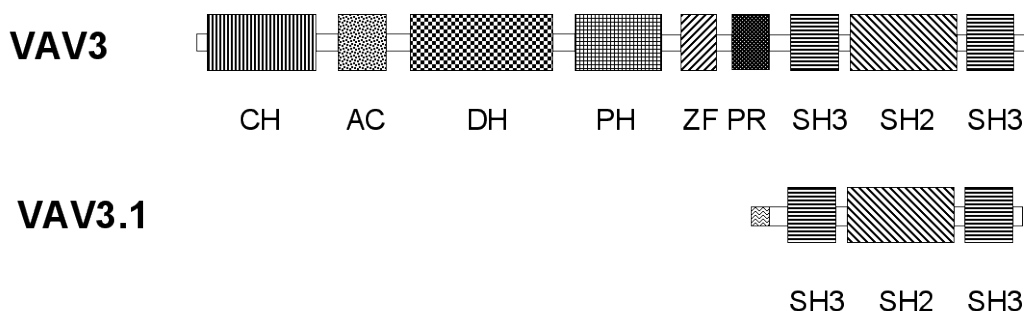



Abb.1-1 Strukturelle Domänen von VAV3 und VAV3.1. VAV3 besteht aus neun funktionellen Domänen. VAV3.1 ist eine verkürzte Variante von VAV3 und beinhaltet lediglich die 3 carboxyterminalen Domänen (SH3- SH2, SH3). Am aminoterminalen Ende von Vav3.1 findet sich eine spezifische, zu VAV3 unterschiedliche, Sequenz:  Hierüber können die beiden Varianten in verschiedenen Nachweismethoden zusätzlich unterschieden werden. VAV3 hat eine Länge von 847 Aminosäuren, VAV3.1 codiert für 287 Aminosäuren.

1.2.1 Vav3

Vav3 ist ein Onkoprotein, welches in eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen eingreift.

Für Vav3 wurden seit der Erstbeschreibung (Movilla und Bustelo, 1999) verschiedene Signalkaskaden und Funktionen identifiziert. Vav3 wird durch Liganden-Stimulierung unterschiedlicher Rezeptortyrosinkinasen phosphoryliert. Hierzu zählen der EGFR, der *platelet derived growth factor* Rezeptor (PDGFR), der *Ros* Rezeptor, der *insulin* Rezeptor (IR) und der *insulin like growth factor I* Rezeptor (IGFR). Auch durch Stimulierung des B-Zell- und des T-Zellrezeptors (BCR und TCR) kommt es zu einer Phosphorylierung von Vav3 (Moores *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2000). Durch Vav3 werden wiederum nachgeschaltete Signalkaskaden über unterschiedliche Proteine wie Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K), Mitogen aktivierte Kinasen (MAPK) und über Rho GTPasen aktiviert. In Expressionsexperimenten natürlicher und mutierter Varianten von Vav3 konnten über diese Signalwege Wachstumsparameter, die Angiogenese, die Zellmorphologie und die Zellmotilität beeinflusst werden (Sachdev *et al.*, 2002; Hunter *et al.*, 2006).

Neben solchen Transformationsassays konnte kürzlich zusätzlich eine Überexpression von Vav3 in Mammakarzinomen nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 2008) in humanen Prostatakarzinomzelllinien konnte ebenfalls eine Überexpression von Vav3 nachgewiesen werden, und eine Bedeutung von Vav3 bei der Entwicklung und Progression von Prostatakarzinomen postuliert werden (Dong *et al.*, 2006; Lyons und Burnstein, 2006). Zusätzlich konnte eine androgen-unabhängige Aktivierung des Androgen Rezeptor Transkriptionsfaktors durch Vav3 gezeigt werden. Hiermit könnte ein androgen- unabhängiges Wachstumsverhalten von Prostatakarzinomen und insbesondere von Tummorrezidiven erklärt werden (Lyons *et al.*, 2008).

Auch die NFAT Transkriptionsfaktoren, welche hauptsächlich bei der Steuerung der Immunantwort, aber auch bei der Entwicklung von Herz- und

1. Einleitung

Skelettmuskulatur und dem Nervensystem beteiligt sind, werden über Vav3 Signalwege reguliert (Zakaria *et al.*, 2004; Charvet *et al.*, 2005).

In einer weiteren Studie konnte eine Regulierung der Vav3 Expression während des Zellzyklus nachgewiesen werden. Hier konnte ein deutlicher Anstieg der Vav3 Expression während der Mitose beobachtet werden, mit Beginn der Zytokinese stellte sich die Vav3 Expression dann wieder auf das Ausgangslevel zurück. Nach Überexpression von Vav3 konnten in dieser Studie multinukleäre Zellen als Zeichen einer durch Vav3 induzierten, aberranten Zellteilung nachgewiesen werden (Fujikawa *et al.*, 2002).

In Untersuchungen mit Vav3-defizienten *knock out* Mäusen (Vav3^{-/-}) wurden Störungen der Osteoklastenfunktion mit hieraus resultierender erhöhter Knochenmasse beobachtet. Am ehesten scheint hierfür die Dysregulierung des Osteoklasten-Zytoskeletts verantwortlich zu sein (Faccio *et al.*, 2005). In einem anderen Vav3 *knock out* Experiment (Vav3^{-/-}) zeigten die Mäuse erhöhte Katecholaminspiegel (Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin) mit begleitender Hypertonie und Tachykardie. Ab dem 4. Lebensmonat zeigten sich morphologische Korrelate für kardiovaskuläre Erkrankungen wie linksventrikuläre Hypertrophie und Fibrose sowie eine Verdickung der Aorta. Die zellulären Mechanismen für diese sympathische Hyperaktivität konnten nicht geklärt werden. (Sauzeau *et al.*, 2006).

1.2.2 Vav3.1

Vav3.1 ist eine deutlich verkürzte Transkriptvariante von Vav3. Es wird angenommen, dass Vav3.1 über einen eigenen Promoter transkribiert wird. Alternativ könnte Vav3.1 auch eine Spleissvariante von Vav3 sein. Von den neun strukturellen Domänen von Vav3 (CH-AC-DH-PH-ZF-PR-SH3-SH2-SH3) kodiert Vav3.1 nur für die drei carboxyterminalen SH3-SH2-SH3 Domänen. Dies sind die Domänen, welche vornehmlich für Bindungen an andere Proteine verantwortlich sind. Die kurze aminoterminalen Sequenz (8 Aminosäuren) jenseits dieser Domänen ist spezifisch für Vav3.1, weitere Funktionen dieser individuellen

1. Einleitung

Sequenz sind nicht bekannt. Insgesamt erstreckt sich das vorhergesagte Vav3.1 Protein über 287 Aminosäuren, ca. ein Drittel der Größe von Vav3.

Das endogene Vav3.1 Protein selbst wurde bisher noch nicht nachgewiesen, jedoch wurden Experimente mit einem verkürzten, ebenfalls 287 Aminosäuren messenden, Vav3 Konstrukt, welches sich lediglich um die ersten 8 Aminosäuren unterscheidet, durchgeführt. Hier wurden biologische Interaktionen wie eine Bindung an den Ros Rezeptor sowie auch eine Phosphorylierung nach Rezeptorstimulierung nachgewiesen (Zeng *et al.*, 2000).

Es wird postuliert, dass die verkürzte Transkriptvariante Vav3.1 durch Substitution oder Kompetition (Abb.1-2) Funktionen von Vav3 regulieren kann oder auch selbständig, beispielsweise als Adapter-Molekül, in andere Signaltransduktionswege eingreifen kann (Bustelo, 2001).

Die einzigen bisher verfügbaren Daten über die Expression von Vav3.1 zeigen zum einen eine zu Vav3 unterschiedliche Expression in einer Vielzahl normaler Gewebe (Zeng *et al.*, 2000; Trenkle *et al.*, 2000), zum anderen wurde in Zellkulturexperimenten mit Keratinozyten eine bis über 10-fache Herunterregulierung der Vav3.1 mRNA durch die Wachstumsfaktoren TGF β und EGF nachgewiesen. Hier wurden im Rahmen von *RAP-PCR* und *Differential-Display* cDNA Array Experimenten sowohl in normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK), als auch in der immortalisierten Keratinozyten Zelllinie HaCaT die *Vav3* und *Vav3.1* Gene erstmals identifiziert und eine Regulierung von *Vav3.1* durch Wachstumsfaktoren gezeigt (Trenkle *et al.*, 1998; 1999; 2000). Eine derartige deutliche Regulation von *Vav3.1* war in anderen Zelllinien oder durch Verwendung anderer Wachstumsfaktoren nicht nachweisbar. Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Expression von Vav3 in diesen Experimenten nicht reguliert werden konnte. Eine denkbare Möglichkeit der Regulierung von Vav3 bestünde somit über eine Konkurrenz des regulierten Vav3.1 um Bindungspartner in der Signaltransduktionskaskade.

1. Einleitung

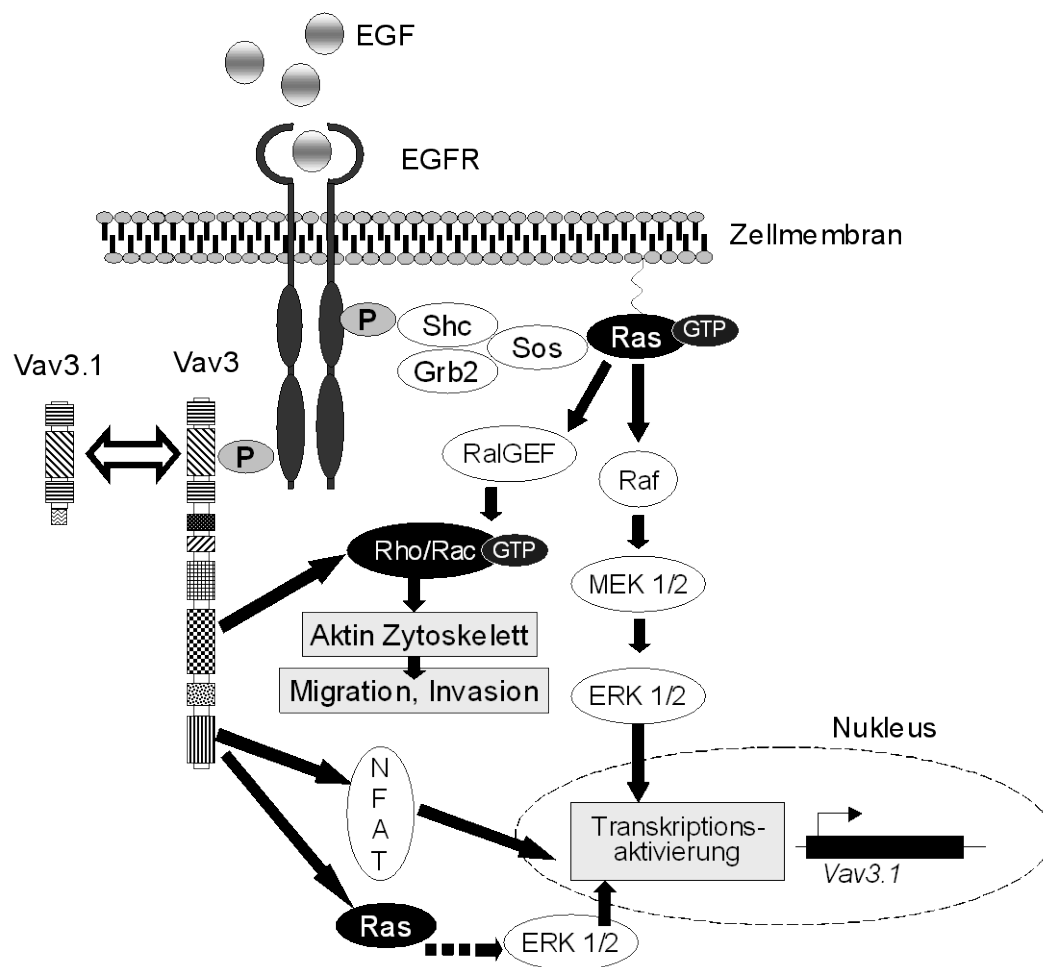


Abb.1-2 Modell der Vav3/Vav3.1-vermittelten Signalwege.

1.3 EGF und TGF β in oralen Plattenepithelkarzinomen

Die seit langem bekannten und sehr gut untersuchten Wachstumsfaktoren EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) und TGF β (Transformierender Wachstumsfaktor beta) sind auf verschiedenen Ebenen mit dem Vav3 und Vav3.1 Signalweg verknüpft. Zum Beispiel führt die Aktivierung des EGF Signalwegs zu einer Phosphorylierung von Vav3. Auch kommt es zu einer Bindung von Vav3 an den EGF Rezeptor Signalkomplex. Besonders interessant ist, dass die Expression der Vav3.1 mRNA in Keratinozyten *in vitro* sowohl durch EGF als auch durch TGF β herunterreguliert werden kann.

1. Einleitung

Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren regulieren nicht nur normale zelluläre Funktionen, sondern besitzen auch entscheidende Schlüsselrollen bei der Krebsentstehung. Bei der Entwicklung von Mundhöhlenkarzinomen sind für die Wachstumsfaktoren EGF und TGF β einige interessante Mechanismen beschrieben. TGF β scheint ~~im~~ ⁱⁿfrühen Stadium der Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen einen tumorsuppressorischen Effekt, im fortgeschrittenerem Stadium der Karzinomentwicklung aber auch einen gegenteiligen, die Tumorprogression begünstigenden, Effekt zu besitzen (Prime *et al.*, 2004). In oralen Keratinozyten konnte durch Herunterregulierung des TGF β Signalwegs mittels dominant-negativer Rezeptoren ein tumorsuppressorischer Effekt von TGF β nachgewiesen werden (Huntley *et al.*, 2004), außerdem wurde bei zunehmender Aggressivität von oralen Plattenepithelkarzinomen eine Korrelation zur reduzierten Expression der TGF β Rezeptoren I und II nachgewiesen (Mincione *et al.*, 2008). Andererseits wird durch die in oralen Plattenepithelkarzinomen häufig nachzuweisende Überexpression von TGF β das invasive Wachstumsverhalten der Karzinome verstärkt (Sun *et al.*, 2008).

Neben dem TGF β -Signalweg hat auch der EGF-Signalweg eine seit langem bekannte und bedeutende Funktion bei der Entstehung und Progression von Karzinomen (Khazaie *et al.*, 1993). Auch wurden Verknüpfungen der EGF- und TGF β -Signalwege im Rahmen des EGF-regulierten Keratinozytenwachstums beschrieben (Yamasaki *et al.*, 2003).

Der EGF-Rezeptor (EGFR/ErbB1/HER1) ist in einer Vielzahl von Tumoren aberrant exprimiert oder mutiert. Die daraus resultierende verstärkte Aktivierung des EGF Signalwegs ist mit Tumorentstehung, Tumorprogression, Apoptoseregulierung, Angiogenese und Metastasierung assoziiert (Bianco *et al.*, 2007). Beispielsweise führt in Keratinozyten sowohl eine erhöhte EGF (Ligand) als auch eine erhöhte EGFR (Rezeptor) Expression zu verstärkter Zellproliferation und -motilität (McCawley *et al.*, 1997). Dies bedingt eine Erhöhung des Metastasierungspotentials von Keratinozyten (Wilkins-Port und Higgins, 2007).

Im Allgemeinen bedingt der Vorgang der Metastasierung etwa 90% der Sterbefälle bei einer Krebserkrankung (Fidler, 2002). Im Zuge der Metastasierung kommt es zur Separation einzelner Zellen aus dem Primärtumor, zur Degradation der extrazellulären Matrix (ECM), zur Migration und Invasion durch die

1. Einleitung

Basalmembran, zur Intravasation, zum Überleben innerhalb der Blutzirkulation, zur Extravasation an einem sekundären Ort innerhalb des Organismus, zum Überleben als Mikrometastase und schließlich zur Kolonialisierung zu einer Makrometastase (siehe Abbildung 1-3).

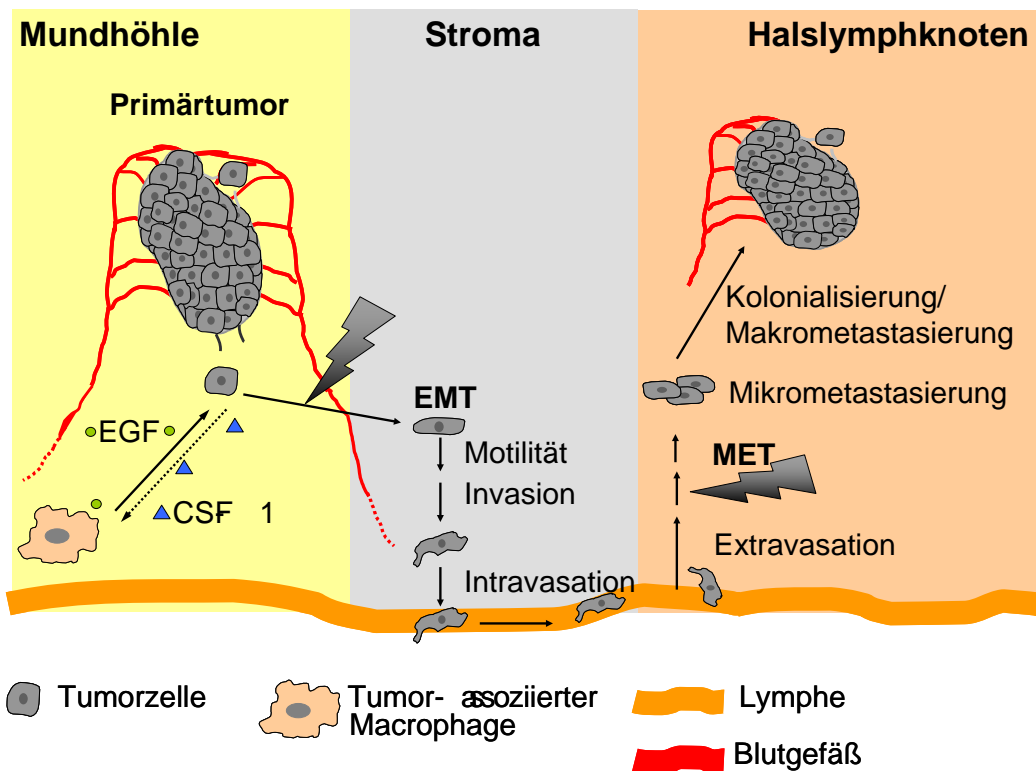


Abb.1-3 Modell zur Metastasierung von Tumorzellen. Tumor-assoziierte Makrophagen können, bedingt durch die Tumormikroumgebung, EGF sezernieren, welches an den dazugehörigen Rezeptor EGFR auf der Oberfläche von Tumorzellen binden kann. Dadurch kommt es zur Initialisierung einer Signalkaskade. Es gibt Indizien dafür, dass dieser Schritt zu einer epithelialen-mesenchymalen-Transition (EMT) führt, was den Tumorzellen möglicherweise die Invasion in das Blut-/Lymphgefäßsystem, die Extravasation an sekundärer Stelle sowie gegebenenfalls nach mesenchymaler-epithelialer-Transition (MET) die Ausbildung von Mikrometastasen und schließlich Makrometastasen ermöglicht.

Bei dem Fortschreiten der Dedifferenzierung epithelialer Tumorzellen kommt es unter anderem zur Herunterregulation von Cadherin, welches die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten mitbewirkt. Dadurch können sich einzelne Tumorzellen aus dem Verband lösen und sich als einzelne Zelle weiterbewegen (individuelle Bewegung) (Lozano *et al.*, 2003). Der Verlust der E-Cadherin Expression ist begleitet von dem Verlust epithelialer Charakteristika und der Akquisition

1. Einleitung

mesenchymaler Eigenschaften, ein Vorgang, welcher auch als epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet wird (Thiery, 2002). EMT ist ein Prozeß, welcher zuerst bei der Entwicklung von Embryonen beobachtet wurde (Shook und Keller, 2003). Interessanterweise wird ein Zusammenhang zwischen EMT und neoplastischer Progression angenommen (Thiery, 2002). Dieser Zusammenhang wird allerdings kontrovers diskutiert, da Pathologen den Vorgang der EMT *in vivo* noch nicht beobachten konnten. Allerdings wurde bereits für eine Vielzahl von Tumorentitäten, der Verlust epithelialer Marker und das Auftreten mesenchymaler Marker beschrieben, was in den meisten Fällen mit einer erhöhten Motilität und Invasivität assoziiert ist. Zytokine in der Mikro-Umgebung des Tumors scheinen durch die Initiierung autokriner/parokriner Signaltransduktionskaskaden bei dem Vorgang der EMT eine entscheidende Rolle zu spielen. Insbesondere wurde für TGF- β und EGF gezeigt, dass diese direkt die für EMT charakteristische Verschiebung zu einem morphologisch invasiven Phänotyp induzieren können. Sowohl TGF- β als auch EGF führen zur Hochregulation von Matrixmetalloproteinasen in Epithelzellen, was ein wichtiger Schritt bei der Metastasierung zu sein scheint (Wilkins-Port und Higgins, 2007). Aus therapeutischer Sicht wurde folglich nach Wegen gesucht, den EGF-Signalweg zu blockieren. In neuen Therapieformen für das orale Plattenepithelkarzinom werden Inhibitoren des EGF Rezeptors (monoklonale Antikörper gegen EGFR oder selektive EGFR Tyrosinkinaseinhibitoren) synergistisch mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin eingesetzt. Hierdurch kommt es zu einer verstärkten Induktion von Apoptose und Inhibierung der Zellproliferation in oralen Plattenepithelkarzinomen (Takaoka *et al.*, 2007).

1.4 Zielsetzung

Das Onkogen Vav3 und die Transkriptvariante Vav3.1 könnten bei der Entwicklung oraler Plattenepithelkarzinome sowohl über EGF und TGF vermittelte Wachstumsfaktorsignalwege, als auch über andere, ebenfalls noch nicht untersuchte Signalwege eine wichtige Rolle spielen.

Weder gibt es eine etablierte Methode zum differentiellen Nachweis der Vav3 und Vav3.1 mRNAs in Gewebeproben, noch wurden für orale Plattenepithelkarzinome solche Daten erhoben.

Zunächst sollte eine Methode zum quantitativen und differentiellen Nachweis der Expression von Vav3 und Vav3.1 mRNA in Gewebeproben entwickelt werden. Anschließend sollten anhand des etablierten Protokolls humane orale Plattenepithelkarzinome und gesunde Referenzgewebe bezüglich der Expression von Vav3 und Vav3.1 analysiert werden. Zusätzlich sollte überprüft werden, inwieweit die Expression der Vav3- und Vav3.1-mRNA mit histopathologischen und klinischen Parametern korreliert.

2 Material und Methoden

In dieser Studie wurde das mRNA Expressionsmuster von Vav3.1 und Vav3 in humanen Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle mittels *real time* quantitativer Reverser Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (QRT-PCR) untersucht. Hierzu wurden 20 Tumorgewebepräparate und jeweils entsprechende normale Schleimhaut derselben Patienten direkt nach der Resektion in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die Expression mittels QRT-PCR analysiert. Hierfür wurden Intron-überspannende Amplikons mit Primer Paaren und Sonden erstellt, welche spezifische Genabschnitte von Vav3.1 und Vav3 amplifizieren. Zusätzlich wurde ein drittes Amplikon als Kontrolle verwendet, welches den homologen Teil von Vav3.1 und Vav3 repräsentiert.

Die mRNA Expression von Vav3.1 und Vav3 wurde mittels eines internen Referenz-Gens (Porphobilinogen Deaminase, PBGD) normalisiert und die relative mRNA Expression wurde berechnet (relative Expression = $2^{-\Delta\Delta C_P}$). Zusätzlich wurde das Verhältnis von Vav3.1 zu Vav3 berechnet.

2.1 Chemikalien, Enzyme, molekulare Größenmarker

Produkt	Hersteller
Chemikalien	
Agarose	Eurogentec, Köln, Deutschland
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DEPC-behandeltes H ₂ O	Ambion, Huntington, Cambridgeshire, UK
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trihydroxymethylaminomethan (Tris-Base)	Gerbu, Gailberg, Deutschland
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Enzyme, Nukleotide, Primer	
PCR Nukleotid Mix	Roche, Mannheim, Deutschland
DNase I, RNase-frei	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNasin Ribonuklease Inhibitor	Promega, Mannheim, Deutschland
Stains-all	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Primer	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
50 bp DNA Ladder Trackit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2. Material und Methoden

2.2 Verbrauchsmaterialien, Computer-Programme, Kits

Produkt	Hersteller (Homepage)
Verbrauchsmaterialien	
Cryoröhrchen, 2 ml	Nunc, Langensfeld, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,2, 0,5, 1, 2 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Glaskapillar Reaktionsgefäße für den Lightcycler	Roche, Mannheim, Deutschland
Light Cycler® TaqMan Mastermix	Roche, Mannheim, Deutschland
Nano-Chip für den Agilent Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
QIAshredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
Skalpelle, Feather	PFM, Köln, Deutschland
Computerprogramme (Stand 6.10.2008)	
BLAST	://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
PubMed	://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=
Primer3	://frodo.wi.mit.
Roche Universal ProbeLibrary probe Assay Design-Programm	https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=UP030000
Kits	
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Agarose-Geldokumentationsanlage	PHASE, Lübeck, Deutschland
BioAnalyzer	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Elektrophorese Netzgeräte/ Transformatoren	Bio-Rad, München, Deutschland
Feinwaage	Ohaus, Pinebrook, NJ, USA
Mikroliter-Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Picofuge	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Pistill und Homogenisiergefäß	VWR, Darmstadt, Deutschland
Roche LightCycler 2.0	Roche, Mannheim, Deutschland
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Tischzentrifuge	Eppendorf, Wesseling Berzdorf, Deutschland

2.4 Tumorgewebeproben

2.4.1 Gewebegewinnung

Unverzüglich nach der Tumorresektion wurden repräsentative Gewebeproben aus den resezierten Tumoren herausgeschnitten und sofort in Gefrierröhrchen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das restliche Tumorpräparat wurde für die pathologische Beurteilung formalinfixiert. Entsprechende, normale Schleimhaut aus dem histopathologisch tumorfreien Schleimhautresektionsrand des jeweiligen Patienten wurde analog asserviert.

2.4.2 TNM-Klassifizierung

Die TNM-Klassifizierung und das Grading der Karzinome erfolgte in üblicher Art und Weise an den formalinfixierten Operationsresektaten durch die Pathologen sowie durch die klinischen Staginguntersuchungen.

2.4.3 Patientengut

In die Auswertung der von der Ethikkommission bewilligten Studie wurden insgesamt 20 Patienten mit primären Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle eingeschlossen. Diese Patienten waren zwischen 26 und 87 Jahre alt (Durchschnittsalter = 60 Jahre; Männeranteil = 70%, Frauenanteil = 30%). Im einzelnen handelte es sich um Mundbodenkarzinome (45%), Alveolarfortsatzkarzinome (30%), Zungenkarzinome (20%) und ein Wangenkarzinom (5%). Die Verteilung bezüglich der Tumorausdehnung betrug 20% pT1-, 35% pT2-, 30% pT3- und 15% pT4a-Tumoren. Das histopathologische Grading ergab 60% G2- und 40% G3-Karzinome. Bei 60% der Operationsresektate wurden histologisch keine Lymphknotenmetastasen nachgewiesen (pN0), bei 40% waren Karzinomabsiedlungen in Lymphknoten

2. Material und Methoden

nachweisbar (pN1–N2b). Fernmetastasierungen waren bei keinen der untersuchten Patienten nachweisbar (cM0).

2.4.4 Histologische Beurteilung der Gewebeproben

Zur histologischen Beurteilung wurde ein Teil jeder tiefgefrorenen Gewebeprobe mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung auf das Vorhandensein von Tumorzellen hin mikroskopisch untersucht. Durch den in Hämalan umgewandelten Farbstoff Hämatoxylin werden basische Areale der Zelle, insbesondere der Zellkern, blauviolett gefärbt. Anhand von Eosin werden eosinophile Strukturen, insbesondere Proteine im Zytoplasma, rot angefärbt. Anhand der HE-Färbung können Tumorzellen aufgrund eines höheren Zellkern zu Zytoplasma Verhältnisses identifiziert werden.

Die HE-Färbungen wurden im Routine Labor des Instituts für Pathologie, UK S-H, Campus Lübeck, durchgeführt.

2.5 Molekulare Analyse der Gewebeproben

2.5.1 RNA Präparation

Von den tiefgefrorenen Gewebeproben wurde jeweils ein ca. 24 mm³ messendes Gewebstück mit dem Skalpell zerkleinert und sofort in ~~700~~RLT -Lysis-Puffer (Qiagen) gegeben und mittels Pistill auf Eis homogenisiert. Das im Lysis-Puffer enthaltene chaotrope Salz Guanidiniumthiocyanat hat die Eigenschaft, Zellen effektiv zu lysieren sowie Nukleasen zu inaktivieren (Chomczynski und Sacchi, 1987). Anschließend wurde die Gesamt-RNA unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers aufbereitet. Dabei werden insbesondere die zellulären RNasen durch das in hoher Konzentration eingesetzte Guanidiniumthiocyanat inaktiviert. Um Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA zu reduzieren, wurde zusätzlich ein Verdau mit RNase-freier DNase I (Qiagen) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers auf der Silika-

2. Material und Methoden

Matrix des Aufreinigungsröhrchens durchgeführt. Die RNA wurde anschließend mit 44 µl H₂O (Nuklease-frei) von der Silica-Membran eluiert, und die RNA-Konzentration wurde mittels optischer Dichtemessung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde am NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer über die Messung der Absorption (A) bei einer Wellenlänge von 260 nm auf der Grundlage des Lambert-Beersches-Gesetzes ($E^{(LB)} = \epsilon \times c \times d$) bestimmt. Dabei steht ϵ für den Extinktionskoeffizienten, „c“ für die Konzentration der Lösung und „d“ für die Küvettendicke. Das Wasser, in welcher die Nukleinsäure gelöst und gelagert wurde, wurde als Nullwert gesetzt. Aus den gemessenen Werten wurden die Konzentrationen der Nukleinsäurelösungen berechnet. Für RNA entspricht eine Absorption bei 260 nm Wellenlänge (A_{260}) von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml, für DNA 50 µg/ml. Zusätzlich kann durch das A_{260}/A_{280} -Verhältnis eine Aussage zum Reinheitsgrad einer Nukleinsäurelösung gemacht werden, da Proteine monochromatisches Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren. Bei einer optischen Dichte von $< 1,8$ liegt eine mögliche Kontamination mit Proteinen vor.

2.5.3 Bestimmung der RNA-Qualität

Jeweils 200 ng der aufbereiteten RNA wurden auf einen LabChip (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) aufgetragen, in einem Agilent 2001 Bioanalyser elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Es wurden ausschließlich RNA-Extrakte mit einer hohen RNA-Integrität (RIN-Werte $> 6,3$) für sich anschließende Experimente verwendet. Zur weiteren Kontrolle wurde die präparierte RNA zusätzlich anhand einer Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.5.4 Analytische native Agarosegelelektrophorese

Die native Agarosegelelektrophorese wurde zum Überprüfen doppelsträngiger DNA und einzelsträngiger RNA verwendet. Die verwendeten Gele wurden mit einer Agarose-Konzentration von 1–2% in 1x TAE Puffer (50x Tris-Acetat-EDTA Laufpuffer, pH 8,3: 2 M Tris-Base, 1 M Natrium-Acetat, 0,1 M EDTA) hergestellt. Zum Lösen der Agarose im Puffer wurde die Lösung kurz aufgeköcht. Anschließend wurde der abgekühlten, noch flüssigen Lösung Ethidiumbromid (1 µg/ml) hinzugefügt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80–100 V für 1 bis 2 h durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid färbt die Nucleinsäuren durch Interkalation in die DNA-Doppelhelix bzw. die Nucleinsäuresekundärstruktur an. Dadurch fluoreszieren diese unter UV-Licht und wurden auf einem Transilluminator fotografiert und mit einer Geldokumentationsanlage digitalisiert. Anhand des in der Elektrophorese mitgeführten DNA-Größenstandards konnten die Fragmentgrößen eingeordnet werden.

2.5.5 cDNA Erststrangsynthese

Die Erststrangsynthese wurde mittels reverser Transkriptase und oligo(dT) sowie *random hexamer* Primern in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Im einzelnen wurden pro Reaktion eingesetzt: 1 µl (200 U) SuperScript II reverse Transkriptase (Invitrogen), 1 µl 100 µM oligo(dT), 1 µl 100 µM *random hexamer* Primer, 5 µl 10 mM dNTPs, 5 µl 0,1 M DTT, 10 µl 5x Puffer (Invitrogen), 1 µl (40 U) RNasin Ribonuklease Inhibitor (Promega) sowie 3,6 µg Gesamt-RNA.

Die RNA wurde in einem Volumen von 26 µl bei 65°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der oben angegebene Reaktionsansatz hinzugefügt und es folgte eine Inkubation bei 37°C für 10 min. Die Synthese erfolgte anschließend über 1 h bei 42°C. Abschließend wurde das Enzym bei 95°C für 5 min denaturiert. Die cDNA wurde bei –20°C gelagert oder direkt für die PCR verwendet. Um auszuschliessen, dass das in der QRT-PCR erhaltene Signal auf Kontaminationen

mit genomischer DNA beruht, wurden parallel Reaktionsansätze ohne reverse Transkriptase mitgeführt.

2.5.6 Quantitative Polymerasekettenreaktion (QPCR)

Die quantitative oder *real time* PCR (QPCR) bezeichnet ein PCR-Verfahren, bei dem während der PCR-Reaktion die Menge der entstandenen Produkte in Echtzeit gemessen wird. Die QPCR wird vor allem zur quantitativen Bestimmung von Genexpression, aber auch zur Diskriminierung von Allelen und zur Quantifikation von DNA-Kopienzahlen angewendet. Durch die Verwendung doppelstrang-DNA bindender Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR-Green I oder Ethidiumbromid, welche in die gebildeten Produkte interkalieren, wird die Menge an gebildetem Produkt nach jedem PCR-Zyklus detektiert. Eine höchst-spezifische Quantifizierung kann über den Einsatz fluorophormarkierter Oligonukleotidsonden, die auf der Zielsequenz hybridisieren, erreicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die QPCR mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Oligonukleotid, welches am 5'-Terminus mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist und am 3'-Terminus einen Quencher trägt. Bei einer intakten Sonde wird die Reporterfluoreszenzemission durch den Quencher unterdrückt. Während der PCR wird die Sonde durch die 5', 3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase hydrolysiert, so dass der Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher getrennt und die Reporterfluoreszenz freigesetzt wird. Zeitgleich zur Amplifikation wird das aus der Hydrolysierung der verwendeten Sonden entstehende Fluoreszenzsignal bestimmt. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zum gebildeten Produkt und ermöglicht die Bestimmung der Zyklenzahl, bei der eine bestimmte Produktmenge vorliegt. Für die Bestimmung der relativen Genexpression ist es notwendig, den sogenannten "*crossing point*" (CP) zu definieren. Der CP ist definiert als die Zykluszahl, bei der die detektierte Fluoreszenz erstmals größer ist als die Hintergrundfluoreszenz.

Die QPCR wurde in einem Roche LightCycler 2.0 (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Zur Amplifikationsreaktion wurde der LightCycler TaqMan Master Kit (Roche) verwendet, wofür 15 µl Master -Mix und 5 µl cDNA in

2. Material und Methoden

Glaskapillaren (Roche) pipettiert wurden. Die Amplifikation von cDNA wurde in Duplikaten durchgeführt. Das in der quantitativen PCR verwendete Temperaturprofil ist in der folgenden Tabelle (2-1) aufgeführt.

Tabelle 2-1 Temperaturprofil der quantitativen PCR

Zyklus	Temperatur	Zeit (sec)	Anzahl der Zyklus-Wiederholung
1. Hitzeaktivierung	95°C	600	} 1x
2. Denaturierung	95°C	10	
3. Annealing	59°C	30	} 45x
3. Extension	72°C	24	

Zusätzlich zur QRT-PCR Analyse wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese (Abschnitt 2.5.4) analysiert, um das Vorliegen spezifischer Produkte zu verifizieren. Hierfür wurden die QRT-PCR Reaktionsprodukte mit einem Volumen Probenauftragspuffer [30% (v/v) Glycerin, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol in 1x TAE-Puffer] versetzt und elektrophoretisch auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Überprüfung der spezifischen Größe von PCR-Produkten, welche mit den Amplikons für Vav3.1, Vav3 und Vav3b generiert wurden, wurde ein Größenmarker mitgeführt. Eine zusätzliche Sequenzierung wurde nicht durchgeführt.

2.5.7 Primer- und Sonden-Design

Zur Ermittlung von Primer / Sonden Kombinationen für die spezifische Amplifikation von Vav3 und Vav3.1 sowie für die nicht-selektive Amplifizierung beider Varianten (Vav3b) wurde das Primer Design Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) und das Roche Universal ProbeLibrary probe Assay Design-Programm verwendet (siehe Abschnitt 2.1).

Die entwickelten Amplikons (siehe Tabelle 2-1 sind Intron-überspannend, um eine Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden. Die Primer wurden bei TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) synthetisiert und waren über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gereinigt worden.

2. Material und Methoden

Die verwendeten sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden stammen aus der Universal ProbeLibrary (UPL) der Firma Roche Applied Science. Sie basiert auf 165 kurzen Hydrolyse-Sonden, die eine Länge von jeweils 8 bis 9 bp haben. Um trotz dieser Kürze die entsprechend hohen Schmelztemperaturen zu erreichen, werden in diese Sonden so genannte Locked Nucleic Acids (LNA) eingebaut. Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte Nucleinsäuren, die eine deutlich höhere Schmelztemperatur im Vergleich zu unmodifizierten Nucleinsäuren besitzen. Die Kürze der Sonden macht es wahrscheinlich, dass die entsprechende Sequenz in regelmäßiger Verteilung über das gesamte Transkriptom vorliegt. Mit den 165 Sonden der UPL ist es somit möglich annähernd 100% aller Transkripte zu detektieren. Aus dieser Bibliothek wurden die passenden Sonden ausgewählt. Alle verwendeten Sonden waren am 5'-Terminus mit dem Fluorophor Fluorescein (FAM) und am 3'-Terminus mit einem Dark Quencher Dye markiert.

Für Vav3 wurde ein Amplikon im Vav3-spezifischen 5'-Terminus der cDNA ausgewählt. Das Kontroll-Amplikon Vav3b ist im 3'-Terminus der cDNA positioniert und detektiert aufgrund der identischen 3'-Sequenz sowohl Vav3 als auch Vav3.1 mRNA. Die Erstellung eines spezifischen Vav3.1-Amplikons gestaltete sich schwieriger, da die Vav3.1-spezifische 5'-Sequenz lediglich 110 Nukleotide misst. Zur Ermittlung eines spezifischen Vav3.1-Amplikons wurden insgesamt vier verschiedene Amplikons getestet. (Vav3.1 F23/R172, probe#126; Vav3.1 F67/R157, probe#126; Vav3.1 F23/R157, probe#126 sowie Vav3.1 F54/R337, probe#1). Für die weiteren Versuche wurde das in Tabelle 2-1 beschriebene, 284 Nukleotide messende Amplikon verwendet. Aufgrund der Tatsache, dass dieses Amplikon gegenüber den Vav3- und Vav3b-Amplikons eine größere Länge aufwies, wurden die Extensionszeiten für alle Amplikons auf 24 sec festgelegt.

2. Material und Methoden

Tabelle 2-1 Verwendete QRT-PCR Amplikons

mRNA (Accession No)	Amplikon-Sequenz (5' – 3'-Orientierung): 1. forward Primer 2. reverse primer 3. Sonde	Amplikon-Länge (bp)
Vav3 (NM_006113)	1. Vav3F 554: TGGAGAAGTCTATGAGGACTTAATGA 2. Vav3R 625: CGTATATCATTTTCTGGACATTTGG 3. Roche universal probe library probe #6; 5' CAGAGGAA	72
Vav3.1 (NM_001079874)	1. Vav3.1 F54: CAAAATAACTTTACACTGACAATGCCAAT 2. Vav3.1R337: CCAACCTCTCCAGATGCTAAA 3. Roche universal probe library probe #1; 5' GCTCCAGG	284
Vav3b (Vav3 + Vav3.1) (NM_006113)	1. Vav3bF2134: 5' TGAGGCACAGGACCAAAGA 2. Vav3bR2205: 5' TGATGTGCTTTGCTTCATTATTGT 3. Roche universal probe library probe #2; 5' CAGGAGAA	72
PBGD (NM_000190)	1. PBGD UPS for: AGCTATGAAGGATGGGCAAC 2. PBGD UPS rev TTGTATGCTATCTGAGCCGTCTA 3. Roche universal probe library probe #65; 5' CTGGAGGA	70

2.5.8 Berechnung der relativen Genexpression

Die QRT-PCR Daten zur mRNA Expression von Vav3.1 und Vav3 (Targets) wurden mittels des internen Referenzgens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) (Janssens *et al.*, 2004; de Kok *et al.*, 2005) normalisiert und die relative mRNA Expression (R) wurde nach Pfaffl (2001) unter Verwendung der Formel

$$R = \frac{(E_{\text{Target}})^{\Delta CP_{\text{Target}}(\text{Normalgewebe} - \text{Tumorgewebe})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CP_{\text{Referenzgen}}(\text{Normalgewebe} - \text{Tumorgewebe})}}$$

berechnet. E steht in dieser Formel für die Effizienz der QPCR ($E = 10^{[-1/\text{Steigung}]}$), welche unter optimalen Reaktionsbedingungen gleich 2 ist, d.h. nach jedem PCR-Zyklus kommt es zur Verdopplung des Ausgangsmaterials.

Zusätzlich wurde das Verhältnis von Vav3.1 zu Vav3 berechnet. Um zu überprüfen, inwieweit sich die Vav3.1 bzw. Vav3 Expression in Normalgewebe signifikant von der Expression im Tumorgewebe unterscheidet, wurde ein gepaarter Wilcoxon Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zum quantitativen und differentiellen Nachweis der Expression von Vav3 und Vav3.1 in Gewebeproben entwickelt, es wurden anschließend 20 humane orale Plattenepithelkarzinome und gesundes Referenzgewebe bezüglich der Expression von Vav3 und Vav3.1 analysiert und die mRNA Expressionsdaten von Vav3 und Vav3.1 mit histopathologischen und klinischen Parametern korreliert.

3.1 Aufreinigung von Gesamt-RNA

Für die Analyse der Vav3 und Vav3.1 mRNA Expression wurde zunächst Gesamt-RNA aus Gewebematerial von insgesamt 23 Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom präpariert. Anhand einer HE-Färbung wurde der Anteil an Karzinomzellen in dem resezierten Tumorgewebe bestimmt, welcher im Durchschnitt ca. 20–60% betrug (Abb.3-1). Neben Tumormaterial wurde ebenfalls Gesamt-RNA aus nicht-entarteter Mundschleimhaut präpariert, welche als Referenzgewebe diente.

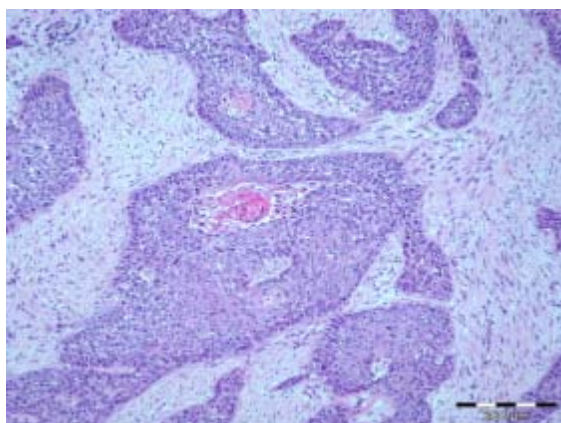


Abb.3-1 Beispiel eines Plattenepithelkarzinoms, HE-gefärbter Paraffinschnitt aus dem Rand eines zur RNA-Präparation verwendeten gefrorenen Gewebestücks. (Maßstab mit 50 µm Markierungen)

3. Ergebnisse

Die RNA-Ausbeute pro mm³ Gewebe war bei der Großzahl an Tumorpräparaten (T) höher als bei den Referenzpräparaten aus normaler Schleimhaut (N) (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1 Gesamt-RNA-Ausbeute

Patient*	Gesamt-RNA (µg)**	Patient*	Gesamt-RNA (µg)**
1 N	5,5	11 N	12,2
T	15,8	T	50,6
2 N	5,4	12 N	11,3
T	15,6	T	13,2
3 N	16,6	13 N	17,6
T	52,8	T	23,4
4 N	9,9	14 N	25,4
T	22,0	T	10,6
5 N	6,4	15 N	29,6
T	12,3	T	57,2
6 N	19,0	16 N	41,0
T	23,4	T	52,8
7 N	27,0	17 N	21,0
T	84,4	T	34,6
8 N	27,0	18 N	8,0
T	84,4	T	6,3
9 N	28,5	19 N	78,7
T	79,0	T	57,2
10 N	10,4	20 N	28,9
T	14,1	T	38,7

*N = Normalgewebe; T = Tumorgewebe

**pro 24 mm³ Gewebematerial

Im Allgemeinen sind RNA-Transkripte, insbesondere Transkripte von bis zu 10 kb, bekanntlich besonders sensitiv für Degradation, bedingt durch RNasen oder durch die chemische Instabilität dieses Moleküls. Die Beurteilung der RNA-Qualität ist somit essentiell bei der Untersuchung von Expressionsprofilen für die Reproduzierbarkeit und somit die Relevanz der erhobenen Daten (Bustin, 2002; Bustin und Nolan, 2004).

Aufgrundessen wurde die Qualität der aus Tumor- und Normalgewebe präparierten RNA unter Verwendung eines Agilent 2100 Bioanalyzers bestimmt.

3. Ergebnisse

Hierbei wird die präparierte RNA kapillarelektrophoretisch auf einem Mikro-Chip aufgetrennt. Die Integrität der RNA wird bei diesem Verfahren durch die Fluoreszenz-basierte Visualisierung der 18S und 28S ribosomalen RNA (rRNA) ermittelt. Nach der Auftrennung wird ein Elektropherogramm erstellt, was exemplarisch in Abbildung 3-1 für vier RNA-Isolate aus Mundschleimhautgewebe dargestellt ist. Die zwei prominenten Peaks in der Abbildung 3-2 D, repräsentativ für RNA hohe Integrität, stellen die 18S (ca. 41,5 sec Laufzeit) und 28S (ca. 48 sec Laufzeit) rRNA dar, der sehr viel kleinere Peak bei einer Elektrophoresezeit von ca. 22,5 sec spiegelt die 5S rRNA wider. Nach Sambrook *et al.* (1989) weist intakte RNA aus Gewebeproben gegenüber der 18S rRNA eine etwa zweifach höhere 28S rRNA Peak-Fläche auf. Bei Abnahme der RNA-Integrität hingegen kann dem Elektropherogramm die Verschiebung hin zu kleineren Fragmenten und eine Abnahme der Fluoreszenzintensität entnommen werden, da die Interkalation des Fluorophors an die RNA deutlich reduziert ist (Abb.3-2 B). Das Verhältnis von 28S zu 18S rRNA ist etwas verringert. Bei degradierter RNA kann kein prominenter Peak für die 28S rRNA identifiziert werden (Abb.3-2 A). Anhand des Kurven-Profiles im Elektropherogramm wird die RNA *integrity number*, die RIN, errechnet (Schroeder *et al.*, 2006). Die RIN kann Werte zwischen 1–10 einnehmen, wobei eine maximale RNA-Integrität eine RIN von 10 aufweist. Eine RIN von >5 repräsentiert nach Fleige und Pfaffl (2006) eine ausreichend gute RNA-Qualität. RNA mit einer RIN von <5 ist dementsprechend ungeeignet als Ausgangsmaterial für Genexpressionsstudien.

Für die vorliegende Studie wurde ein RIN-Schwellenwert von 6,3 festgelegt. Somit wurden nur RNA-Isolate hoher Qualität analysiert. Unter den Schwellenwert von 6,3 vielen 3 RNA-Isolate der 23 Patienten (46 Proben), so dass insgesamt RNA von 20 verschiedenen Patienten (40 Proben) die Basis für nachfolgende Genexpressionsstudien bildete.

3. Ergebnisse

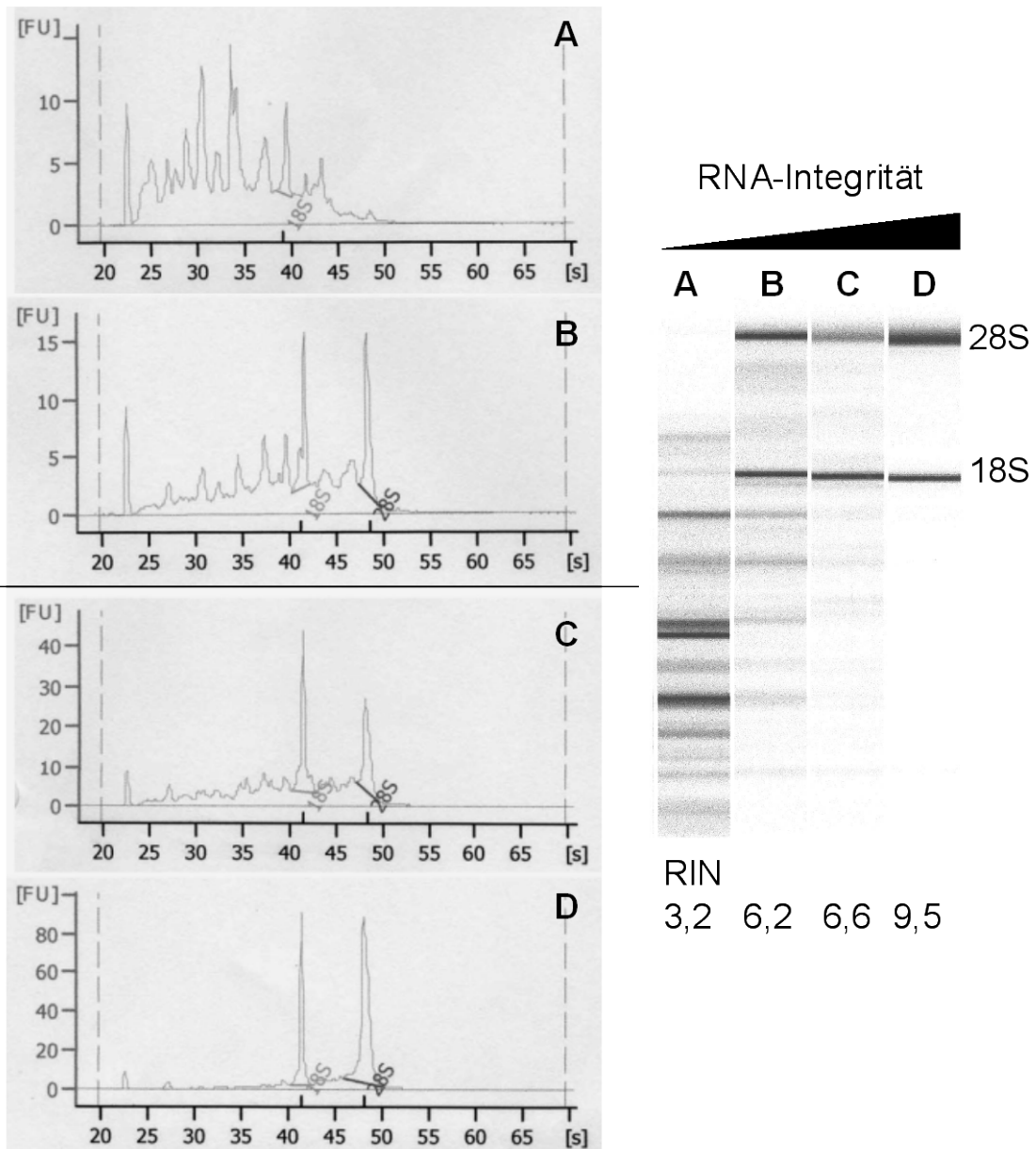


Abb. 3-2. Qualität der aus Gewebematerial präparierten Gesamt-RNA. Elektropherogramm der Kapillarelektrophorese von RNA-Isolaten (linke Bildhälfte) mit einer geringen Integrität (RIN = 3,2; **A**), mittleren Integrität (RIN = 6,2; **B**), hohen Integrität (RIN = 6,6; **C**) sowie einer sehr hohen RNA-Integrität (RIN = 9,5; **D**). Auf der y-Achse wird die Fluoreszenzintensität, auf der x-Achse die Elektrophoresezeit angegeben. Auf der rechten Bildhälfte sind die aus den Elektropherogrammen abgeleiteten Bilder dargestellt. Die in **A** und **B** dargestellten RNA-Extrakte wurden aufgrund der ungenügenden Integrität nicht in die Analyse miteinbezogen.

Nichtsdestotrotz kann durch die Analyse von auch nur geringfügig degradierter RNA aber auch schon ein systematischer Fehler entstehen, da die Anzahl an

3. Ergebnisse

RNA-Molekülen, welche ein intaktes Amplikon beinhalten, deutlich erniedrigt ist. Durch Verwendung von kurzen Amplikons (70–284 bp) konnte hier ein solcher systematischer Fehler reduziert werden, da selbst geringfügig degradierte RNA unter Umständen noch robust nachgewiesen werden kann. Außerdem wurde der Einfluss der Dauer der Gewebelagerung bei Raumtemperatur vor dem Schockgefrieren auf die RNA Qualität untersucht. Hierzu wurde in einer Testreihe frisch-gewonnenes Tumorgewebe für 15 und 25 Minuten bei Raumtemperatur gelagert, bevor es schockgefroren wurde. Hier waren keine deutlichen Unterschiede sowohl in der RNA-Qualität als auch in der Genexpression im Vergleich zum direkt schockgefrorenen Gewebe nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

3.2 Etablierung der QRT-PCR

Zur Etablierung eines aussagekräftigen und kostengünstigen QRT-PCR-Systems wurden mittels eines online Computerprogramms (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000>) Amplikons für die zu untersuchenden Gene entworfen (Abb.3-3). Hierzu wurden Sonden aus einer „Bibliothek“ aus 165 Sonden verwendet. Die Nukleotidsequenzen dieser 8 oder 9 Nukleotide messenden, vorgefertigten Sonden kommen überzufällig häufig im transkribierten Genom vor. Mittels des Roche Assay Design Center Computerprogrammes wurden nun homologe Sonden zu dem zu untersuchenden mRNA Abschnitt ausgewählt und zusammen mit individuell erstellten PCR Primern die spezifischen Amplikons ermittelt.

Für Vav3.1 war die Auswahl qualitativ hochwertiger Amplikons stark eingeschränkt, da die Vav3.1-spezifische Sequenz am 5'-Terminus der mRNA (Exon 1) lediglich 110 Nukleotide misst (Abb. 3-3 D). Um schließlich ein gutes Amplikon zu erhalten, wurden insgesamt vier verschiedene Amplikons erstellt und getestet. Ein etwas längeres, 284 bp messendes Amplikon erzielte spezifische, reproduzierbare QRT-PCR Ergebnisse.

3. Ergebnisse

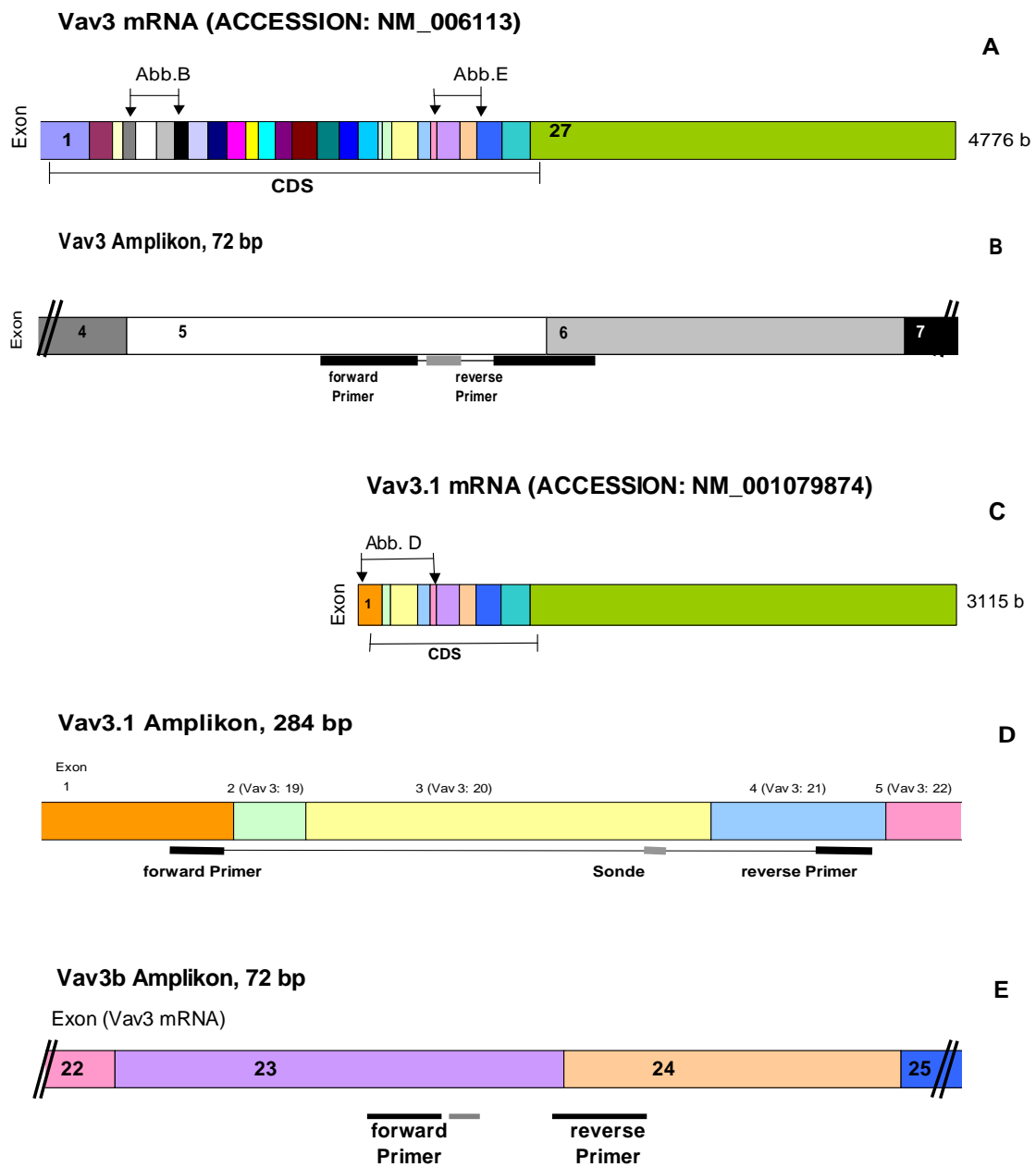


Abb. 3-3. Schematische Darstellung der Vav3 und Vav3.1 mRNA sowie der verwendeten QPCR-Amplikons. Die Vav3 mRNA (A) weist eine Länge von 4776 Basen auf und setzt sich aus 27 Exons zusammen. Das entworfene Amplikon von 72 bp Länge zur Quantifizierung der Vav3 mRNA Abundanz wird in Abb. B dargestellt. Abb. C repräsentiert die Vav3.1 mRNA, welche eine Länge von 3115 Basen und 10 Exons aufweist. Exon 2-10 sind identisch mit den Exons 19-27 der Vav3 mRNA. Das dazugehörige Vav3.1 Amplikon von 284 bp wird in Abb. D gezeigt. Abb. E spiegelt das Vav3b Amplikon wider. Die dargestellten mRNAs und Amplikons werden in 5'-3'-Richtung präsentiert.

3. Ergebnisse

Um einen direkten Vergleich der Vav3 und Vav3.1 mRNA-Expression in den verschiedenen Gewebe-Proben zu ermöglichen, wurden parallel zu den Vav3 Transkripten interne Referenz Gene (*housekeeping* Gene) amplifiziert. So genannte *housekeeping* Gene werden normalerweise konstitutiv exprimiert, so dass erwartungsgemäß die mRNA Abundanz in Tumoren vergleichbar zum nicht-entarteten Referenzgewebe sein sollte. Allerdings hat sich herausgestellt, dass die Expression einer Vielzahl von *housekeeping* Genen beispielsweise bei der malignen Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle reguliert sein kann (zusammengefasst von Bustin, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) für die Normalisierung der Genexpression verwendet. Das GAPDH-Amplikon wurde nach den initialen Tests durch das PBGD-Amplikon (Porphobilinogen Deaminase) ersetzt, da die Abundanz der PBGD mRNA der Abundanz der schwächer exprimierten Vav3 und Vav3.1 mRNAs ähnlicher war (durchschnittliche *crossing points* der Amplikons: GAPDH etwa 17 Zyklen, PBGD etwa 23 Zyklen, Vav3.1 etwa 27 Zyklen, Vav3 etwa 32 Zyklen, Vav3b etwa 26 Zyklen, Abb.3-4). Hierdurch konnten zykluszahlbedingte Ungenauigkeiten reduziert werden.

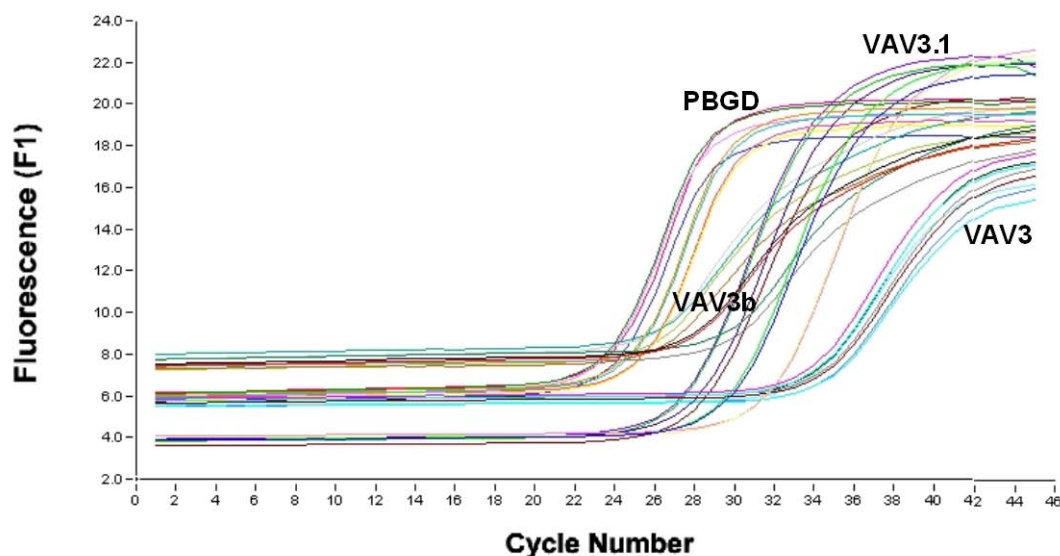


Abb. 3-4 Auszüge aus den erhobenen Daten. QRT-PCR Resultate (Roche lightcycler). Dargestellt ist die Menge der PCR Produkte detektiert anhand der Fluoreszenz während der PCR Amplifikation durch die Hydrolyse der Sonden (y-Achse) über den zeitlichen Verlauf der PCR anhand der PCR-Zykluszahlen (x-Achse). Von 2 Patienten (Normal- und Tumorgewebe), 4 Amplikons (PBGD, Vav3b, Vav3 und Vav3.1) jeweils in Duplikaten.

3.3 Überprüfung der PCR-Produkte

Um die spezifische, QRT-PCR-basierte Amplifikation der Target-mRNAs zu verifizieren, wurden parallele Reaktionsansätze ohne Reverse Transkriptase mitgeführt (non-RT-Kontrolle). Hier konnten für die drei Amplikons (Vav3.1, Vav3 und Vav3b) nach 45 Zyklen jeweils keine spezifischen Produkte detektiert werden. Für Vav3.1 und Vav3 waren überhaupt keine detektierbaren Produkte entstanden, für Vav3b war ab dem 35. Zyklus ein unspezifisches Produkt in sehr geringer Konzentration nachweisbar.

Zur weiteren Absicherung des methodischen Vorgehens wurden die spezifischen Amplikons mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Die Reaktionsprodukte aus der QRT-PCR wurden elektrophoretisch auf einem 2%igen Agarose Gel aufgetrennt und die DNA-Banden anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Hier konnten anhand eines mitgeführten Größenmarkers die spezifischen Banden für die Amplikons Vav3.1 von 284 bp, Vav3 von 72 bp und Vav3b von ebenfalls 72 bp zugeordnet werden. (Abb.3-5). Eine zusätzliche Sequenzierung wurde nicht durchgeführt. Darüberhinaus ist in der Abb. 3-3 ebenfalls das QPCR-Produkt des PBGD-Amplikons dargestellt, welches auch eine Länge von 72 bp aufweist.

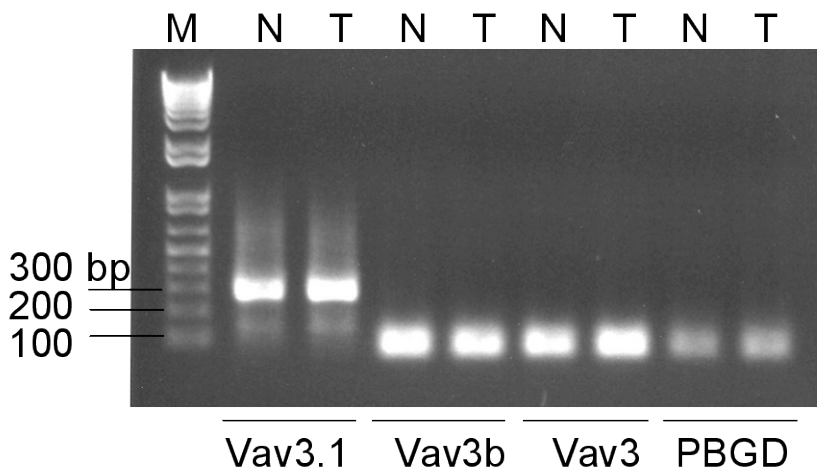


Abb. 3-5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Vav3.1-, Vav3b-, Vav3- sowie PBGD-spezifischen PCR-Produkten. Gesamt-RNA wurde aus Plattenepithelkarzinomgewebe (T) oder Mundschleimhautgewebe (N) desselben Patienten präpariert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde eine QRT-PCR mit 45 Zyklen durchgeführt und die PCR Produkte auf einem Agarose Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

3.4 Differentielle Genexpression

Zur Bestimmung der differentiellen Genexpression wurden die Daten aus der QRT-PCR statistisch ausgewertet. Im gepaarten Wilcoxon Test wurden die Expressionsdaten von Vav3.1 und Vav3 im Tumorgewebe über die interne Referenz-mRNA PBGD (*housekeeping* Gen) normalisiert und paarweise mit den entsprechend normalisierten Expressionsdaten aus der normalen Schleimhaut verglichen. Zusätzlich wurde ein Randomisierungstest (*Pairwise Fixed Reallocation Randomisation Test*) unter Verwendung der REST-384-software Version 1 (Pfaffl *et al.*, 2002) durchgeführt.

Als zusätzliche Kontrolle der Vav3 und Vav3.1 Amplifikation wurde das Vav3b Amplikon in allen Untersuchungen zusätzlich amplifiziert. Das Vav3b Amplikon liegt im homologen Teil von Vav3.1 und Vav3 und kann somit nicht zwischen den beiden Varianten unterscheiden und amplifiziert folglich von **beiden** Transkripten (**Vav3b**). Dadurch, dass dieses Amplikon beide Transkripte amplifiziert, war ein schnelleres Erreichen der linearen Phase in der QRT-PCR zu erwarten. Tatsächlich zeigte sich eine, um ca. einen *crossing point* stärkere Amplifikation als bei dem Vav3.1 Amplikon, was einer ca. 3,3-fachen höheren Expression entspricht. Dies kann zum einen daran liegen, dass es noch weitere, bisher unbekannte Isoformen von Vav3 gibt, und somit noch andere Transkripte amplifiziert werden. Zum anderen könnte auch die Effizienz des Vav3b Amplikons höher sein als die der Vav3 und Vav3.1 Amplikons. Genauere Untersuchungen zur Effizienz der Amplikons wurden nicht durchgeführt. Jedoch könnte aus der Tatsache, dass die Vav3b Amplifizierung mit der Amplifikation von Vav3 und vav3.1 korreliert, ein zusätzlicher Hinweis auf die spezifische Amplifikation durch die Vav3 und Vav3.1 Amplikons erreicht werden.

3.4.1 Differentielle Genexpression von Vav3

Vav3 zeigt keine signifikanten Unterschiede im mRNA Expressionsmuster in oralen Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu normaler Schleimhaut (Abb.3-6 **A**). Auch sind keine signifikanten Unterschiede bezüglich der anderen

3. Ergebnisse

untersuchten Parameter wie Lymphknotenstatus, Tumorausdehnung und histopathologischem Differenzierungsgrad nachweisbar.

Bemerkenswert ist, dass Vav3 gegenüber Vav3.1 sowohl in normaler Mundschleimhaut als auch in Gewebe aus oralen Plattenepithelkarzinomen ein insgesamt niedriges Expressionsniveau aufweist (Abb.3-6 **C**). Der *crossing point* liegt bei dem verwendeten Amplikon bei durchschnittlich knapp 32 Zyklen. Bei solch niedriger Expression ist eine verlässliche Aussage bezüglich einer differentiellen Expression jedoch nur mit einer gewissen Einschränkung möglich, da sich bei hohen Zykluszahlen systematische Fehler verstärken können. Da jedoch alle PCR Experimente in Duplikaten durchgeführt wurden, und sich hier durchschnittlich nur ein minimaler Fehler von unter 5% ergab, erscheint die Analyse trotz des geringen Expressionsniveaus und der daraus resultierenden hohen Zykluszahlen zuverlässig zu sein. Um zusätzlich auszuschließen, dass die schwache Expression durch ein Amplikon geringer Effizienz vorgetäuscht wird, wurde die Vav3 Expression auch in anderen Geweben analysiert. Hier wurden zum Teil deutlich höhere Expressionsraten nachgewiesen (Merkelzellkarzinom: CP=25 Zyklen, pleomorphes Adenom, Zystadenolymphom der Glandula Parotis: CP=26 Zyklen).

3.4.2 Differentielle Genexpression von Vav3.1

Vav 3.1 zeigt deutliche Unterschiede in der Expression im Vergleich von normaler Schleimhaut und Plattenepithelkarzinomgewebe. Die Expression von Vav3.1 ist in den Karzinomen verglichen mit der normalen Schleimhaut (n=20) signifikant (nicht-parametrischer Test nach Wilcoxon: $p=0.006$) auf die Hälfte herunterreguliert (Abb.3-6 **B**).

Bezüglich des Differenzierungsgrades (histopathologisches Grading) und der Tumorausbreitung (T-Klassifizierung) waren keine signifikanten Korrelationen nachweisbar.

3. Ergebnisse

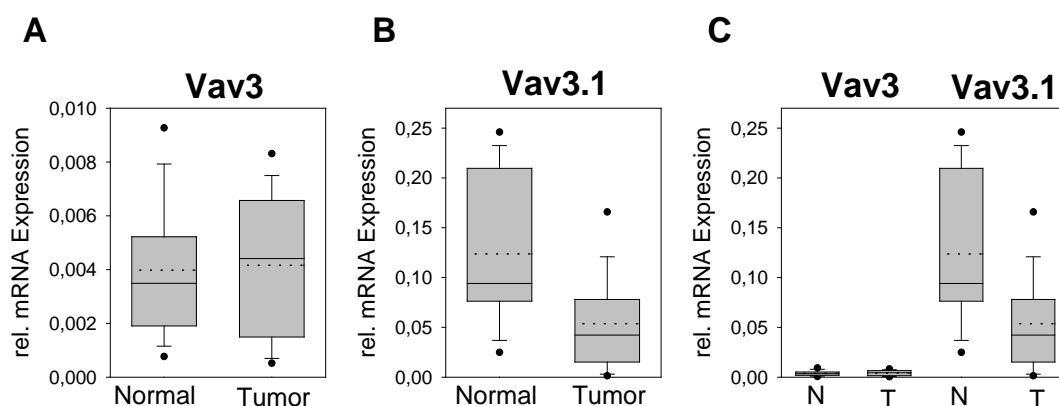


Abb. 3-6 Relative Vav3 (A, C) und Vav3.1 (B, C) mRNA Expression in Normal- und Tumorgewebe. Aus 20 Tumorstücken und der dazugehörigen nicht-entarteten Mundschleimhaut wurde RNA präpariert, in cDNA umgeschrieben und mittels QPCR analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA Expression von Vav3 und Vav3.1 nach Normalisierung über das interne Referenzgen PBGD anhand eines Boxplots. Die Boxen repräsentieren das 25. und 75. Perzentil, die „Schnurrhaare“ begrenzen das 10. und 90. Perzentil. Außerhalb liegende Datenpunkte werden als Symbol angezeigt. Die durchgezogene Linie innerhalb der Box stellt den Median der Daten dar, die gestrichelte Linie den Mittelwert.

3.4.3 Differentielle Genexpression Vav3.1/Vav3

Unter der Annahme, dass die durch die Vav3 Signalkaskade regulierten zellspezifischen Funktionen aus einem regulierten Zusammenspiel der beiden Varianten resultieren ergibt sich zur Analyse der Genexpression eine elegante, einfache und effiziente Rechnung. Hierzu muss lediglich das Verhältnis aus der Expression der beiden Gene gebildet werden. Diese Bestimmung der Ratio ermöglicht eine direkte Analyse der Daten ohne weitere Normalisierung der Expressionsdaten über ein internes Referenz- bzw. *housekeeping*-Gen wie PBGD. Zur Analyse mittels der Vav3.1/Vav3 mRNA Ratio wurden die 20 verschiedenen Fälle in einzelne Untergruppen (T, N oder G Stadium) unterteilt. Auch hier ließen sich für die Tumorausdehnung (T) und das Grading (G) wiederum keine signifikanten Unterschiede herausrechnen.

Für den Metastasierungsgrad in lokale Lymphknotenstationen ergab sich jedoch ein signifikanter Unterschied in der Vav3.1/Vav3 Ratio. Acht der 20 untersuchten Karzinome hatten bereits Lymphknotenmetastasen gebildet. Bei diesen aggressiven und mit einer schlechten Prognose einhergehenden Karzinomen war

3. Ergebnisse

das Verhältnis zwischen der Vav3.1 und Vav3 Expression am kleinsten (Abb.3-7). Hier zeigte sich eine 3,5-fache Herunterregulierung der Vav3.1 mRNA bei Karzinomen, welche bereits Lymphknotenmetastasen gebildet hatten (n=8; $p=0,009$, gepaarter Wilcoxon Test).

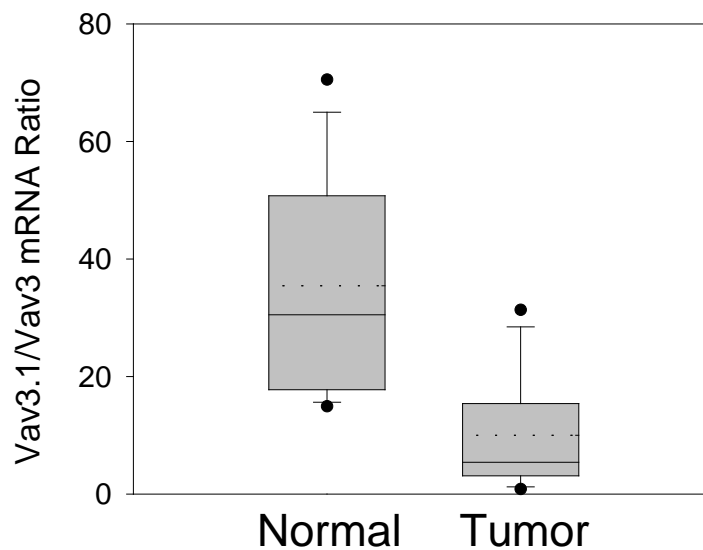


Abb. 3-7 Vav3.1/Vav3 mRNA Ratio in Normal- und Tumorgewebe. Aus 8 Tumorproben von Patienten mit Lymphknotenmetastasen und der dazugehörigen nicht-entarteten Mundschleimhaut wurde RNA präpariert, in cDNA umgeschrieben und mittels QPCR analysiert. Dargestellt ist die Vav3/Vav3.1 mRNA Ratio anhand eines Boxplots. Die Boxen repräsentieren das 25. und 75. Perzentil, die „Schnurrhaare“ begrenzen das 10. und 90. Perzentil. Außerhalb liegende Datenpunkte werden als Symbol angezeigt. Die durchgezogene Linie innerhalb der Box stellt den Median der Daten dar, die gestrichelte Linie den Mittelwert.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals eine signifikante differentielle Genexpression der Vav3.1 mRNA *ex vivo* nachgewiesen werden. In Gewebeproben oraler Plattenepithelkarzinome zeigte sich im Vergleich zu normaler oraler Schleimhaut eine signifikante Herunterregulierung der Vav3.1 mRNA. Besonders ausgeprägt ist die Herunterregulierung im direkten Vergleich zur Vav3 Expression in den Karzinomen, welche Absiedlungen in Halslymphknoten verursacht haben. Diese Ergebnisse sind statistisch signifikant, jedoch beruhen sie auf geringen Fallzahlen. Falls sich diese Beobachtung in Untersuchungen mit größeren Fallzahlen bestätigt, könnte ein diagnostischer Marker, beispielsweise zur Therapieplanung, etabliert werden. Würde ein solcher Marker eine Lymphknotenmetastasierung unwahrscheinlich erscheinen lassen, so könnte beispielsweise eine weniger destruiende Operation durchgeführt oder auch die Bestrahlungsdosis durch entsprechende Verteilung effektiver eingesetzt werden.

Die Bedeutung der beiden untersuchten Transkripte in der Tumorigenese des oralen Plattenepithelkarzinoms ist bisher ungeklärt. Da enge Verknüpfungen von Vav3 und Vav3.1 mit tumorrelevanten Signalwegen wie der EGF oder der TGF β Signalkaskade vorliegen, erscheint eine Tumorrelevanz jedoch wahrscheinlich. Die bereits bekannten Funktionen von Vav3 bei der Zellteilung und der Ausbildung und Veränderung des Zytoskeletts könnten insbesondere bei aggressivem Tumorwachstum von Bedeutung sein. Die aggressiven oralen Plattenepithelkarzinome mit einer schlechten Prognose zeichnen sich durch ein ausgeprägtes lokal invasives Wachstum und/oder durch frühzeitige Metastasierung in regionäre Lymphknoten aus. Dieses aggressive Verhalten der Tumorzellen benötigt unter anderem eine aktivierte Zellmotilität, wie sie interessanterweise auch bei physiologischen Funktionen, wie der Immunantwort und der Wundheilung, benötigt werden. Eine Dysregulierung solcher Vav-spezifischer Funktionen könnte folglich eine Tumorigenese bedingen.

Ein invasiver Phänotyp, aggressives Tumorwachstum und Metastasierung gehen oft mit einer Dysregulierung des Aktin Systems einher. Das Aktin Zytoskelett

4. Diskussion

besteht neben Aktin Filamenten aus einer Vielzahl Aktin-bindender Proteine welche das dynamische Verhalten des Aktin Zytoskeletts bestimmen. Hierüber werden Zellfunktionen wie Adhäsion, Beweglichkeit, Exozytose, Endozytose und Teilung beeinflusst (Ridley *et al.*, 2003). Aufgrund der Vielzahl von Proteinen und Regulationsmechanismen die hier zusammenspielen, bestehen viele Möglichkeiten der Dysregulation und somit auch der Entstehung von Krankheiten. So werden Tumorinvasion und Metastasierung mit der Dysregulierung des Aktin Systems in Zusammenhang gebracht (Lambrechts *et al.*, 2004; Hofman *et al.*, 2008). Das Aktin Skelett wird durch ein komplexes Zusammenspiel der GTPasen Ras, Rac, Rho, Cdc42 und der Src Tyrosinkinase moduliert. Inhibitoren solcher Proteine könnten die Aktin Remodellierung zielgerichtet im Rahmen einer Krebstherapie beeinflussen (Rao und Li, 2004). Vav3 und die anderen Mitglieder der Vav-Familie können beispielsweise durch Aktivierung von GTPasen solche Signalwege modulieren. Für Vav2 wurde kürzlich ein EGFR/Vav2/Rac1 Regulierungsmechanismus bei invasiven Plattenepithelkarzinomen beschrieben (Patel *et al.*, 2007). Aufgrund bekannter, redundanter Funktionen der Vav Proteine besteht die Möglichkeit, dass Vav3.1 auch in diesen Vav2 Signalweg durch wachstumsfaktorregulierte Expression steuernd eingreift und über diesen Mechanismus das invasive Wachstum von Plattenepithelkarzinomen reguliert. Natürlich sind auch Vav3 isoformspezifische Regulationsmechanismen denkbar. Für Prostatakarzinome sind bereits solche Vav3 abhängigen Mechanismen bei der Tumorprogression beschrieben. Lyons *et al.* (2008) konnten eine Vav3 stimulierte Aktivierung des Androgen Rezeptor Transkriptionsfaktors nachweisen. Eine erhöhte Vav3 Expression und eine zusätzliche wachstumsfaktorinduzierte Vav3 Aktivierung scheinen ein androgenunabhängiges Wachstum von Prostatakarzinomen zu stimulieren.

Vav3.1 wird in den hier untersuchten Geweben deutlich stärker exprimiert als Vav3. In normaler oraler Schleimhaut liegen die *crossing points* in der QRT-PCR für Vav3.1 bei durchschnittlich 26,5 Zyklen, in den Plattenepithelkarzinomen aber bei ca. 28 Zyklen. Folglich ist die Vav3.1 Expression in den Karzinomgeweben herunterreguliert. Dadurch, dass in dieser Arbeit ein heterogenes Gewebematerial für die Expressionsanalyse verwendet wurde, ist es vorstellbar, dass die Analyse Laser-mikrodissektionierter Tumorzellen eine noch signifikantere

4. Diskussion

Herunterregulation der Vav3.1 mRNA zeigt. Im Gegensatz zu den homogenen mikrodissektionierten Tumorzellen weisen die hier untersuchten resezierten Tumorgewebeproben einen Anteil an Karzinomzellen von ca. 20-60% auf. Demzufolge werden auch beispielsweise Zellen aus dem Tumorstroma, apoptotische und nekrotische Zellen in die Expressionsstudie miteinbezogen.

Neben dem verwendeten Gewebematerial hat das zur Normalisierung verwendete *housekeeping Gen* einen erheblichen Einfluss auf die ermittelte Expression von Targetgenen. Aus mehreren Studien geht hervor, dass die Expression vieler *housekeeping Gene* unter verschiedenen metabolischen Bedingungen oder zwischen verschiedenen Geweben nicht konstant ist (Schmittgen *et al.*, 2000; Goidin *et al.*, 2004). Infolgedessen muss darauf geachtet werden, dass das verwendete *housekeeping Gen* bestimmte Kriterien, wie eine konstitutive, stabile Expression in dem untersuchten Probenmaterial erfüllt. Die Expressionsstärke sollte vergleichbar mit derjenigen des Targetgens sein. Zudem sollte kein Pseudogen des *housekeeping Gens* vorliegen und eine RNA-spezifische Amplifikation gewährleistet sein (Thellin *et al.*, 1999; Bustin, 2000; Radonić *et al.*, 2004). Das hier verwendete *housekeeping Gen* PBGD wurde eingesetzt, da die zelluläre Expression gegenüber dem *housekeeping Gen* GAPDH deutlich geringer ist. Somit ist die PBGD Expression vergleichbarer mit der Expression von Vav3 und Vav3.1 (siehe Abschnitt 3.2). Darüber hinaus wurde zwischen den Tumor- und Normalgewebeproben bei adäquat eingesetzter RNA-Konzentration kein signifikanter Unterschied in der PBGD Expression festgestellt (Daten nicht gezeigt). Daher kann davon ausgegangen werden, dass PBGD in den untersuchten Gewebeproben stabil exprimiert wird und somit für die Normalisierung geeignet ist. Für die Verifizierung erhobener Expressionsdaten wäre es allerdings erstrebenswert, eine Normalisierung unter Verwendung eines geeigneten Sets weiterer *housekeeping Gene* durchzuführen, wodurch die Fehleranfälligkeit der Quantifizierung reduziert werden kann (Vandesompele *et al.*, 2002).

Für Vav3 liegen die *crossing points* in Tumor- und Normalgewebe durchschnittlich bei ca. 32 Zyklen. Bei einer linearen Amplifikation mit einer Effizienz von 2 (exakte Verdopplung des Templates nach jedem PCR-Zyklus), entspricht dies in normaler Schleimhaut einer 45-fach ($=2^{-\Delta CP}$; 26,5 versus 32 Zyklen, $\Delta CP=-5,5$) höheren

4. Diskussion

Expression von Vav3.1 gegenüber Vav3. Dieses Expressionsmuster deckt sich mit früheren Studien an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT und einer Vielzahl anderer Zelllinien und Geweben, bei denen mittels semiquantitativer PCR unter Verwendung anderer Amplikons sowie auch im Northern Blot ein ähnliches differentielles Expressionsmuster von Vav3.1 und Vav3 nachgewiesen wurde (Trenkle *et al.*, 2000). Interessanterweise ist jedoch das Verhältnis der beiden Varianten in den bisher untersuchten Geweben und Zelllinien in über der Hälfte der Fälle zugunsten einer höheren Expression von Vav3 verteilt (Trenkle *et al.*, 2000; Zeng *et al.* 2000).

Die Rolle der verkürzten Transkriptvariante Vav3.1 in diesem Szenario ist bis dato ungeklärt. Es ist beispielsweise denkbar, dass Vav3.1 als Schalter für Vav3 fungiert. Durch die in der vorliegenden Studie gezeigte Herunterregulierung von Vav3.1 in den Karzinomen könnten kompetitiv gehemmte Vav3 Signalwege freigeschaltet und das Karzinomwachstum begünstigt werden. Die Verwendung dieses Vav3-Vav3.1 Regulationsmechanismus als therapeutisches Target wäre folglich denkbar. Beispielsweise könnte die Vav3 Funktion mittels spezifischer Inhibitoren und die Vav3.1 Expression über Blockierung von Wachstumsfaktorsignalwegen beeinflusst werden.

Im Gegensatz zum Vav3 Protein wurde in den veröffentlichten Untersuchungen das Vav3.1 Protein bisher nicht nachgewiesen. Die Vav3.1 mRNA hingegen konnte in unterschiedlichsten humanen Geweben und Zelllinien, sowie auch in der Maus nachgewiesen werden. Die bisher eingesetzten Antikörper sind jeweils nur gegen Vav3 spezifische Domänen gerichtet. Diese Antikörper erkennen das Vav3 Protein an Proteinstrukturen, welche im verkürzten Vav3.1 Protein nicht oder nicht in voller Länge vorliegen. In weiteren Untersuchungen ist es dringend notwendig einen Vav3.1 spezifischen Antikörper zu etablieren, um das Protein nachzuweisen und die postulierten biologischen Funktionen zu charakterisieren.

Über die Expression und Funktionen von Vav3 und Vav3.1 in anderen Tumorentitäten liegen bisher keine Daten vor. Da die Vav3 Transkripte jedoch in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe exprimiert werden, und zumindest für Vav3 tumorrelevante Funktionen, wie Veränderungen des Zytoskeletts und der Transkription beschrieben sind, ist eine Bedeutung bei der Entwicklung anderer

4. Diskussion

Neoplasien ebenfalls wahrscheinlich. Neben weiteren Karzinomen sollten in folgenden Untersuchungen auch nicht-epitheliale Tumore untersucht werden.

Bei Bestätigung der bereits erzielten Ergebnisse könnte ein Tumormarker etabliert werden oder es können, nach Abgleich mit dem Krankheitsverlauf - wie dem Auftreten von Lokalrezidiven oder dem Metastasierungsgrad -, Informationen bezüglich der Prognose der Tumorerkrankung gewonnen werden.

Neben diesen diagnostischen Aspekten könnten neue therapeutische Ansätze erfasst werden. Besonders interessant wäre die Weiterentwicklung multimodaler Therapien, wie sie bereits bei dem oralen Plattenepithelkarzinom angewendet werden. Hier können neue Therapeutika wie spezifische Antikörper gegen Signalmoleküle oder Tyrosinkinaseinhibitoren zusammen mit einer klassischen Chemo- oder Strahlentherapie angewendet werden.

5. Zusammenfassung

Die Vav Gene werden als Onkogene eingestuft. Vav1, Vav2 und Vav3 sind intrazelluläre Proteine und bestehen aus 9 funktionellen Domänen. Dies ermöglicht multiple Interaktionen mit einer Vielzahl anderer Proteine in unterschiedlichen Signalkaskaden. Von Vav3 gibt es eine verkürzte Transkriptvariante Vav3.1, welche lediglich 3 der 9 Domänen enthält. Für die verkürzte Variante wird postuliert, dass diese sowohl zu Vav3 identische, als auch eigenständige Funktionen im Rahmen der Signaltransduktion wahrnehmen kann. Zudem besteht die Möglichkeit, dass diese verkürzte Variante durch Konkurrenz mit Bindungspartnern die Funktionen von Vav3 regulieren kann.

Vav3 ist ein phosphorylierungsabhängiger GDP-GTP Austauschfaktor und kann Rho und Rac GTPasen aktivieren. Hierüber werden unter anderem Veränderungen des Aktin Zytoskeletts sowie auch Transkriptionsfaktoren, welche die Zellentwicklung und Proliferation beeinflussen, reguliert. Über die verkürzte Variante Vav3.1 ist noch wenig bekannt; zum einen wurde in vorausgegangenen Studien ein im Vergleich zu Vav3 unterschiedliches Expressionsmuster in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen, zum anderen konnte in Wachstums-Experimenten mit humanen Keratinozyten durch Stimulation mit den Wachstumsfaktoren EGF und TGF β die Expression der Vav3.1 mRNA herunterreguliert werden. Die einzigen bisher veröffentlichten Daten bezüglich der Expression von Vav3 in Karzinomen zeigen eine Überexpression von Vav3 in Prostatakarzinomen (Dong *et al.*, 2006; Lyons und Burnstein, 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Amplikons zur Detektion der Vav3 und Vav3.1 mRNA Expression mittels QRT-PCR entworfen und etabliert. Weiterhin wurde das Expressionsmuster von Vav3 und Vav3.1 in Gewebematerial von 20 oralen Plattenepithelkarzinomen und entsprechender normaler oraler Schleimhaut untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante, 2-fach geringere Expression der Vav3.1 mRNA in den Karzinomen verglichen mit der normalen Schleimhaut. Besonders interessant ist die Beobachtung, dass die Vav3.1 Expression in den aggressiven Karzinomen, welche bereits Lymphknotenmetastasen ausgebildet hatten, am deutlichsten reduziert war. Hier

5. Zusammenfassung

zeigte sich im Vergleich zur unveränderten Vav3 Expression eine signifikante, um den Faktor 3,5 verringerte Vav3.1 mRNA Expression.

Wenn sich diese Ergebnisse in weiteren Studien mit größeren Fallzahlen bestätigen, könnte ein Tumormarker oder ein prognostischer Marker etabliert werden. So könnten beispielsweise bereits vor Therapiebeginn Aussagen über ein mögliches Metastasierungsverhalten des Karzinoms getroffen werden und somit das Behandlungsregime entsprechend angepasst werden. Für Karzinome mit hoher Metastasierungs Wahrscheinlichkeit in lokale Lymphknotenstationen müsste beispielsweise die Lymphknotenausräumung ausgedehnter erfolgen als bei Karzinomen mit geringem Metastasierungspotential. Weiterhin könnten weitere therapeutische Ansätze, beispielsweise durch Modulierung der Vav3 und Vav3.1 Signalkaskaden, untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

- Atsaturov I, Cohen RB, Harari P.
EGFR-targeting monoclonal antibodies in head and neck cancer.
Curr Cancer Drug Targets. 2007;**7**:650-665.
- Billadeau DD.
Cell growth and metastasis in pancreatic cancer: is Vav the Rho'd to activation?
Int J Gastrointest Cancer. 2002;**31**:5-13.
- Bustelo XR.
Regulatory and signaling properties of the Vav family.
Mol Cell Biol. 2000;**20**:1461-1477.
- Bustelo XR.
Vav proteins, adaptors and cell signaling.
Oncogene 2001;**20**:6372-6381.
- Bustin SA, Nolan T.
Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.
J of Biomol Tech 2004;**15**:155-166.
- Bustin SA.
Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.
J of Mol Endocrinol 2002;**29**:23-39.
- Bianco R, Gelardi T, Damiano V, Ciardiello F, Tortora G.
Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment.
Int J Biochem Cell Biol. 2007;**39**:1416-1431.
- Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, Di Liberto C, Scully C, Lo Muzio L.
Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review).
Int J Oncol. 2007;**30**:813-823.
- Charvet C, Canonigo AJ, Billadeau DD, Altman A.
Membrane localization and function of Vav3 in T cells depend on its association with the adapter SLP-76.
J Biol Chem. 2005;**280**:15289-15299.
- Chomczynski P, Sacchi N.
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem. 1987;**162**:156-159.

6. Literaturverzeichnis

- de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN.
Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes.
Lab Invest. 2005;**85**:154-159.
- Dong Z, Liu Y, Lu S, Wang A, Lee K, Wang LH, Revelo M, Lu S.
Vav3 oncogene is overexpressed and regulates cell growth and androgen receptor activity in human prostate cancer.
Mol Endocrinol. 2006;**20**:2315-2325.
- Etienne-Manneville S, Hall A.
Rho GTPases in cell biology.
Nature. 2002;**420**:629-635.
- Faccio R, Teitelbaum SL, Fujikawa K, Chappel J, Zallone A, Tybulewicz VL, Ross FP, Swat W.
Vav3 regulates osteoclast function and bone mass.
Nat Med. 2005;**11**:284-290.
- Fidler IJ.
Critical determinants of metastasis.
Semin Cancer Biol. 2002;**12**:89-96.
- Fleige S, Pfaffl MW.
RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance.
Molecular Aspects of Medicine 2006;**27**:126-139.
- Fujikawa K, Inoue Y, Sakai M, Koyama Y, Nishi S, Funada R, Alt FW, Swat W.
Vav3 is regulated during the cell cycle and effects cell division.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;**99**:4313-4318.
- Fujikawa K, Miletic AV, Alt FW, Faccio R, Brown T, Hoog J, Fredericks J, Nishi S, Mildiner S, Moores SL, Brugge J, Rosen FS, Swat W.
Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells.
J Exp Med. 2003;**198**:1595-1608.
- Gasparotto D, Maestro R.
Molecular approaches to the staging of head and neck carcinomas (review).
Int J Oncol. 2007;**31**:175-180.
- Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O.
Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations.
Anal Biochem. 2001;**295**:17-21.

6. Literaturverzeichnis

Henske EP, Short MP, Jozwiak S, Bovey CM, Ramlakhan S, Haines JL, Kwiatkowski DJ.

Identification of VAV2 on 9q34 and its exclusion as the tuberous sclerosis gene TSC1.

Ann Hum Genet. 1995;**59**:25-37.

Hofman P, Butori C, Havet K, Hofman V, Selva E, Guevara N, Santini J, Van Obberghen-Schilling E.

Prognostic significance of cortactin levels in head and neck squamous cell carcinoma: comparison with epidermal growth factor receptor status.

Br J Cancer. 2008;**98**:956-64.

Hornstein I, Alcover A, Katzav S.

Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization.

Cell Signal. 2004;**16**:1-11.

Hunter SG, Zhuang G, Brantley-Sieders D, Swat W, Cowan CW, Chen J. Essential role of Vav family guanine nucleotide exchange factors in EphA receptor-mediated angiogenesis.

Mol Cell Biol. 2006;**26**:4830-4842.

Huntley SP, Davies M, Matthews JB, Thomas G, Marshall J, Robinson CM, Eveson JW.

Attenuated type II TGF-beta receptor signalling in human malignant oral keratinocytes induces a less differentiated and more aggressive phenotype that is associated with metastatic dissemination.

Int J Cancer. 2004;**110**:170-176.

Janssens N, Janicot M, Perera T, Bakker A, Paterson IC, Prime SS.

Housekeeping genes as internal standards in cancer research.

Mol Diagn. 2004;**8**:107-13.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ.

Cancer statistics, 2008.

CA Cancer J Clin. 2008;**58**:71-96.

Katzav S.

Flesh and blood: the story of Vav1, a gene that signals in hematopoietic cells but can be transforming in human malignancies.

Cancer Lett. 2007 Oct 8;**255**(2):241-54. Epub 2007 Jun 21.

Katzav S, Martin-Zanca D, Barbacid M.

vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells.

EMBO J. 1989;**8**:2283-2290.

6. Literaturverzeichnis

- Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N.
Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis.
Biol Chem. 2006;**387**:365-372.
- Khazaie K, Schirmacher V, Lichtner RB.
EGF receptor in neoplasia and metastasis.
Cancer Metastasis Rev. 1993;**12**:255-274.
- Kovács AF, Megahed W, Scholz M, Sader R.
Survival improvement of a unicentric overall population in 20 years: 1038 patients with oral and oropharyngeal squamous cell cancer 1983-2004.
Mund Kiefer Gesichtschir. 2007;**11**:267-283.
- Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe.
Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken, 2006
- Lambrechts A, Van Troys M, Ampe C.
The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility.
Int J Biochem Cell Biol. 2004;**36**:1890-1909.
- Lee K, Liu Y, Mo JQ, Zhang J, Dong Z, Lu S.
Vav3 oncogene activates estrogen receptor and its overexpression may be involved in human breast cancer.
BMC Cancer 2008;**8**:158
- Leethanakul C, Knezevic V, Patel V, Amornphimoltham P, Gillespie J, Shillitoe EJ, Emko P, Park MH, Emmert-Buck MR, Strausberg RL, Krizman DB, Gutkind JS; Head and Neck Cancer Genome Anatomy Project.
Gene discovery in oral squamous cell carcinoma through the Head and Neck Cancer Genome Anatomy Project: confirmation by microarray analysis.
Oral Oncol. 2003;**39**:248-258.
- Lozano E, Betson M, Braga VM.
Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion.
Bioessays. 2003;**25**:452-63.
- Lyons LS, Burnstein KL.
Vav3, a Rho GTPase guanine nucleotide exchange factor, increases during progression to androgen independence in prostate cancer cells and potentiates androgen receptor transcriptional activity.
Mol Endocrinol. 2006;**20**:1061-1072.
- Lyons LS, Rao S, Balkan W, Faysal J, Maiorino CA, Burnstein KL.
Ligand-independent Activation of Androgen Receptors by Rho GTPase Signaling in Prostate Cancer.
Mol Endocrinol. 2008 Mar;**22**(3):597-608. Epub 2007 Dec 13.

6. Literaturverzeichnis

Mashberg A, Samit A.

Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers.
CA Cancer J Clin. 1995;**45**:328-351.

McCawley LJ, O'Brien P, Hudson LG.

Overexpression of the epidermal growth factor receptor contributes to enhanced ligand-mediated motility in keratinocyte cell lines.
Endocrinology. 1997;**138**:121-127.

Mincione G, Di Marcantonio MC, Artese L, Vianale G, Piccirelli A, Piccirilli M, Perrotti V, Rubini C, Piattelli A, Muraro R.

Loss of expression of TGF-beta1, TbetaRI, and TbetaRII correlates with differentiation in human oral squamous cell carcinomas.
Int J Oncol. 2008;**32**:323-331.

Mishima K, Inoue K, Hayashi Y.

Overexpression of extracellular-signal regulated kinases on oral squamous cell carcinoma.
Oral Oncol. 2002;**38**:468-474.

Miyazaki H, Patel V, Wang H, Ensley JF, Gutkind JS, Yeudall WA.

Growth factor-sensitive molecular targets identified in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma using microarray analysis.
Oral Oncol. 2006;**42**:240-256.

Moores SL, Selfors LM, Fredericks J, Breit T, Fujikawa K, Alt FW, Brugge JS, Swat W.

Vav family proteins couple to diverse cell surface receptors.
Mol Cell Biol. 2000;**20**:6364-6373.

Movilla N, Bustelo XR.

Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins.
Mol Cell Biol. 1999;**19**:7870-7885.

Murdoch D, Sager J.

Will targeted therapy hold its promise? An evidence-based review.
Curr Opin Oncol. 2008;**20**:104-111.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.

Global cancer statistics, 2002.
CA Cancer J Clin. 2005;**55**:74-108.

Patel V, Rosenfeldt HM, Lyons R, Servitja JM, Bustelo XR, Siroff M, Gutkind JS.

Persistent activation of Rac1 in squamous carcinomas of the head and neck: evidence for an EGFR/Vav2 signaling axis involved in cell invasion.
Carcinogenesis. 2007;**28**:1145-1152.

6. Literaturverzeichnis

- Patel V, Leethanakul C, Gutkind JS.
New approaches to the understanding of the molecular basis of oral cancer.
Crit Rev Oral Biol Med. 2001;**12**:55-63.
- Pearce AC, Senis YA, Billadeau DD, Turner M, Watson SP, Vigorito E.
Vav1 and vav3 have critical but redundant roles in mediating platelet activation by collagen.
J Biol Chem. 2004;**279**:53955-53962.
- Perez-Ordoñez B, Beauchemin M, Jordan RC.
Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck.
J Clin Pathol. 2006;**59**:445-53.
- Pfaffl MW.
A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
Nucleic Acids Res. 2001;**29**:2002-2007
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L.
Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.
Nucleic Acids Res. 2002;**30**:e36.
- Prime SS, Davies M, Pring M, Paterson IC.
The role of TGF-beta in epithelial malignancy and its relevance to the pathogenesis of oral cancer (part II).
Crit Rev Oral Biol Med. 2004;**15**:337-347.
- Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A.
Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR.
Biochem Biophys Res Commun. 2004;**313**:856-862.
- Rao J, Li N.
Microfilament actin remodeling as a potential target for cancer drug development.
Curr Cancer Drug Targets. 2004;**4**:345-354.
- Reuter CW, Morgan MA, Eckardt A.
Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck.
Br J Cancer. 2007;**96**:408-416.
- Ridley AJ.
Rho family proteins: coordinating cell responses.
Trends Cell Biol. 2001;**11**:471-477.

6. Literaturverzeichnis

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR.

Cell migration: integrating signals from front to back.
Science. 2003;**302**:1704-1709.

Sachdev P, Zeng L, Wang LH.

Distinct role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho family GTPases in Vav3-induced cell transformation, cell motility, and morphological changes.
J Biol Chem. 2002;**277**:17638-17648.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T.

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; 1989.

Sauzeau V, Sevilla MA, Rivas-Elena JV, de Alava E, Montero MJ, López-Novoa JM, Bustelo XR.

Vav3 proto-oncogene deficiency leads to sympathetic hyperactivity and cardiovascular dysfunction.
Nat Med. 2006;**12**:841-845.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA.

Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR.
J Biochem Biophys Methods. 2000;**46**:69-81.

Shook D, Keller R.

Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development.
Mech Dev. 2003;**120**:1351-83.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T.

The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.
BMC Mol Biol. 2006;**7**:3.

Sok JC, Kuriakose MA, Mahajan VB, Pearlman AN, DeLacure MD, Chen FA.

Tissue-specific gene expression of head and neck squamous cell carcinoma in vivo by complementary DNA microarray analysis.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2003;**129**:760-770.

Sun L, Diamond ME, Ottaviano AJ, Joseph MJ, Ananthanarayan V, Munshi HG.

Transforming Growth Factor- β 1 Promotes Matrix Metalloproteinase-9-Mediated Oral Cancer Invasion through Snail Expression.
Mol Cancer Res. 2008;**6**:10-20.

6. Literaturverzeichnis

Takaoka S, Iwase M, Uchida M, Yoshiba S, Kondo G, Watanabe H, Ohashi M, Nagumo M, Shintani S.

Effect of combining epidermal growth factor receptor inhibitors and cisplatin on proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells.

Int J Oncol. 2007;**30**:1469-1476.

Talamini R, Vaccarella S, Barbone F, Tavani A, La Vecchia C, Herrero R, Muñoz N, Franceschi S.

Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer.

Br J Cancer. 2000;**83**:1238-1242.

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman BB, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E.

Housekeeping genes as internal standards: use and limits.

J Biotechnol. 1999;**75**:291-295.

Thiery JP.

Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.

Nat Rev Cancer. 2002;**2**:442-54.

Traxler P, Allegrini PR, Brandt R, Brueggen J, Cozens R, Fabbro D, Grosios K, Lane HA, McSheehy P, Mestan J, Meyer T, Tang C, Wartmann M, Wood J, Caravatti G.

AEE788: a dual family epidermal growth factor receptor/ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity.

Cancer Res. 2004;**64**:4931-4941.

Trenkle T, Welsh J, Jung B, Mathieu-Daude F, McClelland M.

Non-stoichiometric reduced complexity probes for cDNA arrays.

Nucleic Acids Res. 1998;**26**:3883-3891.

Trenkle T, Welsh J, McClelland M.

Differential display probes for cDNA arrays.

Biotechniques. 1999;**27**:554-560, 562, 564.

Trenkle T, McClelland M, Adlkofer K, Welsh J.

Major transcript variants of VAV3, a new member of the VAV family of guanine nucleotide exchange factors.

Gene. 2000;**245**:139-149.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.

Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.

Genome Biology. 2002;**3**:research0034.1-0034.11.

6. Literaturverzeichnis

- Wilkins-Port CE, Higgins PJ.
Regulation of extracellular matrix remodeling following transforming growth factor-beta1/epidermal growth factor-stimulated epithelial-mesenchymal transition in human premalignant keratinocytes.
Cells Tissues Organs. 2007;**185**:116-122
- Wittekind Ch, Meyer HJ, Bootz F: TNM Klassifikation maligner Tumoren, 6. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2002
- Yamasaki K, Toriu N, Hanakawa Y, Shirakata Y, Sayama K, Takayanagi A, Ohtsubo M, Gamou S, Shimizu N, Fujii M, Miyazono K, Hashimoto K.
Keratinocyte growth inhibition by high-dose epidermal growth factor is mediated by transforming growth factor beta autoinduction: a negative feedback mechanism for keratinocyte growth.
J Invest Dermatol. 2003;**120**:1030-1037.
- Zakaria S, Gomez TS, Savoy DN, McAdam S, Turner M, Abraham RT, Billadeau DD.
Differential regulation of TCR-mediated gene transcription by Vav family members.
J Exp Med. 2004;**199**:429-434
- Zheng Y.
Dbl family guanine nucleotide exchange factors.
Trends Biochem Sci. 2001;**26**:724-732.
- Zeng L, Sachdev P, Yan L, Chan JL, Trenkle T, McClelland M, Welsh J, Wang LH.
Vav3 mediates receptor protein tyrosine kinase signaling, regulates GTPase activity, modulates cell morphology, and induces cell transformation.
Mol Cell Biol. 2000;**20**:9212-9224.

7. Danksagung

Mein Dank gilt Allen die selbstlos helfen, im Besonderen den immer freundlichen und hilfsbereiten Mitarbeitern im Institut für Pathologie für Rat und Tat bei der praktischen Umsetzung der Studie und für die Möglichkeit der Nutzung der Geräte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Merle, für Ihre umfassende Hilfe und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Auch möchte ich die Gelegenheit nutzen und mich bei Prof. Jürgen Schlegel, Dr. John Welsh und Prof. Michael McClelland sowohl für die Vermittlung des Interesses für die Molekularbiologie als auch für die Lehre des Faches bedanken.

Sehr gerne möchte ich Prof. Dr. Dr. Peter Sieg für die andauernde Unterstützung und die Schaffung der nötigen Freiräume, welche die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglichten, danken.

8. Anhang

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck unter dem Aktenzeichen 06-205 geprüft, und mit dem Schreiben vom 12.01.2007 genehmigt.

8. Lebenslauf

Name: **Thomas Carl Maria Trenkle**
Geburtsdatum: 30.08.1968
Geburtsort: Mannheim
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch



Schulbildung:

1974-1978 Grundschule in Seckach
1978- 1987 Gymnasium in Buchen

Berufsausbildung:

1987-1994 Studium und Staatsexamen der Humanmedizin an der
Universität Heidelberg
1994-1996 Studium der Zahnmedizin an der Universität Heidelberg
1996 Promotion zum Dr. med. an der Universität Heidelberg
1996-2000 Molekularbiologische Grundlagenforschung zur
Entwicklung von Methoden zur Untersuchung
differentieller Genexpression am Sidney Kimmel Cancer
Center, San Diego, CA, USA
2000-2001 Studium und Staatsexamen der Zahnmedizin an der
Universität Hamburg
2002-2006 Weiterbildung zum Facharzt für Mund-Kiefer- und
Gesichtschirurgie in der Klinik für Kiefer- und
Gesichtschirurgie Universitätsklinikum Schleswig-
Holstein, Campus Lübeck
2006 Facharzt für Mund -Kiefer- und Gesichtschirurgie
2007 Ernennung zum Oberarzt der Klinik für Kiefer- und
Gesichtschirurgie UKSH, Campus Lübeck
2006-2008 Weiterbildung für die Zusatzbezeichnung Plastische
Operationen in der Klinik für Kiefer- und
Gesichtschirurgie UKSH, Campus Lübeck
2006-2008 Studien zur Analyse der Genexpression in humanen
oralen Plattenepithelkarzinomen

Lübeck, im Oktober 2008