

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**EXPRESSION DER mRNA
VON LYSYL OXIDASE UND LYSYL OXIDASE LIKE 2
IN PLATTENEPITHELKARZINOMEN
DES OBEREN AERODIGESTIVTRAKTES**

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

Tobias Wege-Rost, geb. Rost
aus Hanau

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 23.07.2009.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. R. Mandić

Korreferentin: Prof. Dr. U.-M. Bauer

für Mirjam, Fynn, Anton und Elisa

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	HNSCC.....	1
1.2	Familie der Lysyl Oxidasen.....	5
1.3	Lysyl Oxidase.....	7
1.3.1	Molekulargenetik.....	7
1.3.2	Synthese der LO.....	8
1.3.3	Lokalisation und Vorkommen der LO.....	9
1.3.4	Regulation der LO – Substrate für LO.....	10
1.3.5	Biologische Funktionen der LO.....	10
1.3.5.1	Aufbau und Stabilisierung der ECM.....	11
1.3.5.2	Weitere Funktionen.....	12
1.4	Lysyl Oxidase Like 2.....	13
1.4.1	Molekulargenetik.....	13
1.4.2	Synthese der LOL2.....	13
1.4.3	Lokalisation und Vorkommen der LOL2.....	15
1.4.4	Regulation der LOL2 – Substrate für LOL2.....	15
1.4.5	Biologische Funktionen der LOL2.....	16
1.5	Fragestellung und Zielsetzung.....	18
2	MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1	Geräte.....	19
2.2	Untersuchungsmaterial.....	20
2.2.1	Zelllinien.....	20
2.2.2	Gewebeproben.....	21
2.3	Gewinnung des Untersuchungsmaterials.....	25
2.3.1	Zellkultur.....	25
2.3.1.1	Kulturmedien.....	25
2.3.1.2	Primär-Anzucht.....	26
2.3.1.3	Lagerung der Zelllinien – Zell-Passage.....	27
2.3.1.4	Auftauen der Zelllinien und Anlegen von Subkulturen.....	28

2.3.2	Gewebeproben	28
2.4	RNA	29
2.4.1	Isolation von Gesamt-RNA	29
2.4.1.1	RNA-Isolation aus Zelllinien	29
2.4.1.2	RNA-Isolation aus Gewebeproben	29
2.4.2	Photometrische Quantifizierung der RNA	30
2.4.3	Qualitätskontrolle der RNA	30
2.5	Reverse Transkription	31
2.6	PCR-Protokoll	31
2.7	Elektrophorese	32
2.8	Eluation und Aufreinigung von PCR-Banden	33
2.9	Sequenzierung	34
2.10	Gelanalyse	34
2.11	Auswertung der Daten	35
3	ERGEBNISSE.....	37
3.1	DNA-Sequenzierung	37
3.2	RNA-Qualität	39
3.3	PCR- und Elektrophorese-Ergebnisse	40
3.4	mRNA-Level von LOX und LOXL2 in Karzinom-Proben.....	43
3.4.1	mRNA-Level von LOX in Karzinom-Zelllinien	43
3.4.2	mRNA-Level von LOX in Karzinom-Gewebeproben	43
3.4.3	mRNA-Level von LOXL2 in Karzinom-Zelllinien.....	43
3.4.4	mRNA-Level von LOXL2 in Karzinom-Gewebeproben.....	44
3.5	Statistische Auswertung	46
3.5.1	Skalenniveau.....	46
3.5.2	Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest	46
3.5.3	Deskriptive Statistik	47
3.5.3.1	Deskriptiver Vergleich der mRNA-Level	48
3.5.3.2	Effektgrößen	50

3.5.4	Inferenzstatistik – Levene-Test und T-Test.....	50
3.5.5	Power-Analysen: Teststärke und Fallzahlbestimmung	51
3.5.6	Korrelationen für HNSCC-Proben	52
3.6	Interpretation der Ergebnisse.....	54
4	DISKUSSION	55
4.1	LOX-mRNA-Level in HNSCC	55
4.1.1	Erniedrigte LOX-Expression in Zelllinien	55
4.1.2	Erniedrigte LOX-Expression in Gewebeproben.....	55
4.1.3	Erniedrigte LOX-Expression in <i>ras</i> -transformierten Zellen	56
4.2	LOX: Tumorsuppressor-Funktion	57
4.2.1	Mechanismus der Tumorsuppressor-Aktivität von LO	58
4.3	LOX: Anti-Tumor-Funktion.....	60
4.4	Mechanismus der Verminderung der LOX-mRNA-Level.....	61
4.4.1	Mechanismus der Transformation im Zusammenhang mit reduzierter LOX	62
4.5	LOXL2-mRNA-Level in HNSCC.....	63
4.5.1	Erniedrigte LOXL2-Expression in Zelllinien.....	63
4.5.2	LOXL2-Expression in Gewebeproben	63
4.6	LOXL2: Tumorsuppressor- bzw. Anti-Tumor-Funktion	64
4.7	Erhöhte Expression von LOX und LOXL2.....	65
4.8	Erklärung konträrer Ergebnisse	66
4.9	Vergleich der Lysyl Oxidasen	67
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	70
6	LITERATURVERZEICHNIS	72
7	ANHANG	90
7.1	Abkürzungsverzeichnis	90
7.2	Abbildungsverzeichnis	92
7.3	Tabellenverzeichnis	92

8	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	93
9	DANKSAGUNG	94
10	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	95

1 Einleitung

1.1 HNSCC

Über 90% aller malignen Neoplasien der oberen Luft- und Speisewege sind Plattenepithelkarzinome (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) [122]. HNSCC ist der sechsthäufigste bösartige Tumor weltweit [7] und hat einen Anteil von annähernd 2,8% an allen malignen Neoplasien in den USA [123]. Bösartige Neubildungen von Lippe, Mundhöhle, Pharynx, Larynx und Trachea hatten in Deutschland 2007 einen Anteil von 0,76% an allen Todesursachen, was einer Gesamtzahl von 6287 Todesfällen entsprach [133]. HNSCC ist eine von der Mukosa des oberen Aerodigestivtraktes ausgehende maligne epitheliale Erkrankung, die durch lokale Tumor-Aggressivität, frühes Rezidivieren, häufiges Auftreten von sekundären Primärtumoren [96] und frühe vor allem lymphatische Streuung [90, 150] charakterisiert ist. Metastasen entwickeln sich bei 15-25% der Patienten [38], wobei Fernmetastasen nur selten ohne vorangegangene lymphatische Metastasierung gesehen werden [128]. Weniger als 30% der Patienten mit HNSCC-Tumoren erleben drei oder mehr Jahre krankheitsfrei und viele leiden unter erheblichem Krankheitsgefühl, das mit Sprach- und Schluckschwierigkeiten, Beeinträchtigung von Geschmack, Geruch und Gehör und kosmetischer Entstellung assoziiert ist [27, 137]. Die Hauptrisikofaktoren für HNSCC sind Tabakrauchen und Alkoholkonsum [131]. Weiterhin stellen das Kauen von Betel- oder Areka-Nüssen, das Rauchen von Bidis und das Schnupfen von Schnupftabak wichtige Risikofaktoren besonders im Indischen Subkontinent dar. Außerdem spielen die Epstein-Barr-Virus-Infektion, Humane Papillomviren und Ernährungsfaktoren bei der Ätiologie eines Teils der HNSCC-Tumoren eine Rolle [56, 113, 122]. Kontinuierliche Exposition gegenüber Umwelt-Karzinogenen, der Verlust der Zell-Zyklus-Kontrolle und eine gestörte Reparatur-Kapazität der Desoxyribonukleinsäure (DNA) sind Vorbedingungen bei der Karzinogenese von HNSCC [31].

Die Diagnostik von HNSCC beinhaltet neben Anamnese und körperlicher Untersuchung die Anwendung bildgebender Verfahren wie Sonographie, Computertomographie, Magnet-Resonanztomographie und Positronen-Emissionstomographie, außerdem kommen invasive Maßnahmen wie Fein-Nadel-Aspiration aus vergrößerten Lymphknoten und Panendoskopie mit

Entnahme von Probe-Biopsien zur Anwendung [122]. Die Behandlung von Patienten mit HNSCC im Frühstadium erfolgt entweder chirurgisch oder durch Strahlentherapie [2], bei lokoregional fortgeschrittener Erkrankung kommen zusätzlich zytotoxische Chemotherapeutika, insbesondere Platinanaloga, zur Anwendung [2, 145]. Da eine große Zahl der Patienten mit HNSCC-Tumoren zum Zeitpunkt der Diagnose bereits regionale Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen entwickelt hat, werden diese Patienten nach der initialen Tumorresektion durch zusätzliche Resektion von tumorbezogenen Lymphknoten per Neck-Dissektion und postoperative Chemo-Radiotherapie behandelt. Ist eine Operation aufgrund des zu weit fortgeschrittenen Tumorwachstums nicht mehr möglich, erfolgt die primäre Chemo-Radiotherapie [90]. Die mögliche Überlebensrate von 75% - 80% bei Entdeckung der Erkrankung in den frühen Stadien I und II reduziert sich bei Diagnosestellung von HNSCC in den fortgeschrittenen Krankheitsstadien III und IV, wie es überwiegend der Fall ist, auf eine 35%ige Überlebenschance nach fünf Jahren. Trotz beträchtlicher Fortschritte in der chirurgischen und medikamentösen Therapie von HNSCC haben sich das gesamte Outcome der Erkrankung und das Überleben der betroffenen Patienten in den letzten 25 Jahren nicht wesentlich verbessert [27, 56, 61].

In verschiedenen zytogenetischen und molekularbiologischen Studien konnten mit unterschiedlichen Methoden genetische Veränderungen in HNSCC mit sich vom Normalen unterscheidender Gen-Expression und veränderte biologische Stoffwechselwege gezeigt werden [15, 84, 96, 154]. Einige dieser Veränderungen und unterschiedlich exprimierten Gene sind wahrscheinlich für die Genese von HNSCC mitverantwortlich [45, 96, 150, 151] und könnten so therapeutische Angriffspunkte bieten. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie z.B. *p53* und *p16* bei der Entwicklung von HNSCC-Tumoren involviert sind [96, 102], wobei auch Loss Of Heterozygosity (LOH) verschiedener chromosomaler Regionen, u.a. 5q und 8p [9], eine Rolle spielt [15]. Dabei scheint eher die Akkumulation und nicht zwangsweise die Reihenfolge der genetischen Ereignisse die Tumorprogression festzulegen. Darauf basierend wurde ein Progressions-Model für HNSCC-Tumoren vorgeschlagen, in dem davon ausgegangen wird, dass der entsprechende Status von Genen, die mit dem Stoffwechsel und der Entgiftung von chemischen Karzinogenen assoziierte Enzyme kodieren wie Cytochrom P 450 1A1 (CYP1A1), N-Acetyltransferase 2 (NAT2) und

Glutathion-S-Transferase 1 (GSTM1), das relative Risiko für HNSCC erhöhen könnten [13, 96] (Abbildung 1).

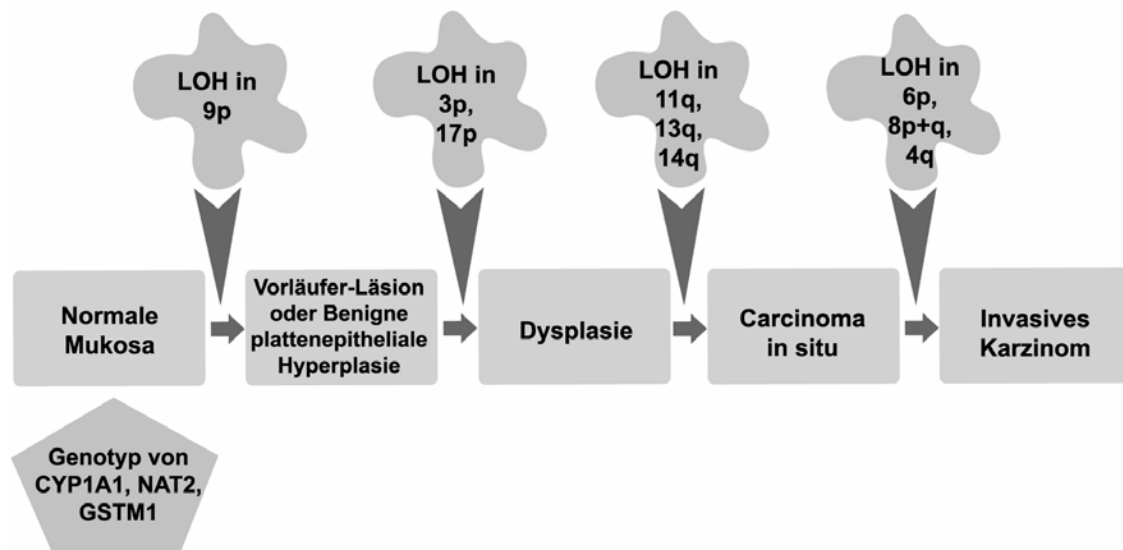


Abbildung 1. Gegenwärtiges Progressionsmodell für HNSCC. Genetische Veränderungen in Assoziation mit der histopathologischen Progression von HNSCC sind dargestellt. Dabei bestimmt die Anhäufung und nicht notwendigerweise die Reihenfolge der genetischen Ereignisse die Tumorphysion. Durch diese genetischen Alterationen sind möglicherweise Tumorsuppressorgene betroffen wie p16 auf Chromosom 9p21 und p53 auf Chromosom 17p, sowie Proto-Onkogene wie Cyclin D1 auf Chromosom 11q13. Der Status von Genen, die mit dem Stoffwechsel und der Entgiftung von chemischen Karzinogenen assoziierte Enzyme kodieren, könnte das relative Risiko erhöhen, HNSCC zu entwickeln. CYP1A1 = Cytochrom P 450 1A1, NAT2 = N-Acetyltransferase 2, GSTM1 = Glutathion-S-Transferase 1 [13, 96].

Die unterschiedlich exprimierten Gene in HNSCC sind in Regulation des Zellzyklus, Zellproliferation und epidermale Differenzierung, Zelladhäsion, Angiogenese, Apoptose, Signaltransduktion und Onkogenese involviert [15, 84]. Außerdem zeigen Gene, welche Transkriptionsregulatoren, DNA-Bindungsproteine, zytoskelettale Proteine, integrale Membranproteine, Zell-Oberflächenproteine, Proteine der Extrazellulären Matrix (ECM), Proteine mit Redox-Aktivität und inflammatorische Mediatoren kodierten, eine veränderte Expression bei HNSCC-Tumoren [15].

Diese genetischen Veränderungen und differentielle Expression von Genen bzw. ganzer Gen-Muster oder -Profile inklusive Transkriptionsfaktoren bzw. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren [15, 84, 154] könnten eine molekulare Charakterisierung von normalen, präkanzerösen und bösartigen HNSCC-Zellen [15] und die Abgrenzung unterschiedlicher histologischer Subtypen voneinander [28] ermöglichen. Außerdem

könnten sie Malignitätsmarker [84] sowie ein zusätzliches Instrument zur Klassifikation [15], Diagnostik [44], Früherkennung [56, 57], Vorhersage von Rezidiven [43] und Metastasen [119], Verlaufsbeurteilung einer Therapie [137] sowie Prognose von HNSCC darstellen.

1.2 Familie der Lysyl Oxidasen

Die Gene Lysyl Oxidase (LOX) [49, 51] und Lysyl Oxidase Like 2 (LOXL2) [63, 65] sind Mitglieder der Familie der Lysyl Oxidasen [94], die zur heterogenen Familie der Aminoxidasen gehören. Diese oxidieren primäre Aminosubstrate zu reaktiven Aldehyden [23]. Neben LOX und LOXL2 existieren weiterhin LOXL [75], LOXL3 [89], auch als Lysyl Oxidase Related Gen (LOR)-2 [1] bezeichnet, und LOXL4 [4, 94], bei der Maus als LOXC bezeichnet [1, 58]. Diese Gene kodieren die jeweiligen Proteine der Familie der Lysyl Oxidasen: Lysyl Oxidase (LO) selbst und die vier weiteren Lysyl Oxidase Like Proteine (LOLs): LOL, LOL2, LOL3 und LOL4 (Abbildungen 2 und 3).

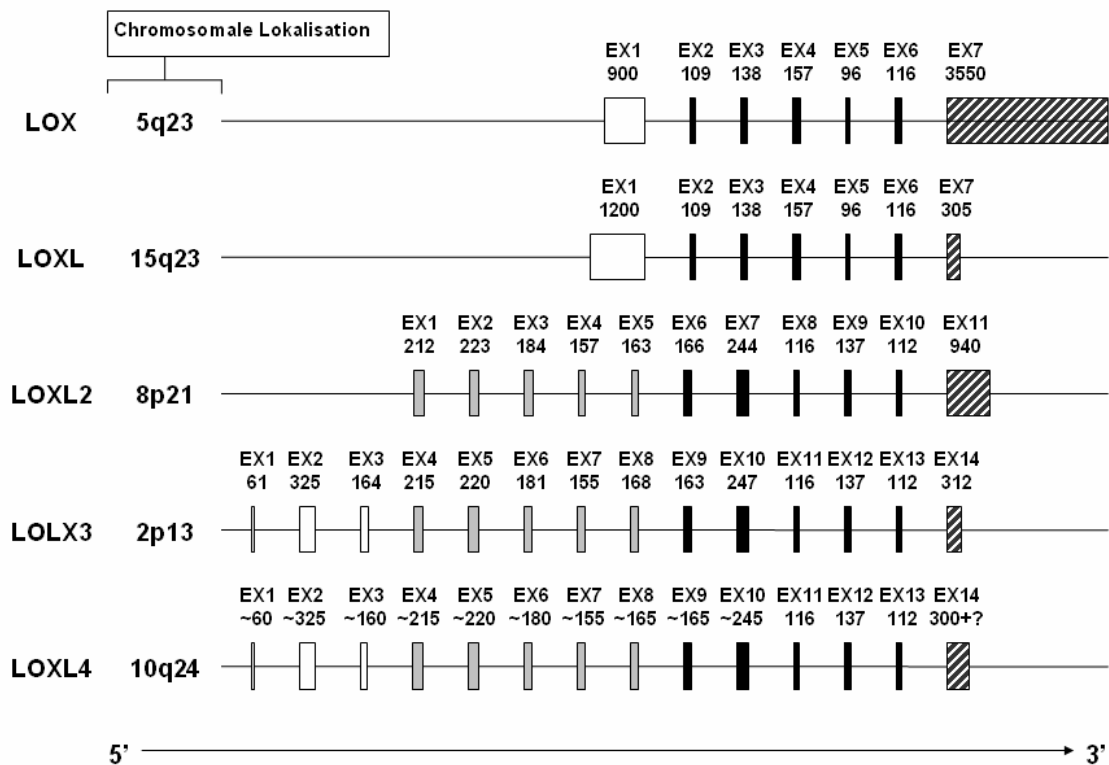


Abbildung 2. Chromosomale Lokalisation und Struktur der Gene der LOX-Familie. Die Exons (EX) sind als Kästchen dargestellt und ihre Größen in Basenpaaren angegeben. Die Exons, die 3'-Nicht-translatierte Regionen (UTR) enthalten bzw. an die sich 3'-UTR anschließen, sind gestreift dargestellt. Die Exons, welche die konservierten Sequenzen der Gene kodieren, sind schwarz dargestellt. Homologe Exons der Gene LOXL2-LOXL4 sind grau dargestellt [4, 23, 65, 75, 89, 94].

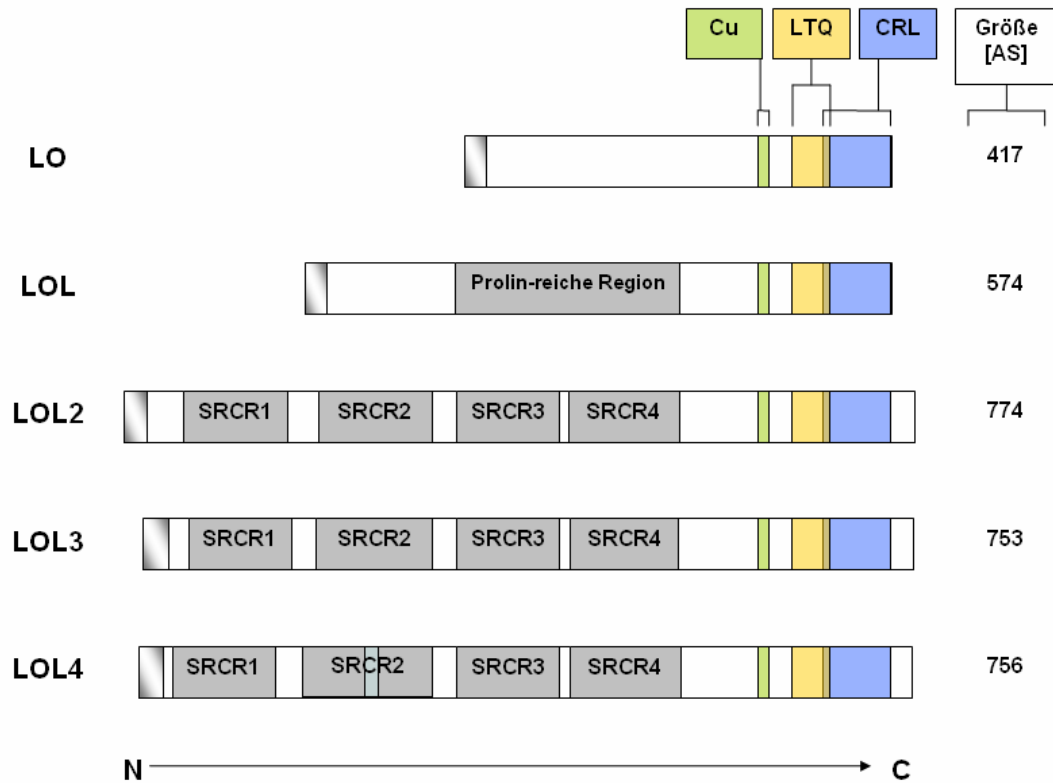


Abbildung 3. Schematischer Aufbau der Proteine der LO-Familie. Die konservierten Domänen in der C-terminalen Region sind farbig markiert. Cu = Kupfer, CRL = Zytokin Rezeptor-ähnliche, LTQ = Lysyl Tyrosyl Quinon, SRCR = Scavenger-Rezeptor Zystein-reiche, AS = Aminosäuren. Da die Proteine LOL2-LOL4 jeweils 4 SRCR-Domänen enthalten, scheinen sie eine Subgruppe innerhalb der LOL-Familie zu bilden. Die Regionen der vorhergesagten Signalsequenzen in der N-terminalen Region sind gestreift dargestellt [4, 23, 65, 75, 89, 94].

1.3 Lysyl Oxidase

LO (EC 1.4.3.13), der am längsten bekannte Vertreter der Familie der Lysyl Oxidasen [23, 94], ist eine Kupfer-abhängige Aminoxidase, die erstmals im Zusammenhang mit der Kollagen- und Elastinsynthese zum Aufbau der ECM erwähnt wurde [108].

1.3.1 Molekulargenetik

Molekulare Klonierung und komplett abgeleitete Aminosäure-Sequenzen der LO wurden für Maus [19], Ratte [141], Huhn [153] und Mensch [49, 51, 91] berichtet. Humane LOX befindet sich auf Chromosom 5q23.3-31.2 [49], ist ungefähr 14 kb bis 15 kb groß und beinhaltet 7 Exons [12, 51, 130]. Bei Mensch, Maus und Ratte wurde von mehreren *messenger* Ribonukleinsäuren (mRNAs) der LOX unterschiedlicher Größe berichtet [19, 49, 141]. Diese Größen-Heterogenität der LOX-mRNA beruht auf dem unterschiedlichen Gebrauch der multiplen Poly-Adenylations-Stellen in der 3,8 kb großen 3'-Nicht-translatierten Region (UTR) innerhalb von Exon 7 [12, 19, 23, 141], und auch am 5'-Ende der LOX-Transkripte scheint eine Heterogenität zu bestehen, da multiple Stellen der Transkriptionsinitiation in den Promotor-Domänen bei Mensch, Ratte und Maus beobachtet werden konnten [19, 24, 51, 116]. Diese unterschiedlichen Transkriptionsinitiationsstellen werden zumindest beim Menschen in einer gewebespezifischen Art und Weise genutzt, woraus sich unter anderem unterschiedlich hohe mRNA-Level ergeben können [21, 24]. Die bedeutendste humane Transkriptionsinitiationsstelle liegt bei dem Adenosin, aus dem sich eine 5'-UTR von 273 Nukleotiden ergibt [51]. Die zwei Haupt-LOX-mRNA-Spezies von 3,8 kb und 4,8 kb wurden in allen Geweben entdeckt, die LOX exprimieren [23]. In der 5'-flankierenden Region der LOX konnten zahlreiche Konsensus-Sequenzen für die Bindung verschiedener Transkriptions- und Regulationsfaktoren identifiziert werden [21, 116, 130]. Das grundlegende Promotor-Element der humanen LOX ist zwischen Positionen -279 und -796 der 5'-flankierenden Region lokalisiert [24]. Auch weiter downstream des funktionellen LOX-Promotors befinden sich gerade im ersten Exon und über das erste Intron der LOX verteilt zusätzliche potentielle Cis-agierende Konsensus-Elemente für verschiedene Transkriptions- und Regulationsfaktoren [24, 51].

1.3.2 Synthese der LO

LO wird als ein 46-48 kDa Pre-Pro-Enzym synthetisiert [49, 139, 141, 153] dessen 21 N-terminalen Aminosäurereste mit der Consensus-Sequenz für Signalpeptide von sezernierten Proteinen übereinstimmen [130]. Die vorhergesagte Abspaltungsstelle der Signalsequenz liegt zwischen den Aminosäureresten *Cys21* und *Ala22* [49]. Weiterhin wurden bis zu drei N-Glykosylierungsstellen upstream des angenommenen Beginns des maturen Enzyms identifiziert [141]. Nach Abspaltung des Signalpeptids und N-Glykosylierung resultiert ein 50 kDa Proenzym, das in den extrazellulären Raum sezerniert wird [139]. Die mature 32 kDa Spezies entsteht durch die extrazelluläre proteolytische Spaltung zwischen den Resten *Gly168* und *Asp169*, wodurch die N-terminale Region abgespalten wird. Die entsprechende Spaltungsstelle war für die Prokollagen-C-Proteinase (PCP) spezifisch [22]. Die Rolle der Pre-Pro-Region von LO besteht möglicherweise in der Hemmung einer vorzeitigen intrazellulären Enzym-Aktivität [23, 130]. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass dieses 18 kDa Propeptid eine Rolle bei der Reversion von *ras*-transformierten Zellen und somit der Hemmung *ras*-abhängiger Transformation spielen könnte [101, 155].

Humane LO wurde erstmals aus Plazenta-Gewebe als ein homogenes Enzym isoliert und teilweise charakterisiert [81]. Es konnten vier verschiedene Spezies von katalytisch aktiver LO nachgewiesen werden, die ein Molekulargewicht von 30-32 kDa hatten und sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung, hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität und immunologisch sehr ähnlich waren [68, 81]. Aufgrund der großen Übereinstimmung zwischen den verschiedenen LO-Spezies wurde als Basis für deren Entstehung die Proteolyse eines gemeinsamen Vorläufermoleküls [68] bzw. dessen posttranslationale Modifikation angenommen [81]. Die unterschiedlichen Enzymvarianten könnten möglicherweise den Mechanismus für die multiple Substratspezifität von LO zur Verfügung stellen, indem sie als ein „Multi-Untereinheits-Komplex“ agieren könnten, der aus vielen ähnlichen aber genetisch verschiedenen Varianten zusammengesetzt ist [53].

Da LO proteingebundenes Kupfer benötigt, wird sie als ein Mitglied der Familie der Kupfer-Aminoxidasen angesehen [147]. Im C-terminalen Ende von LO befinden sich hoch konservierte Aminosäuren, die wichtige strukturelle und funktionelle Domänen bei vielen Spezies (Mensch, Maus, Ratte, Huhn, Fisch und Drosophila) definieren [23].

Diese C-terminale Region scheint alles zu sein, was für die katalytische Funktion von LO notwendig ist [94] und beinhaltet neben möglichen *Metall-Bindungs-Domänen* die *Kupfer-Bindungsdomäne* für den fest gebundenen Kupfer(II)-Cofaktor pro Mol des gereinigten, aktiven 32 kDa-Enzyms [37, 78], und die *Tyrosin- und Lysin-Reste*, aus denen durch autokatalytische Hydroxylierung und Oxidation unter Mitwirkung von Kupfer [10] ein *Lysyl-Tyrosyl-Quinon (LTQ)* als Carbonyl-Cofaktor gebildet wird [147]. In der konservierten C-terminalen Region von LOX befindet sich weiterhin die *Zytokin Rezeptor-ähnliche (CRL-) Domäne*, die Sequenzübereinstimmung mit der N-terminalen extrazellulären Domäne der Wachstumsfaktor- und Zytokin-Rezeptor-Superfamilie mit Zystein- und Tryptophan-Resten an konservierten Positionen zeigt. Die mutmaßliche katalytische Domäne von LO befindet sich innerhalb dieses Moduls bzw. wird von ihm überlappt (Abbildung 3). Dieses CRL-Modul erfüllt eine Adhäsions-Rolle in vielen Proteinen der Wachstums-Faktor- und Zytokin-Rezeptor-Superfamilie. Schließlich enthält die C-terminale Domäne von LOX zwölf konservierte *Zystein-Reste*, von denen sich zwei in der Pre-Pro-Peptid-Region befinden und zehn Teil der katalytisch aktiven prozessierten Form von LO sind [23].

1.3.3 Lokalisation und Vorkommen der LO

In der ECM kommt die aktive LO als ein 32 kDa Protein vor, das mit Kupfer und dem Carbonyl-Cofaktor assoziiert und an elastische Fasern und Kollagen-Fibrillen gebunden ist [69]. Über lange Zeit wurde LO als rein extrazelluläres Protein betrachtet, bis prozessierte LO auch im Zytoplasma verschiedener Zellen nachgewiesen werden konnte [77, 146]. Sogar die Präsenz enzymatisch aktiver LO im Zellkern fibrinogenetischer Zellen von Ratte, Maus und Affe konnte gezeigt werden [40, 85], und die Translokation der vollständig prozessierten 32 kDa LO aus dem extrazellulären Raum in den Kern wurde nachgewiesen [97]. Die nukleäre Lokalisation könnte durch eine Sequenz in der Propeptid-Region der Ratten-LO erklärt werden, die dem nukleären Lokalisations-Signal des *N-myc*-Proteins ähnelt [85, 89].

Die LOX-mRNA wird von einer großen Vielzahl von Zellen epithelialer und stromaler Herkunft mit großer Variation ihres jeweiligen Levels synthetisiert und sezerniert, so dass das LO-Protein und seine Enzym-Aktivität in vielen verschiedenen Geweben detektiert werden konnten. Der Steady-State-Level von LOX ist besonders in fibrokompetenten Zellen hoch [116], LOX-mRNA wird aber auch in Zellen exprimiert,

die normalerweise kein Kollagen synthetisieren [21]. LOX ist vor allem in Binde-, Reproduktions-, fetalem Gewebe und Blutgefäßen exprimiert [67, 69, 75, 109]. Veränderungen bei der Synthese und der Aktivität von LO wurden mit der Pathogenese verschiedener erworbener und angeborener Bindegewebs-Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [24, 40, 88, 135].

1.3.4 Regulation der LO – Substrate für LO

Expression und Aktivität von LO werden durch eine Reihe komplexer physiologischer und pathologischer Mechanismen auf transkriptionaler [24, 116], posttranskriptionaler und posttranslationaler Ebene reguliert [23, 144]. Die Expression dieses Enzyms wird u.a. durch Trans-agierende Elemente und weitere Regulationsfaktoren wie gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren [51], Hormone [23, 112], die Wachstumsfaktoren Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) [16, 130], Platelet Derived Growth Factor (PDGF) [129], basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF) [33, 86], FGF-2, Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) [140] und weitere Zytokine und Signalmoleküle moduliert [6, 18, 21, 23, 34, 117, 130]. Das Onkogen *ras* bewirkt über regulatorische Elemente innerhalb des LOX-Promotors die Transkriptionsreduktion von LOX [24]. Schließlich wurde LO in HNSCC und anderen Tumorentitäten durch Hypoxie induziert [29, 30, 83, 111].

Klassischerweise oxidiert LO Kollagen- und Elastinsubstrate [69]. Zusätzlich kann LO auch andere Lysin-reiche Proteine wie Histon-H1 und Histon-H2 [42, 71], bFGF [86], TGF- β 1 [5], aliphatische Mono- und Diamine [72], synthetische Elastin-ähnliche Polypeptide [70] und auch eine Reihe anderer Lysin-reicher synthetischer Peptide [99] oxidieren. Dabei bevorzugt LOX hoch kationische Substrate mit basischem isoelektrischen Punkt [71, 72]. So könnten auch andere erreichbare Proteine wie membrangebundene Rezeptoren, weitere intrazelluläre Moleküle oder andere Matrixkomponenten als Substrate dienen [74].

1.3.5 Biologische Funktionen der LO

LO ist eine Kupfer-abhängige Aminoxidase, die primäre Aminsubstrate zu reaktiven Aldehyden oxidiert [94], was mit der Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid und der Freisetzung von Ammoniak einhergeht [147]. Dazu katalysiert LO die Oxidative Desaminierung der ϵ -Aminogruppe von Peptidyl-Lysin zu

Peptidyl- α -Aminoadipic- δ -Semialdehyd [69]. Bei dieser katalytischen Reaktion kommt den Aminosäuren, die dem durch LO oxidativ desaminierten Peptidyl-Lysin benachbart sind, eine entscheidende Bedeutung zu. Die Kinetik und Effektivität der LO-Oxidation war auf Unterschiede in der Länge der Substrat-Seitenketten und auf die Anwesenheit von *Asp*- oder *Glu*-Resten sensibel, wenn diese direkt N- oder C-terminal zum Lysin waren, was eine hydrogene Bindung zwischen den Substratresten und der Enzymoberfläche widerspiegelt. Die LO-Aktivität wird durch eine kationische Netto-Ladung seines Substrats begünstigt und die Effektivität der Oxidation durch die Zunahme der Substrat-Peptid-Länge erhöht [23, 72]. Für die Substrat-Interaktion ist neben der katalytischen Region der LO weiterhin möglicherweise eine kurze Aminosäuresequenz upstream der katalytischen Region erforderlich [42]. Die LO-Enzymaktivität wird durch β -Amino-Proprio-Nitril (β -APN) spezifisch gehemmt [23].

1.3.5.1 Aufbau und Stabilisierung der ECM

LO katalysiert klassischerweise als extrazelluläres, Matrix-eingebettetes Enzym die posttranslationale Oxidative Desaminierung der ϵ -Aminogruppe von Lysyl- und Hydroxylysyl-Resten von Tropokollagen und Lysyl-Resten von Tropoelastin zu reaktiven Aldehyd-Resten: Peptidyl- α -Aminoadipic- δ -Semialdehyden oder Peptidyl- δ -Hydroxy- α -Aminoadipic- δ -Semialdehyden [67, 69]. Die resultierenden Peptidyl-Aldehyde, Allylsyl- und Hydroxyallylsyl-Intermediate, können dann spontan mit benachbarten Peptidyl-Aldehyden oder mit nicht reagierten ϵ -Aminogruppen kondensieren, wodurch inter- und intramolekulare kovalente Quervernetzungen der verschiedenen fibrillären Kollagentypen bzw. Desmosin- und Isodesmosin-Querverbindungen in Elastin gebildet werden [65, 67, 130, 134]. So werden die löslichen Monomere von Kollagen und Elastin zu quervernetzten, unlöslichen Fasern konvertiert [21], und eine widerstandsfähige, gegenüber Proteolyse stabilisierte ECM wird aufgebaut [69, 108, 144]. Diese posttranslationale Modifikation der ECM-Moleküle geschieht in der Nähe der Zellmembran [60, 67] und scheint eine sehr wichtige Rolle für die Triggerung noch unbekannter Signal-Transduktions-Stoffwechselwege zu spielen [39].

1.3.5.2 Weitere Funktionen

Die intrazelluläre und sogar intranukleäre Lokalisation und enzymatische Aktivität von LO [26, 40, 85, 146], das Wissen, dass auch einige andere vorwiegend basische Proteine durch dieses Enzym katalysiert werden können [71, 72], und das Vorhandensein der partiellen Zytokin-Bindungsstelle, die die katalytische Region überlappt, führten zu der Annahme, dass LO neben der klassischen möglicherweise noch weitere Funktionen haben und auch in Interaktionen mit anderen Proteinen involviert sein könnte, die möglicherweise sogar teilweise unabhängig von der katalytischen Aktivität von LO sind [23]. So wurden für LO weiterhin Funktionen beschrieben bei der Regulation von Entwicklungsprozessen [14, 55], Kontrolle des Zellwachstums [26], Zelldifferenzierung [76], Ausbildung des Zell-Phänotyps [40, 42], Zelladhäsion und Alterung [126, 135], Chemotaxis [87] und Tumorsuppression [20, 24, 39, 48, 50, 60, 73, 74, 79, 91, 98, 114, 120, 126, 127, 136]. Außerdem wurde eine „Anti-Tumor-Funktion“ von LO [106, 107, 126, 142], aber auch eine mögliche Rolle bei der Befähigung zur Tumorzell-Invasivität [29, 76, 111, 132] beschrieben. Eine Vielzahl dieser zusätzlichen Funktionen nimmt LO möglicherweise über seine zentrale Rolle als Transkriptionsregulator wahr [23, 42]. So kann LO z.B. die Transkriptionsaktivität des *COL3A1*-Promotors von Kollagen Typ-III verstärken, was möglicherweise durch Erhöhung der Ku-Bindung an seine Zielsequenz des *COL3A1*-Promotors geschieht [40], und auch der Elastin-Promotor wird durch LO reguliert [100].

1.4 Lysyl Oxidase Like 2

LOL2, eine der neueren Mitglieder der Familie der Lysyl Oxidasen, weist bedeutende Sequenzübereinstimmung ihrer katalytischen Domäne mit LO auf und ist ebenfalls sowohl extra- als auch intrazellulär lokalisiert [65]. Die *complementary* DNA (cDNA) humaner LOXL2 stimmt mit der LOX-verwandten WS9-14-mRNA [65, 121] weitestgehend überein, so dass die beiden Gene wahrscheinlich identisch sind [89]. Auf LOXL2 wurde sich auch als LOR-1 bezogen [1, 76], WS9-14 wurde auch LOR genannt [64].

1.4.1 Molekulargenetik

Mapping, molekulare Klonierung, abgeleitete Aminosäuresequenz und Gewebe-Expressions-Muster von LOXL2 wurden für Maus [64] und Mensch [63, 65, 121] berichtet. Humane LOXL2 ist auf Chromosom 8p21.2-p21.3 lokalisiert [63] und beinhaltet 11 Exons. Die fünf konsekutiven Exons 6-10 zeigen 84%ige Übereinstimmung in Sequenz und Größe mit den korrespondierenden Exons 2-6 von LOX, während sich die übrigen Exons von LOXL2 und LOX deutlich voneinander unterscheiden. So zeigt die LOXL2-cDNA insgesamt 45%ige Übereinstimmung mit der LOX-cDNA [65]. Neben einer in vielen humanen Geweben vorkommenden LOXL2-mRNA von ca. 3,6 kb konnte eine zusätzliche, seltener vorhandene LOXL2-mRNA von 4,9 kb detektiert werden. Wie für LOX wurden auch für LOXL2 mehrere Transkriptionsinitiations- und Transkriptionsterminationsstellen identifiziert [65, 121]. Innerhalb der 5'-flankierenden Promotorregion von LOXL2 wurde über eine Spanne von ca. 900 bp eine große Zahl von potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren detektiert. Darüber hinaus befinden sich auch im ersten Exon und ersten Intron potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren [65].

1.4.2 Synthese der LOL2

WS9-14 kodiert für ein Protein von 774 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von annähernd 87 kDa [121]. Während für LOL2 kein Hinweis auf eine hydrophobe Signalsequenz gefunden wurde, was eine intrazelluläre Lokalisation für LOL2 nahe legte [65], wurde auf die charakteristischen Eigenschaften einer Signalpeptidsequenz der 22 N-terminalen Aminosäuren von WS9-14 hingewiesen, woraus eine extrazelluläre Lokalisation von LOL2 abgeleitet wurde [121]. Die vorhergesagte Spaltungsstelle für diese Signal-Sequenz befindet sich zwischen *Ala25*

und *Gln26* [23]. Die Abspaltung der Signalsequenz würde ein Protein von 749 Aminosäuren hervorbringen, das drei potentielle N-Glykosylierungs-Stellen und 34 Zystein-Reste aufweist [121]. Im Gegensatz zu LO wies die LOL2-Sequenz keine Stellen auf, die mit der Konsensus-Aminosäure-Sequenz für die Spaltung durch PCP übereinstimmten. So wird LOXL2 möglicherweise auf andere Art prozessiert als LOX. Zumindest in Epithelzellen wurde nur eine einzige 86 kDa Form von LOL2 beobachtet, wobei grundsätzlich nicht auszuschließen war, dass andere Zelltypen oder Gewebe-Extrakte mehrere Formen von LOL2 produzierten [23].

Die C-terminalen Enden der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von LOL2 und LO zeigen ausgeprägte Sequenzhomologie [65]: Die Aminosäuresequenz von 546 bis 751 von WS9-14 zeigt eine 48%ige Übereinstimmung mit dem C-Terminus der LO, der den Exons 2-6 entsprach [121]. Die N-terminalen Regionen beider Enzyme unterscheiden sich hingegen deutlich voneinander [23, 94]. Die fünf konsekutiven Exons 6-10 von LOXL2 kodieren die in den LOL-Proteinen konservierten Regionen. So sind innerhalb des C-terminalen Endes von LOL2 folgende Regionen vorhanden: Die *Kupfer-Bindungsdomäne*, die *Tyrosin-* und *Lysin-Reste* des *LTQ-Cofaktors*, die *CRL-Domäne* und zehn *Zystein-Reste* [65, 121]. Aufgrund dieser konservierten Regionen liegt es nahe, dass auch für LOL2 Kupfer und LTQ als Cofaktoren dienen [23, 65, 121].

Über diese konservierten Regionen hinaus ist in LOL2 mit dem *Glycyl-Histidyl-Lysyl* (*GHK*) eine weitere Region vorhanden, die eine Kupfer-Affinitäts-Stelle im Zusammenhang mit Kollagen darstellt [121]. Außerdem enthält LOL2 drei bzw. vier Repeats der Gruppe-A-*Scavenger-Rezeptor Zystein-reichen (SRCR-) Domäne*, deren Zystein-Reste für die Bildung der Tertiär-Struktur von Bedeutung sind. SRCR-Domänen scheinen in die Bindung an andere Zelloberflächen oder extrazelluläre Moleküle involviert zu sein [23, 65, 115, 121]. Während die unprozessierte LOL2 bis zu vier SRCR-Domänen aufweist [65, 121], könnten der möglicherweise prozessierten kürzeren Form diese Domänen fehlen, so dass sie nur noch die katalytischen und CRL-Domänen enthalten könnte. So könnte im Rahmen der Prozessierung durch Abspalten bestimmter funktioneller Domänen die Proteinfunktion verändert werden [23]. Die Anwesenheit von SRCR-Domänen in LOL2 eröffnet allerdings auch die Möglichkeit, dass dieses Polypeptid seine Effekte ohne eine proteolytische Prozessierung entfalten könnte [89, 94].

1.4.3 Lokalisation und Vorkommen der LOL2

Es gibt sowohl Anhaltspunkte für eine intra- als auch eine extrazelluläre Lokalisation von LOL2. Für eine intrazelluläre Lokalisation sprach vor allem das mögliche Fehlen einer hydrophoben Signalsequenz [65], die allerdings für WS9-14 angegeben wurde [121]. Weiterhin deuteten die Präsenz der SRCR-Domänen und die Hochregulation der LOXL2-mRNA durch TGF- β 1 auf eine extrazelluläre Lokalisation von LOL2 hin [65, 121]. Schließlich konnte LOL2 sowohl extra- als auch intrazellulär im Bereich der Plasmamembran nachgewiesen werden [36, 65].

LOXL2-mRNA kommt im Zusammenhang mit Basalmembran-synthetisierenden Zellen und in Co-Lokalisation mit Kollagen Typ IV vor [23]. Die 3,6 kb mRNA der LOXL2 konnte in vielen Organen nachgewiesen werden, während die zusätzliche, weniger häufige 4,9 kb mRNA nur in Herz, Leber und Pankreas entdeckt wurde. Die höchsten Steady-State-mRNA-Level der LOXL2 wurden in reproduktiven Geweben wie Prostata, Uterus und Plazenta gefunden, wo die Synzytiotrophoblasten für die Synthese von LOXL2 verantwortlich waren. Auch im Skelettmuskel war eine deutliche LOXL2-Expression vorhanden [65, 109]. Geringere LOXL2-Expression fand sich in Gehirn, Thymus [65] und Geweben, die reichlich LOX exprimierten wie Herz, Lunge und Niere [23]. In Leukozyten und den fetalen Membranen konnte LOXL2 nicht entdeckt werden [65, 109, 121].

LOXL2 steht möglicherweise in Zusammenhang mit altersassoziierten Pathologien, die Quervernetzung der ECM und Zelladhäsion miteinbeziehen, da sie in alternden Fibroblasten hochreguliert ist und in Tumorzelllinien reichlich exprimiert wird, die an Kulturplatten kleben, aber nicht in solchen, die in Suspension wachsen [121].

1.4.4 Regulation der LOL2 – Substrate für LOL2

Es ist anzunehmen, dass auch die Regulation der LOXL2 durch komplexe Mechanismen auf den verschiedenen Regulationsebenen geschieht. Das Vorhandensein Cis-agierender Sequenzen der LOXL2-Promotorregion und weiterer regulativer Sequenzen innerhalb des ersten Exons und Introns [65] deutet darauf hin, dass auf transkriptionaler Ebene eine Regulation über entsprechende Trans-agierende Elemente bzw. weitere Regulationsfaktoren erfolgt [35], wie z.B. TGF- β 1. Weiterhin enthält die 3'-UTR der WS9-14-cDNA verschiedene Sequenzelemente, die bei der Regulation der

mRNA-Stabilität eine Rolle spielen [121]. Auch auf posttranskriptionaler und möglicherweise auch posttranslatiionaler Ebene ist eine Regulation der LOXL2-Expression wahrscheinlich, auch wenn über konkrete Regulationsmechanismen nicht viel bekannt ist, und die LOL2-Sequenz keine Stellen für die Spaltung durch PCP aufwies, was eine mögliche von LOX verschiedene Prozessierung andeutete [23].

Das Vorkommen der LOXL2-mRNA in Co-Lokalisation mit Kollagen Typ IV und Elastin deutet darauf hin, dass diese Proteine als mögliche Substrate für LOL2 dienen [23]. Weiterhin führte LOXL2-Expression zur Ablagerung von Kollagen Typ I und III, möglicherweise durch parakrine Mechanismen [1]. Außerdem interagiert und kooperiert LOXL2 mit dem Transkriptionsfaktor *Snail* bei der Herunterregulation der E-Cadherin-Expression, die zusammen mit anderen Mechanismen bei der Kontrolle der sog. Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT), einem zentralen Phänomen bei der Tumorzell-Invasivität, von Bedeutung ist [104].

1.4.5 Biologische Funktionen der LOL2

Einerseits wurde aufgrund der bedeutenden Sequenzhomologie der konservierten C-terminalen Domänen von LOL2 mit denen von LO angenommen, dass LOL2 einige der Funktionen erfüllt, die vorher LO zugeschrieben wurden [65]. Andererseits eröffnete die gegenüber LO unterschiedliche Zell- und Gewebs-Verteilung von LOL2 die Möglichkeit, dass LOL2 andere Funktionen als LO erfüllen könnte. Mögliche unterschiedliche Substratspezifitäten beider Enzyme könnten auf strukturellen Unterschieden zwischen den beiden Proteinen in Regionen der unmittelbaren Umgebung der katalytischen Stelle beruhen, die in Substrat-Interaktionen involviert sein könnten [23]. Die Funktion von LOL2 als aktive Aminoxidase beinhaltet möglicherweise die posttranslationale Modifikation von ECM-Komponenten oder anderer Zellmembran-assoziiierter Proteine [121], wie z.B. die Quervernetzung von Kollagen Typ IV. Gerade aufgrund ihrer SRCR-Domänen in der N-terminalen Region und auch wegen der CRL-Domäne in der C-terminalen Region könnte LOL2 auch an Protein-Interaktionen teilnehmen, die nicht von der katalytischen Funktion abhängen [23]. So könnte LOL2 bei der Zelladhäsion eine Rolle spielen, außerdem ist sie möglicherweise bei Metastasierung und Alterung involviert [121]. Schließlich gibt es Hinweise darauf, dass LOXL2 wahrscheinlich auch Funktionen bei der zellulären Differenzierung, dem Zellwachstum und der Entwicklung wahrnimmt [36]. Die

offensichtliche Rolle von LOXL2 bei der Tumorigenität wurde dadurch aufgezeigt, dass der Verlust der LOXL2 in verschiedenen Spezies maligner Neoplasien vorkam [23, 36], so dass auch für LOXL2 eine mögliche Rolle als Tumorsuppressorgen in Erwägung gezogen wurde [1, 36]. Weiterhin wurde eine mögliche „Anti-Tumor-Funktion“ für LOXL2 angedeutet [1] und schließlich auch auf einen Zusammenhang zwischen erhöhter LOXL2-Expression und Förderung der Tumorprogression bzw. Verstärkung der Tumorinvasivität hingewiesen [1, 35, 76, 104, 105].

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Durch die vorliegende Arbeit sollte mit Hilfe der Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht werden, wie sich die mRNA-Expressionslevel von LOX und LOXL2 in HNSCC verhalten, und ob die Ergebnisse bezüglich Zellen und Geweben anderer Herkunft bestätigt werden können. Außerdem wurden Korrelationen mit Krankheits- und Patientenparametern berechnet, um die LOX- und LOXL2-mRNA-Expression auf ihre Tauglichkeit als Tumormarker für HNSCC zu testen.

Dieser Arbeit liegen folgende Fragestellungen zugrunde:

1. In welchem Ausmaß ist die Expression der LOX- und LOXL2-mRNA in HNSCC-Zelllinien und -Gewebeproben im Vergleich zu Proben aus benignen Epithelzellen und Schleimhautbiopsaten verändert?
2. Kann die in verschiedenen Studien für verschiedene maligne Tumorentitäten nachgewiesene Verminderung der LOX- bzw. LOXL2-Expression auch in HNSCC mittels RT-PCR nachgewiesen werden?
3. Spielen LOX und LOXL2 in HNSCC gleichgerichtete oder entgegengesetzte Rollen?
4. Explorative Analysen: Gibt es Korrelationen zwischen dem LOX- bzw. LOXL2-mRNA-Expressionsgrad in HNSCC-Zelllinien und -Gewebeproben und klinisch-pathologischen Daten der Patienten?

Die Ergebnisse könnten einen Beitrag dazu leisten, die Rolle von LOX und LOXL2 bei der Tumorigenese und der Tumorsuppression von HNSCC besser zu verstehen. Möglicherweise stellen LOX und LOXL2 in HNSCC Kandidatengene dar und könnten so von diagnostischer, prognostischer oder therapeutischer Relevanz sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits in Auszügen an kleinerer Stichprobenzahl veröffentlicht [120].

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

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

2.2 Untersuchungsmaterial

Die Untersuchung der mRNA-Level von LOX und LOXL2 erfolgte an insgesamt 18 Tumorzelllinien und 30 HNSCC-Gewebeproben. (Tabellen 1 und 2). Als Referenzmaterial dienten insgesamt 17 benigne Keratinozyten-Zellkulturen und 8 benigne Gewebeproben (Tabellen 3 und 4). Aufgrund teilweise eingeschränkter Elektrophoresequalität und Unmöglichkeit der Gelauswertung konnten für einige Proben keine mRNA-Level erhoben werden, so dass sie für die Ergebnisauswertung nicht berücksichtigt werden konnten.

2.2.1 Zelllinien

Die zur Untersuchung der mRNA-Level von LOX und LOXL2 verwendeten Zelllinien stammen von der Universität Michigan, USA (UM-SCC: University of Michigan, Squamous Cell Carcinoma, Dr. T.E. Carey), von der Universität Turku, Finnland (UT-SCC: University of Turku, Squamous Cell Carcinoma, Dr. R. Grénman), und aus dem Molekularbiologischen Labor des Medizinischen Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Philipps-Universität Marburg, wo aus entsprechenden Gewebeproben die karzinomatöse Zelllinie UMB-SCC-745 und die Kontroll-Keratinozyten angezüchtet und etabliert wurden.

Für die folgenden 15 Zelllinien wurden die mRNA-Level von LOX erhoben: UM-SCC-1, -9, -14A, -14B, -14C, -19, -22B und -27, UT-SCC-8, -10, -16A, -19A, -24A und -24B und UMB-SCC-745. Diese Zelllinien stammten von der Mundhöhle (n = 8), dem Oropharynx (n = 1), dem Larynx (n = 2), der Lymphknotenmetastase eines Mundhöhlen-Karzinoms (n = 1), der Hals-Metastase eines Mundhöhlen-Karzinoms (n = 1) und der Halsmetastase eines Hypopharynx-Karzinoms (n = 1). Für die Zelllinie UM-SCC-27 war keine Gewebeentnahmestelle angegeben, die Tumorlokalisation des entsprechenden Primarius ist die Mundhöhle (Tabelle 1).

Für die folgenden 14 Zelllinien wurden die mRNA-Level von LOXL2 erhoben: UM-SCC-1, -3, -4, -14A, -14B, -14C, -22B und -27, UT-SCC-8, -16A, -19A, -19B und -24A und UMB-SCC-745. Diese Zelllinien stammten von der Mundhöhle (n = 6), dem Oropharynx (n = 2), dem Larynx (n = 3), der Lymphknotenmetastase eines Karzinoms der Nase (n = 1) und der Halsmetastase eines Hypopharynx-Karzinoms (n = 1). Für die

Zelllinie UM-SCC-27 ist keine Gewebeentnahmestelle angegeben, die Tumorlokalisierung des entsprechenden Primarius ist die Mundhöhle (Tabelle 1).

Als Kontrollen dienten für LOX folgende 13 aus normaler tonsillärer Mukosa angezüchtete Keratinozyten-Kulturen: Kera-59, -60, -65, -66, -74, -75, -76, -78, -79, -83, -89, -91 und -98, sowie für LOXL2 die 17 Keratinozyten-Kulturen Kera-59, -60, -62, -63, -65, -66, -74, -75, -76, -77, -78, -79, -80, -83, -89, -91 und -98 (Tabelle 3).

2.2.2 Gewebeproben

Die auf die mRNA-Level von LOX und LOXL2 untersuchten Gewebebiopsate wurden zwischen April 1998 und Oktober 2000 während diagnostischer oder therapeutischer Operationen von Patienten des Medizinischen Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Philipps-Universität Marburg gewonnen. Die Resektion, Lagerung und Untersuchung der Proben geschah mit dem Einverständnis der Patienten, die nach einer entsprechenden Patientenaufklärung gemäß den Kriterien der Ethik-Kommission der Philipps-Universität Marburg Forschung an dem erworbenen Material erlaubten. Die Diagnosestellung Plattenepithelkarzinom (SCC) einschließlich des histologischen Gradings erfolgte im Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg (Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. R. Moll). Das Staging basierte auf der TNM-Klassifikation der International Union Against Cancer (UICC) [143].

LOX-mRNA-Level wurden für 28 karzinomatöse Gewebeproben (465, 477, 496, 500, 503, 524, 542, 564, 576, 609, 612, 619, 620, 621, 657, 662, 680, 693, 700, 745, 747, 772, 778, 799, 852, 854, 858, 865) erhoben (1-28), die von der Mundhöhle (n = 1), dem Oropharynx (n = 9), dem Hypopharynx (n = 7), dem Larynx (n = 9), dem Oro-Hypopharynx (n = 1) und dem Hypo-Oropharynx (n = 1) stammten (Tabelle 2).

LOXL2-mRNA-Level wurden für 27 karzinomatöse Gewebeproben (465, 466, 477, 496, 500, 503, 524, 542, 564, 576, 609, 612, 619, 620, 621, 657, 662, 700, 745, 747, 772, 783, 799, 852, 854, 858, 865) erhoben (1-27), die von dem Oropharynx (n = 8), dem Hypopharynx (n = 7), dem Larynx (n = 9), dem Oro-Hypopharynx (n = 1), dem Hypo-Oropharynx (n = 1) und der Lymphknotenmetastase eines Patienten mit CUP-Syndrom (n = 1) stammten (Tabelle 2).

Als Kontrollen wurden 8 gutartige Gewebeproben (R 494, R 618, R 716, R 753, R 779, R 786, R 805, R 821) untersucht, die jeweils vom Oropharynx oder vom Larynx stammten (Tabelle 4).

Tabelle 1. Klinische Daten der untersuchten HNSCC-Zelllinien.

n	HNSCC-Zelllinien	Stadium		Grad	Geschlecht	Alter	Lokalisation des Primärtumors	Entnahmestelle
		TNM	UICC					
1	UMB-SCC-745	T4N2bM0	IV	G2	m	48	Oropharynx	Oropharynx
2	UM-SCC-1	T2N0M0	II	G2	m	73	Mundhöhle	Mundhöhle
3	UM-SCC-3	T1N0M0	I	G2	w	73	Nase	Metastase
4	UM-SCC-4	T3N2M0	IV	G3	w	47	Oropharynx	Oropharynx
5	UM-SCC-9	T2N0M0	II	G1-G2	w	71	Mundhöhle	Metastase
6	UM-SCC-14A	T1N0M0	I	G2-G3	w	58	Mundhöhle	Mundhöhle
7	UM-SCC-14B	T1N0M0	I	G3	w	59	Mundhöhle	Mundhöhle
8	UM-SCC-14C	T2N1M0	III	G3	w		Mundhöhle	Mundhöhle
9	UM-SCC-19	T2N1M0	III	G1-G2	m	67	Mundhöhle	Mundhöhle
10	UM-SCC-22B	T2N1M0	III	G1-G2	w	58	Hypopharynx	Metastase
11	UM-SCC-27	T1N0M0	I	G1-G2			Mundhöhle	,
12	UT-SCC-8	T2N0M0	II	G1	m	42	Larynx	Larynx
13	UT-SCC-10	T1N0M0	I	G2	m	62	Mundhöhle	Mundhöhle
14	UT-SCC-16A	T3N0M0	III	G3	w	77	Mundhöhle	Mundhöhle
15	UT-SCC-19A	T4N0M0	IV	G2	m	44	Larynx	Larynx
16	UT-SCC-19B	T4N0M0	IV	G2	m	44	Larynx	Larynx
17	UT-SCC-24A	T2N0M0	II	G2	m	41	Mundhöhle	Mundhöhle
18	UT-SCC-24B	T2N0M0	II	G2	m	41	Mundhöhle	Metastase

m = männlich, w = weiblich, Alter in Jahren.

Tabelle 2. *Klinische Daten der untersuchten HNSCC-Gewebeproben.*

n	HNSCC- Gewebeproben	Stadium		Grad	Geschlecht	Alter	Lokalisation des Primärtumors	Entnahmestelle
		TNM	UICC					
1	465	T4N0M0	IV	G4	m	67	Oropharynx	Oropharynx
2	466	TxN2bM0	IV	,	m	54	CUP	LK-Metastase
3	477	T4N0M0	IV	G2	m	62	Larynx- Oropharynx	Oropharynx
4	496	T3N0M0	III	G2	m	54	Oropharynx	Oropharynx
5	500	T4N2cM0	IV	G3	m	43	Oropharynx	Oropharynx
6	503	T4N2aM0	IV	G2	w	62	Oropharynx	Oropharynx
7	524	T3N2cM0	IV	,	m	45	Larynx	Hypopharynx
8	542	T4N2cM0	IV	G2	m	51	Hypopharynx	Hypopharynx
9	564	T1N0M0	I	G2	m	55	Larynx	Larynx
10	576	T4N2bM0	IV	G1	m	58	Oropharynx	Oropharynx
11	609	T4N2cM0	IV	G2	m	64	Larynx- Oropharynx	Larynx
12	612	T4N2bM0	IV	G2	m	60	Hypopharynx	Hypopharynx
13	619	T4N2cM0	IV	G2	m	64	Larynx- Oropharynx	Larynx
14	620	T4N2cM0	IV	G2	w	51	Larynx	Larynx
15	621	T4N2cM0	IV	G3	m	37	Larynx- Oropharynx	Larynx
16	657	T4N2cM0	IV	G2	m	62	Oropharynx	Oropharynx
17	662	T2N1M0	III	G3	m	64	Larynx- Oropharynx	Hypopharynx
18	680	T2N0M0	II	G1	m	64	Mundhöhle	Mundhöhle
19	693	T2N2aM0	IV	G3	m	52	Oropharynx	Oropharynx
20	700	T3N0M0	III	G3	m	59	Hypopharynx	Hypopharynx
21	745	T4N2bM0	IV	G2	m	48	Oropharynx	Oropharynx
22	747	T3N0M0	III	G3	m	51	Hypopharynx	Hypopharynx
23	772	T2N1M0	III	G2	m	71	Larynx	Larynx
24	778	T4N3M0	IV	G2- G3	m	61	Larynx- Hypopharynx	Larynx
25	783	T4N1M0	IV	G2	m	42	Larynx	Larynx
26	799	T4N3Mx	IV	G3	m	66	Hypopharynx	Hypopharynx
27	852	T4NxMx	IV	G2	w	64	Hypopharynx- Ösophagus	Hypo- Oropharynx
28	854	T2N2cM0	IV	G2	w	79	Larynx	Larynx
29	858	T3N0M0	III	G2	m	59	Larynx	Larynx
30	865	T4	IV	G2	m	61	Oro- Hypopharynx	Oro- Hypopharynx

m = männlich, w = weiblich, Alter in Jahren.

Tabelle 3. *Klinische Daten der Referenz-Zellen.*

n	Referenz-Zellen	Geschlecht	Alter	Entnahmestelle
1	K 59	m	25	Oropharynx
2	K 60	w	27	Oropharynx
3	K 62	w	20	Oropharynx
4	K 63	w	15	Oropharynx
5	K 65	w	4	Oropharynx
6	K 66	m	59	Oropharynx
7	K 74	w	7	Oropharynx
8	K 75	w	20	Oropharynx
9	K 76	m	33	Oropharynx
10	K 77	w	32	Oropharynx
11	K 78	m	18	Oropharynx
12	K 79	w	5	Oropharynx
13	K 80	m	28	Oropharynx
14	K 83	m	43	Oropharynx
15	K 89	w	10	Oropharynx
16	K 91	m	38	Oropharynx
17	K 98	w	39	Oropharynx

m = männlich, w = weiblich, Alter in Jahren.

Tabelle 4. *Klinische Daten der Referenz-Gewebeproben.*

n	Referenz-Gewebeproben	Geschlecht	Alter	Entnahmestelle
1	R 494	m	64	Larynx
2	R 618	m	43	Oropharynx
3	R 716	m	34	Oropharynx
4	R 753	m	52	Oropharynx
5	R 779	m	56	Oropharynx
6	R 786	m	50	Oropharynx
7	R 805	m	4	Larynx
8	R 821	m	61	Larynx

m = männlich, Alter in Jahren.

2.3 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

2.3.1 Zellkultur

2.3.1.1 Kulturmedien

Kulturmedium für Keratinozyten

Das Kulturmedium für Keratinozyten bestand bei einem Gesamtvolumen von 500 ml aus *Keratinocyte Serum Free Medium (KSFM*; Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) mit den folgenden Zusätzen:

- 50 U/ml Penicillin (Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland)
- 1,25 mg/ml Streptomycin (Fatol-Arzneimittel GmbH, Schiffweiler, Deutschland)
- 1 µg/ml Amphotericin-B (Squibb von Heyden GmbH, München, Deutschland)
- 0,002 ng/ml *Mycoplasma Removal Agent* (ICN Biomedicals, Meckenheim, Deutschland)
- 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt (Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
- 5 ng/ml rekombinanter Epidermal Growth Factor (EGF; Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)

Kulturmedium für Karzinomzellen

Das Kulturmedium für Karzinomzellen bestand bei einem Gesamtvolumen von 500 ml aus *Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM*, Bio Whittaker, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Verviers, Belgien) mit den folgenden Zusätzen:

- 10% Fetales Kalbserum (FCS 3154; Biochrom KG, Berlin, Deutschland)
- 50 U/ml Penicillin
- 1,25 mg/ml Streptomycin
- 1 µg/ml Amphotericin-B
- 40 µg/ml Gentamycin (Merck, Darmstadt, Deutschland),
- 2 µM/ml L-Glutamin (Bio Whittaker)
- 0,005 ng/ml *Mycoplasma Removal Agent*

2.3.1.2 Primär-Anzucht

Keratinocyten

Die Schleimhautbiopsate des oberen Aerodigestivtraktes wurden während diagnostischer oder therapeutischer Operationen entnommen und direkt nach der Exzision nativ auf einer Kompresse ins Zellkulturlabor gebracht. Hier erfolgte die weitere Verarbeitung der Biopsate auf einer Laminar Sicherheitswerkbank mit gerichteter steriler Luftstromrichtung (Flow laminar box, Kottermann® 8581, Uetze, Deutschland). Nach Abspülen der Biopsate in 1 x *Phosphate Buffered Saline* (PBS)-Lösung (Gibco BRL) wurden sie in einer Petrischale von 10 cm Durchmesser (Nunc TM Brand Products, Wiesbaden, Deutschland) mechanisch zerkleinert. Die oberflächlichen Schichten der Mukosa und des Bindegewebes wurden mit einem sterilen Skalpell vom Restbiopsat abgetrennt und in kleine Stücke geschnitten. Nach Überführen in ein steriles Röhrchen wurden die Gewebstücke dreimal in 1x PBS-Lösung gewaschen und bei 800 U/min für 5 min zentrifugiert (Medifuge, Heraeus Christ, Hanau, Deutschland). Die so erhaltenen Pellets wurden für 1 h bei 37°C mit 3 ml Dispaselösung (Konzentration: 2,4 U/ml; Bacillus polymyxa, Grade II, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) inkubiert, die jeweils 3,75 µl Penicillin (Konzentration: 10000 U/ml) und Streptomycin (Konzentration: 0,25 g/ml) enthielt. Nach einer Zentrifugation bei 800 U/min wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml 1x PBS-Lösung auf eine Petrischale überführt und gewaschen. Die so erhaltene Epidermis wurde zur Lyse der epidermalen Zellverbindungen mit 3 ml einer 0,02% w/v Trypsin und 0,05% w/v EDTA enthaltenden Lösung (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) resuspendiert und für 20 bis 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der entstandenen Zellsuspension bei 800 U/min wurde das erhaltene Zell-Pellet dreimal mit FCS gewaschen und bei 800 U/min zentrifugiert. Das FCS wurde verworfen und das Zell-Pellet wurde in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf Petrischalen zur Kultur ausgesät und im Begasungsbrutschrank (Gas incubator BB16, Function line, Heraeus Instruments GmbH) bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Die Zellen wurden täglich unter einem inversen Lichtmikroskop (Telaval 31, Zeiss, Deutschland) auf den Grad der Konfluenz sowie mögliche Kontamination hin untersucht. Bei erfolgreichem Wachstum fand alle zwei bis vier Tage ein Mediumwechsel statt.

Karzinomzellen

Die Kultivierung der Karzinomzellen wurde grundsätzlich gleich durchgeführt wie die der Keratinozyten. Zur Lösung der Verbindungen zwischen den Tumorzellen wurde das nach der Dispase-Behandlung erhaltene Zell-Pellet jedoch zunächst in einem Medium aufgenommen, das sich folgendermaßen zusammensetzt:

- 1 ml *DMEM*
- 12,5 mg Kollagenase I (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- 12,5 mg Kollagenase XI (Sigma)
- 50 µl Penicillin (Konzentration: 10000 U/ml)
- 50 µl Streptomycin (Konzentration: 0,25 g/ml)
- 10 µl Amphotericin-B
- 10 µl Gentamycin

Das Suspensionsvolumen wurde mit 1x PBS-Lösung auf 10 ml aufgefüllt.

Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 37°C. Nach Abzentrifugieren der Zellsuspension wurde das so erhaltene Pellet erneut in der Suspensionslösung inkubiert. Dieser Vorgang wurde drei bis fünf Mal wiederholt. Das letztlich erhaltene Zell-Pellet wurden in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und auf einer Zellkulturplatte ausgesät.

2.3.1.3 Lagerung der Zelllinien – Zell-Passage

Nach Erreichen von Konfluenz und Ausbildung einer geschlossenen Monolayerschicht wurde das jeweilige Kulturmedium entfernt. Die Zellen wurden in 1x PBS-Lösung gewaschen und zum Ablösen von der Kulturplatte mit 8 ml einer 0,05%igen Trypsin- und 0,02%igen EDTA-Lösung versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml Kulturmedium für Keratinozyten mit FCS bzw. Kulturmedium für Karzinomzellen zur Beendigung der Trypsinwirkung, wurde die Zellsuspension in einem sterilen Röhrchen bei 800 U/min für 5 min abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen.

Zur Lagerung wurden die am Röhrchenboden sedimentierten Zellen im jeweiligen Kulturmedium, welches 10% (v/v) des zellprotektiven Frostschutzmittels Dimethylsulfoxid (DMSO; Merck, Darmstadt, Deutschland) enthielt, resuspendiert und zunächst bei -80°C, dann bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Zell-Passage wurden die am Röhrchenboden sedimentierten Zellen im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und auf mehrere Petrischalen verteilt. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei der Primär-Anzucht.

2.3.1.4 Auftauen der Zelllinien und Anlegen von Subkulturen

Die in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagerten Zellen wurden zum Anlegen von Subkulturen bei 37°C (Wasserbad oder Handwärme) aufgetaut. Um das Frostschutzmittel DMSO zu entfernen, wurde die Zell-Suspension anschließend in 15 ml Falcon-Tubes (Nunc) gegeben und in 10 ml des entsprechenden Kulturmediums gewaschen. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 800 U/min wurde das Zell-Pellet mit 10 ml des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert und auf eine oder mehrere Kulturschalen gegeben. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei der Primär-Anzucht.

2.3.2 Gewebeproben

Die Gewebebiopsate des oberen Aerodigestivtraktes wurden nach Abtupfen des Gewebes mit Polyvidon-Lösung unter keimarmen Bedingungen während diagnostischer oder therapeutischer Operationen entnommen. Unmittelbar nach der Exzision wurden sie in NaCl-Lösung gegeben und ins Labor gebracht. Dort wurden sie zunächst gewogen, dann in 1,5 ml Tubes gegeben und bei -84°C gelagert.

2.4 RNA

2.4.1 Isolation von Gesamt-RNA

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA aus den Proben wurde das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Der Gehalt an Gesamt-RNA wurde für jede Probe photometrisch bei 260 nm bestimmt. Für die folgende cDNA-Synthese wurde jeweils 1 µg der Gesamt-RNA eingesetzt.

2.4.1.1 RNA-Isolation aus Zelllinien

Sobald sich ein dichter Monolayer auf den Kulturplatten gebildet hatte (100% Konfluenz), wurde das jeweilige Kulturmedium mit Hilfe einer automatischen Pipettierhilfe entfernt und zweimal in 1 x PBS gewaschen. Zur Zellernte wurden die Zellen mit 600 µl einer Lösung aus *RLT Puffer* (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) und β -Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt, Deutschland) im Verhältnis 100:1 von der Kulturplatte abgelöst und durch Lyse der Membranen aufgeschlossen. Die sich ergebende Suspension wurde mit einer Pipettierhilfe so lange immer wieder auf den verbleibenden Zelllayer gegeben und wieder aufgezogen, bis alle Zellen von der Kulturschale abgelöst waren. Die folgende Homogenisation des Lysats wurde mit dem *QIA shredder kit* (Qiagen) und 70%igem Ethanol (Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland), die endgültige RNA-Extraktion mit dem *RNeasy mini kit* (Qiagen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers für die RNA-Extraktion aus tierischen Zellen durchgeführt. Die RNA wurde in RNase und DNase freie Tubes (Biopur Safe Lock, Eppendorf, Hamburg, Deutschland / Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt, die 40 Einheiten *RNase-Inhibitor (1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV))*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) enthielten.

2.4.1.2 RNA-Isolation aus Gewebeproben

Zur Isolation der totalen RNA aus den Gewebeproben wurden unter kontinuierlicher Kühlung in flüssigem Stickstoff aus den tiefgefrorenen Gewebe-Tubes 30 mg – 90 mg der jeweiligen Gewebeprobe entnommen. In einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser wurden die gefrorenen Gewebestücke anschließend mit einem Stößel unter flüssigem Stickstoff zu Gewebepulver zermahlen. So erfolgte die Pulverisierung der gefrorenen Gewebestücke komplett in flüssigem Stickstoff. Bis zu 30 mg des

Gewebepulvers wurde in 1,5 ml Tubes gegeben und mit 600 µl des 100:1-Gemisches aus *RLT Puffer* und β-Mercaptoethanol suspendiert. Die folgende Homogenisation wurde mit dem *QIA shredder kit* (Qiagen) und 70%igem Ethanol (Riedel-de Haen), die endgültige RNA-Extraktion mit dem *RNeasy mini kit* (Qiagen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers für die RNA-Extraktion aus tierischem Gewebe durchgeführt. Die RNA wurde in RNase freie Röhrchen (Eppendorf / Greiner) übertragen, welche 40 Einheiten *RNase-Inhibitor* (Roche) enthielten.

2.4.2 Photometrische Quantifizierung der RNA

Die photometrischen Messungen zur Quantifizierung der RNA aus den Eluaten der jeweiligen Proben wurden mit einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Eine Eichung des Photometers wurde vor jeder Messreihe mit Aqua dest. vorgenommen. Jede RNA-Probe wurde mit destilliertem Wasser im Verhältnis von 1:200 und 1:400 verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dazu wurden Präzisionsküvetten mit 10 mm Seitenlänge (Uvette, 220-1600 nm, Eppendorf) verwendet, welche vor jeder Messung mehrmals mit Aqua dest. gespült und mit Pressluft getrocknet wurden. Die RNA-Konzentration c [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] wurde anschließend nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet: $c = A \times f$. Dabei steht A für Absorption, f ist der Umrechnungsfaktor des Photometers von 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Eine optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) von 1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die RNA-Konzentration der Proben wurde aus dem Mittelwert der Messungen berechnet.

2.4.3 Qualitätskontrolle der RNA

Um die Nativität der gewonnenen RNA zu überprüfen, wurden 10 µg der Gesamt-RNA jeder Probe in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.7) und auf das Auftreten der 28S- und 18S-Banden der ribosomalen RNA (rRNA) hin untersucht. Als RNA-Größenmarker wurden *10 µl RNA ladder* (N0362S, New England BioLabs®Inc., Schwalbach, Taunus, Deutschland) verwendet.

2.5 Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT) wurde das *Ist Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) verwendet. Es wurde ein Reaktionsansatz mit 1 µg totaler RNA, 0,8 µl $\geq 20 \times 10^3$ U/ml *AMV Reverse Transkriptase*, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 40 mM Deoxynukleotid Mix, 2 µl 0,02 A₂₆₀ U/µl Oligo-dT₁₅-primer, 1 µl 40-50 U/µl *RNase-Inhibitor*, 2 µl *10 x Reaction Buffer* und einer variablen Menge sterilen Wassers für ein Gesamtvolumen von 20 µl erstellt. Dieser Reaktionsansatz wurde im Thermal Cycler in folgender Sequenz inkubiert: 10 min bei 25°C, 60 min bei 42°C, 5 min bei 99°C und 5 min bei 4°C. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

2.6 PCR-Protokoll

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde mit dem *Ist Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)*, der *Taq DNA Polymerase* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) und spezifischen Sense- und Antisense-Primern für LOX [50], LOXL2 [65] und β-Aktin (ACTB) [110] im Thermal Cycler durchgeführt.

Die folgenden Primer wurden benutzt: Für die Amplifikation von LOX: sense 5' - GCC GGG AGA AGT TCC TGC TCT C - 3' (Positionen 671-692 der LOX-mRNA) und antisense 5' - CCT CCG CCG CGC ATC TCA GG - 3' (Positionen 954-935 der LOX-mRNA) [50], von LOXL2: sense 5' - CTG GTG CGA CTG AGA GGC G - 3' (Positionen: 1220-1238 der LOXL2-mRNA) [65] und antisense 5' - ACT CGG CCC TCG TAG GGA TT - 3' (Positionen: 1590-1571 der LOXL2-mRNA), und von ACTB: sense 5' - GAT GAT GAT ATC GCC GCG CTC GTC GTC - 3' (Positionen: 77-103 der ACTB-mRNA) und antisense 5' - GTG CCT CAG GGC AGC GGA ACC GCT CA - 3' (Positionen: 854-829 der ACTB-mRNA). Die Primer wurden von ARK Scientific (Darmstadt, Deutschland) bezogen und entsprechend den Anweisungen des Herstellers in Diethyl-Pyrocbonat-Aqua dest. (DEPC-Wasser) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gelöst.

Für die Amplifikation wurden 5 µl des jeweiligen durch die RT erhaltenen cDNA-Probenvolumens mit jeweils 50 pmol des entsprechenden Downstream- und Upstream-Primers (ARK Scientific), 2,5 U Taq DNA Polymerase, 1 µg Gelatine, 10 µl

10 x *Reaction Buffer* und einer variablen Menge DEPC-Wassers zusammengemischt, um ein Reaktionsvolumen von 100 µl zu erhalten. Um ein Verdunsten der Probe während der Inkubationszeit zu verhindern, wurde diese mit einem Tropfen (ca. 25 µl) Mineralöl (Sigma) abgedeckt.

Die DNA wurde bei initial 94°C für 3 min denaturiert und anschließend in 30 Zyklen bei 94°C für 60 s, 58°C für 60 s und 72°C für 90 s amplifiziert. Nach einem abschließenden Extensions-Schritt bei 72°C für 10 min erfolgte die Abkühlung bei 4°C für 5 min. Die Lagerung der Proben erfolgte bei –20°C.

Zum Vortexen der Probenansätze wurde der REAX 2000 Vortexer (Heidolph, Deutschland) benutzt. Die Zentrifugationen wurden in der Labofuge 400 R (Function line, Heraeus Instruments) durchgeführt. Um Selbstamplifikation der Primer auszuschließen, zur Demonstration der Spezifität der Primer und zum Ausschluss von Kontamination der cDNA erfolgten verschiedene Negativkontrollen, indem je eine PCR mit Aqua dest. anstelle der cDNA und eine PCR mit Aqua dest. anstelle der Primer durchgeführt wurde.

2.7 Elektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel, das 0,01% Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH & Co) zur Färbung enthielt, elektrophoretisch aufgetrennt. Um das entsprechende Agarosegel zu erstellen, wurden 2 g Agarose (Serva, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg, Deutschland) in 100 ml 1 x Trisbase-Azetat-EDTA-Lösung (TAE-Lösung) aufgeköcht.

1 x TAE-Lösung (1000 ml):

- 4,84 g Trisbase (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Carl Roth GmbH & Co)
- 1,14 ml Eisessig (Merck)
- 0,74 g Ethylendiamintetraacetat (EDTA Na²⁺, Paesel + Lori GmbH & Co, Frankfurt, Deutschland) und
- Aqua dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml

Nach dem Ausgießen des Agarosegels in die Elektrophoresezelle wurden 10 µl Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. Es schloss sich eine 40 minütige Aushärtungszeit bei Raumtemperatur an. Als Elektrophoresepuffer wurden ca. 500 ml 1 x TAE-Lösung eingesetzt, mit der das Elektrophoresegel abgedeckt wurde.

15 µl jedes PCR-Amplicons wurden mit 3 µl *6 x Puffer* versetzt, so dass jede Geltasche mit einer Gesamtprobenmenge von 18 µl beschickt wurde.

10 ml des *6 x Puffers* enthielten:

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

Als DNA-Marker wurden zur Größenbestimmung der Amplifikationsprodukte 7 µl *100 bp DNA ladder* (323-1S, New England BioLabs Inc.) eingesetzt. Die Elektrophorese lief für 1½ Stunden bei 110 V (BioMax MBP300, Kodak, New Haven, CT, USA) in der Elektrophoresezelle (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

2.8 Eluation und Aufreinigung von PCR-Banden

Zur Eluation und Aufreinigung von PCR-Banden wurde eine Gelelektrophorese mit gepoolten Proben durchgeführt. Dazu wurden je 12 µl der mit den jeweiligen Primerpaaren für LOX, LOXL2 und ACTB gewonnenen PCR-Produkte dreier Karzinomzelllinien, einer Keratinozytenkultur, einer Karzinomgewebeprobe und einer Referenz-Gewebeprobe zu einem Probenvolumen von 72 µl zusammengemischt, das mit 14 µl des *6 x Puffers* versetzt wurde. In die Taschen des 2%igen Agarosegels (wie unter 2.7 beschrieben) wurden von jeder Probe jeweils 45 µl bzw. 41 µl eingefüllt. Die Elektrophorese lief für 80 min bei 110 V.

Anschließend wurden die entstandenen PCR-Banden der drei Proben unter UV-Beleuchtung mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem

GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) gemäß dem Protokoll des Herstellers aus dem Gel herausgelöst und aufgereinigt.

Es folgte eine photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration analog der photometrischen Quantifizierung der RNA wie unter 2.4.2 beschrieben. Für doppelsträngige DNA entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

2.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung der gewonnenen PCR-Produkte erfolgte durch den DNA Sequencing Service von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland). Für die Sequenzierung wurde von jedem PCR-Produkt eine Mindestmenge von 20 ng /100 bp benötigt. Für die mit dem Primern für LOX und LOXL2 gewonnenen PCR-Produkte wurde mit dem *ABI Prism 3700 System* (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) jeweils eine Doppelstrang-Sequenzierung durchgeführt, für das mit den Primern für ACTB hergestellte PCR-Produkt erfolgte aufgrund der Länge des Amplifikats von 778 bp mit dem *LI-COR 4200 System* (LICOR, Nebraska, USA) Einzelstrang-Sequenzierungen.

2.10 Gelanalyse

Über die interkalierende Substanz Ethidiumbromid wurde die DNA auf den Elektrophorese-Gelen unter UV-Licht sichtbar gemacht. Mit dem Dokumentationssystem *Gel Doc 2000* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurden Bilder der Elektropherogramme gemäß dem Protokoll des Herstellers angefertigt. Von jedem Elektropherogramm wurden drei Bilder aufgenommen. Diese wurden anschließend jeweils mit zwei verschiedenen Einstellungen der Bandendetektions-Sensitivität der *Quantity One® Quantitation Software* (Bio-Rad) analysiert. Bei der ersten Einstellung wurde die Sensitivität zur Detektion der Helligkeitsintensität der Banden so gewählt, dass die ganze Bande bzw. das dazugehörigen Peak für LOX bzw. LOXL2 durch die Detektion erfasst wurde. Bei der zweiten Einstellung wurde die Sensitivität so gewählt, dass die Bande für LOX bzw. LOXL2 gerade noch erfasst wurde, und zumindest der Umschlag-Punkt des

dazugehörigen Peaks durch die Detektion erfasst wurde. Durch diese Prozedur wurden jeweils sechs Werte für die Bandenhelligkeit von LOX, LOXL2 und ACTB für jede Probe erhalten, die die Menge der jeweils amplifizierten cDNA widerspiegeln und dem mRNA-Level des entsprechenden Gens entsprechen.

2.11 Auswertung der Daten

Die ermittelten Werte für die mRNA-Level von LOX bzw. LOXL2 wurden zu den jeweiligen Werten der ACTB-mRNA-Level ins Verhältnis gesetzt. Das konstitutiv exprimierte *House-Keeping-Gen* ACTB diente hier als interner Standard, wie auch bereits in früheren Studien [50, 64]. Dieses Vorgehen ermöglichte es, die Transkriptions-Level von LOX und LOXL2 als relative Transkriptionslevel auszudrücken, standardisiert an den Transkriptionsleveln von ACTB. Obwohl man von *House-Keeping-Genen* annimmt, dass sie nur geringe Expressionsschwankungen über die Gewebe hinweg aufweisen, können diese internen Standards in ihrer gewebsabhängigen Expression durchaus variabel sein, wobei ACTB eine relativ geringe Variation zeigte [109]. Aus den so errechneten sechs Werten der standardisierten mRNA-Level für jede Probe von LOX bzw. LOXL2 wurde der Mittelwert berechnet, der als Gesamtwert für das mRNA-Level von LOX bzw. LOXL2 für jede Probe galt und den jeweiligen Grad der mRNA-Expression widerspiegelte. Die Werte für die mRNA-Expression wurden in relativen Expressions-Einheiten (REE) angegeben.

Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde überprüft, ob die Werte für die mRNA-Level von LOX bzw. LOXL2 in den verschiedenen Stichproben normalverteilt sind. Für den Vergleich zwischen HNSCC- und Referenzproben wurde der T-Test für unabhängige Stichproben eingesetzt. Zur Auswahl des entsprechenden T-Tests wurden die zu vergleichenden Gruppendaten nach Levene auf Varianzhomogenität überprüft. Für die Korrelationen wurde der Spearman-Rho Korrelationskoeffizient mit einem zweiseitigen 5%igen Signifikanzniveau berechnet. Zur Ermittlung der standardisierten Mittelwertdifferenzen wurden die Effektgrößen der jeweiligen sich unterscheidenden mRNA-Level von LOX und LOXL2 in HNSCC- und Referenz-Zellen bzw. -Gewebeproben mit dem *Effektstärketool* [59] errechnet. Die Poweranalysen wurden mit dem Programm *GPower* [32] durchgeführt. Alle übrigen statistischen

Operationen wurden mit der *EXCEL* (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) sowie *SPSS* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) Software durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 DNA-Sequenzierung

Nach Sequenzierung der PCR-Produkte für LOX, LOXL2 und ACTB wurde ein Vergleich mit den jeweiligen in der BLAST-Datenbank (BLASTN 2.2.1) [3] veröffentlichten kodierenden Gensequenzen angestellt, der eine nahezu 100%ige Übereinstimmung erbrachte. Ein geringfügiges Mismatching ergab sich durch “sich überlagernde Peaks”, “sehr dichte Peaks” und “Hintergrundrauschen”. Damit war die Spezifität der Primer und der damit erzeugten PCR-Amplifikate bestätigt, so dass tatsächlich die Level der LOX- und LOXL2-mRNA relativ zu dem des House-keeping Gens ACTB untersucht werden konnten. Ein Sequenzierungsbeispiel ist in Abbildung 4 dargestellt.

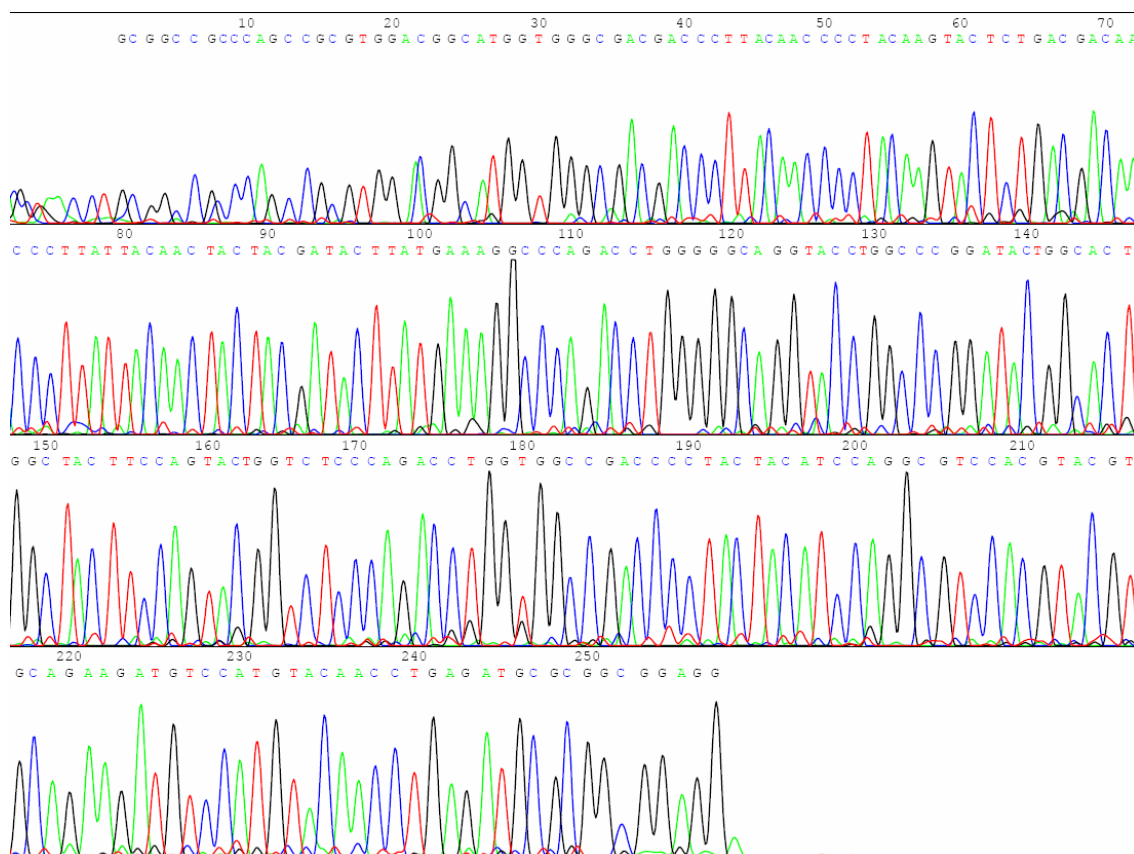


Abbildung 4. Beispielhaftes Sequenzierungsergebnis von MWG-Biotech für den Sense-Read von LOX. Der Datenbankvergleich zeigte 98%ige Übereinstimmung mit der in BLAST veröffentlichten LOX-Sequenz.

Die ermittelte Sequenz für LOX stimmt mit der BLAST-Sequenz, die für die Positionen 671-954 der LOX-mRNA unter der Referenz gi|4505008|ref|NM_002317.1| [49] angegeben ist, zu 98% für die Sense- und zu 99% für die Antisense-Richtung überein. Das Mismatching bezüglich der Sense-LOX-Sequenz beruht auf Hintergrundrauschen, die Cytosin-Adenin-Sequenz in Position 28-29 der durch MWG-Biotech ermittelten Antisense-LOX-Sequenz anstelle der Adenin-Thymidin-Sequenz der Referenz beruht auf Hintergrundrauschen und zwei sehr dichten Peaks für Adenin und Thymidin, so dass das letztere nicht mitgezählt wurde (Abbildung 5).

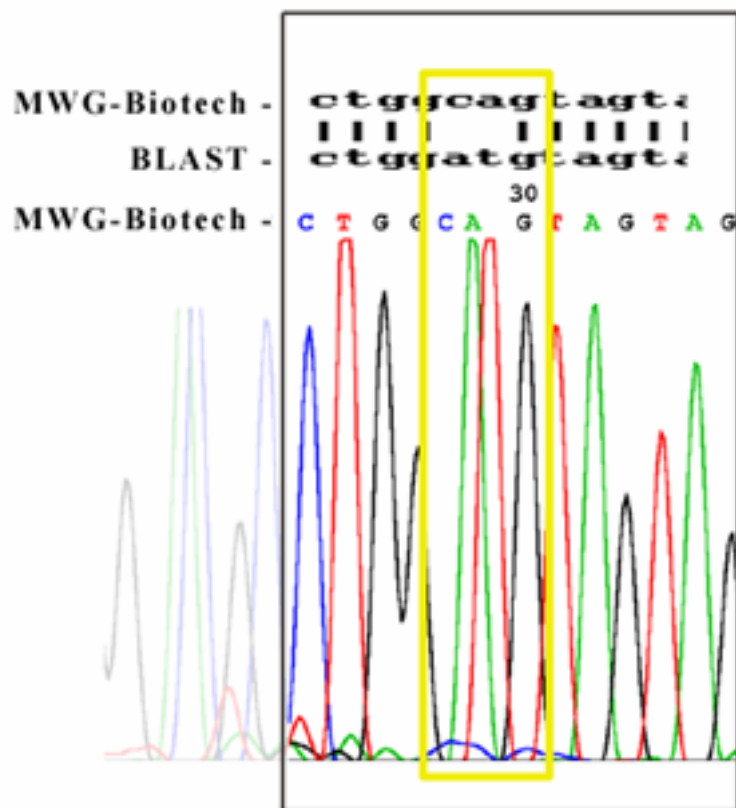


Abbildung 5. Beispielhafter Sequenzvergleich zur Überprüfung der Sequenzierungsergebnisse: LOX-Antisense-Read von MWG-Biotech und BLAST-Referenz-Sequenz von LOX. Die Basenabfolge von Interesse befindet sich im gelben Kasten.

Die ermittelte Sequenz für LOXL2 stimmt mit der BLAST-Sequenz, die für die Positionen 1220-1590 der LOXL2-mRNA unter der Referenz [gi|4505010|ref|NM_002318.1|](#) [63, 121] gegeben ist, zu 99% für beide Ableserichtungen überein. Das Mismatching bezüglich der LOXL2-Sequenz basiert auf sich überlagernden Peaks.

Die ermittelte Sequenz für ACTB stimmt mit der BLAST-Sequenz, die für die Positionen 105-819 der ACTB-mRNA unter der Referenz [gi|5016088|ref|NM_001101.2|](#) [110] gegeben ist, zu 98% für beide Ableserichtungen überein. Für die Sequenz von ACTB basieren ebenfalls alle Mismatchings auf sich überlagernden Peaks bzw. Hintergrundrauschen.

3.2 RNA-Qualität

Zur Kontrolle der RNA-Qualität und Überprüfung der Amplifizierbarkeit der untersuchten Proben, wurde die Ethidiumbromid-markierte RNA bei UV-Licht betrachtet. Die 28S- und 18S-rRNA-Einheiten als Hinweis auf Intaktheit der RNA zeigten sich in Form deutlicher Banden für jede Probe (Abbildung 6).

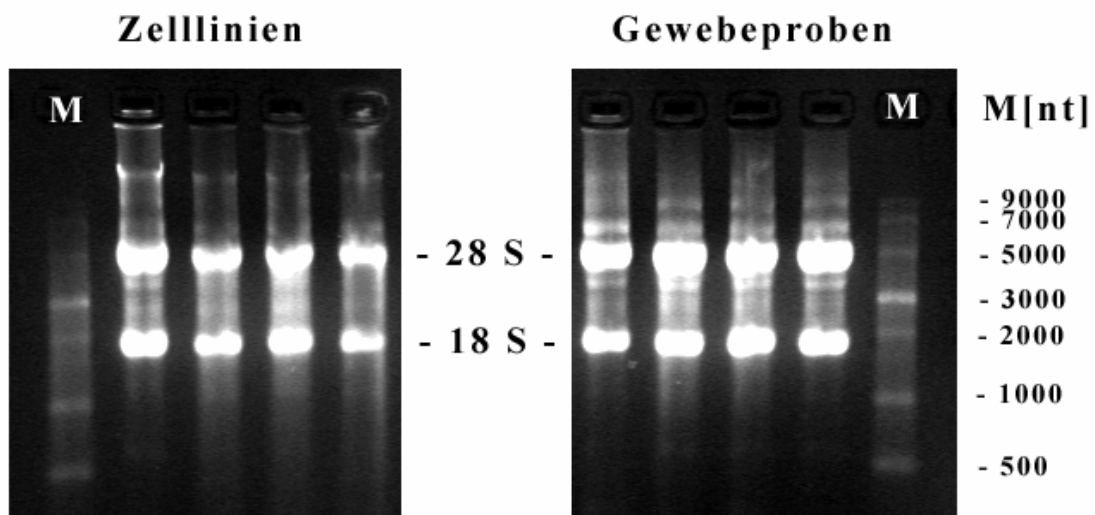


Abbildung 6. Repräsentativer RNA-Qualitätsnachweis für Zelllinien und Gewebeproben auf einem 2%igen Agarosegel. Die einzig deutlich sichtbaren Banden der 28S- und 18S-RNA weisen darauf hin, dass die Gesamtzell-RNA während der Extraktion intakt geblieben ist. M = Marker (RNA Ladder NO362S; New England BioLabs®Inc.), nt = nucleotides.

3.3 PCR- und Elektrophorese-Ergebnisse

In der PCR wurde ein 284 bp Fragment der LOX-mRNA, ein 371 bp Fragment der LOXL2-mRNA und ein 778 bp Fragment der ACTB-mRNA amplifiziert. Nach der Gelelektrophorese wurden die Produkte auf dem Ethidiumbromid-gefärbten 2%igen Agarosegel unter UV-Licht dargestellt (Abbildung 7).

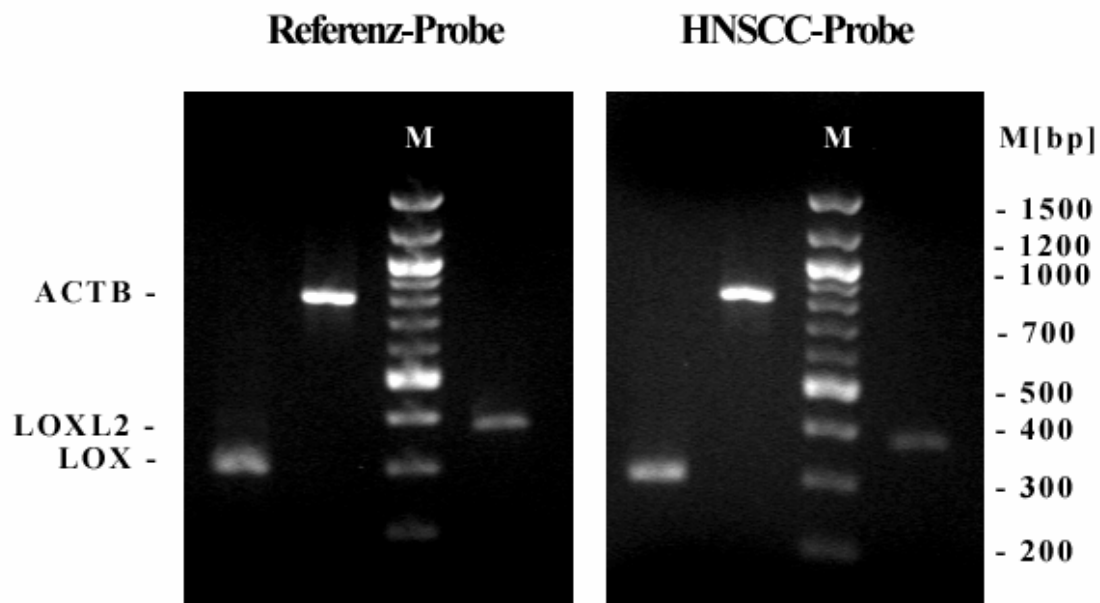


Abbildung 7. Repräsentative Gelelektrophorese für Referenz- und HNSCC-Proben. Die Banden für LOX, LOXL2 und ACTB finden sich jeweils an den erwarteten Stellen. Pro Bahn ist nur eine Bande sichtbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass weder Denaturierung noch Kontamination stattgefunden haben. M = Marker (100 bp DNA Ladder 323-1S; New England BioLabs®Inc.), bp = base pairs.

Gegenseitige Amplifizierung der jeweiligen Primer und Kontamination der PCR-Ansätze wurden über die während der PCR mitgeführten Negativkontrollen ausgeschlossen (Abbildung 8).

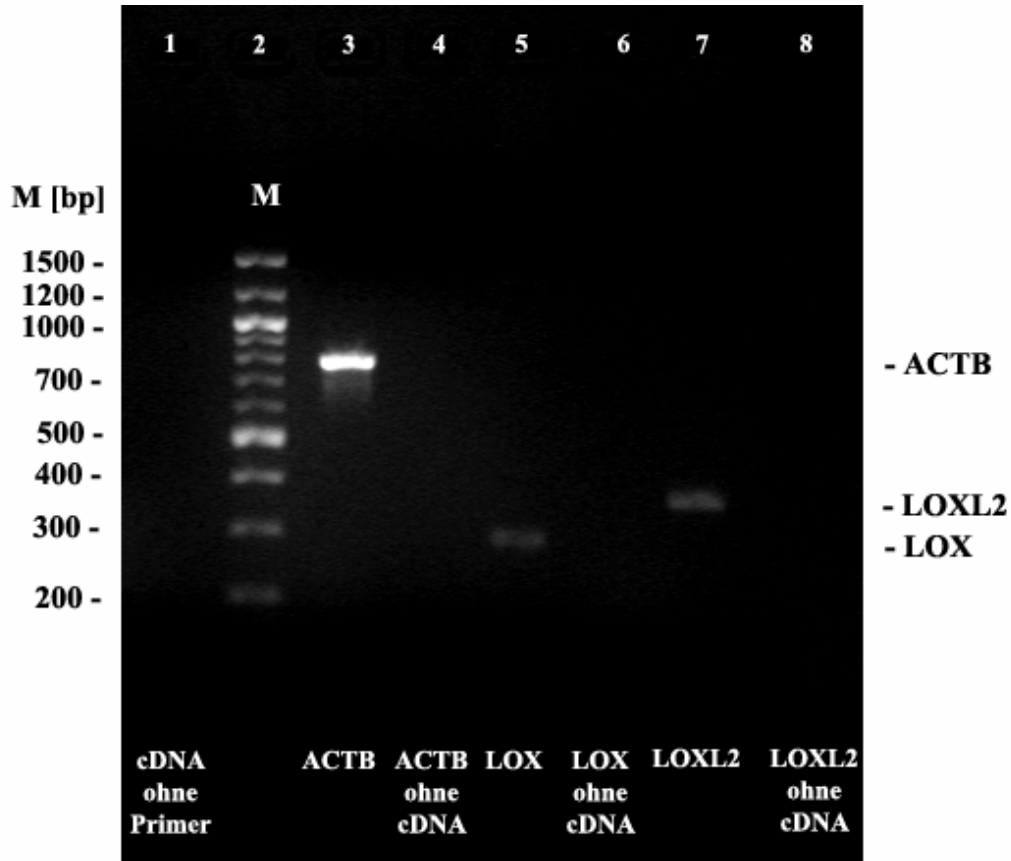


Abbildung 8. Repräsentatives Elektrophorese-Ergebnis für die während der PCR mitgeführten Negativkontrollen. Die Banden für LOX, LOXL2 und ACTB finden sich jeweils an den erwarteten Stellen. In Bahn 1 wurde ein PCR-Produkt aufgetragen, bei dem zur cDNA keine Primer zugesetzt worden waren, um eine etwaige Kontamination zu erkennen. In den Bahnen 4, 6 und 8 wurden PCR-Produkte mit den angegebenen Primern aufgetragen, denen keine cDNA beigefügt war, um gegenseitige Amplifizierung der Primer und Kontamination auszuschließen. M = Marker (100 bp DNA Ladder 323-1S; New England BioLabs®Inc.), bp = base pairs.

Die Sequenzen der durch Verwendung der jeweiligen Primerpaare in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente von LOX, LOXL2 und ACTB gehen aus Abbildung 9 hervor.

LOX-mRNA (NM_002317)

661	accagacagc	<u>cccgggagaa</u>	<u>gttcctgctc</u>	<u>tcagtaacct</u>	gcggccgccc	agccgcgtgg
721	acggcatggt	gggcgacgac	ccttacaacc	cctacaagta	ctctgacgac	aacccttatt
781	acaactacta	cgatacttat	gaaaggccca	gacctggggg	caggtaccgg	cccggatagc
841	gcactggcta	cttcagtac	ggtctcccag	acctggtggc	cgaccctac	tacatccagg
901	cgtccacgta	cgtgcagaag	atgtccatgt	aca <u>acctgag</u>	<u>atccgccgcg</u>	<u>gaggaaaact</u>

LOXL2-mRNA (NM_002318)

1201	atacaagcca	gagcaacccc	<u>tggctgcact</u>	<u>gagaggcgg</u>	gcctacatcg	gggaggggccg
1261	cgtggaggtg	ctcaaaaatg	gagaatgggg	gaccgtctgc	gacgacaagt	gggacctggt
1321	gtcggccagt	gtggtctgca	gagagctggg	ctttgggagt	gccaaagagg	cagtcactgg
1381	ctcccactg	gggcaaggga	tcggaccat	ccacctcaac	gagatccagt	gcacaggcaa
1441	tgagaagtc	attatagact	gcaagttcaa	tgccgagtct	cagggctgca	accacgagga
1501	ggatgctggt	gtgagatgca	acaccctgc	catgggcttg	cagaagaagc	tgcgctgaa
1561	cggcggccgc	<u>aatccctacg</u>	<u>agggccgagt</u>	ggaggtgctg	gtggagagaa	acgggtccct

β -Aktin-mRNA (NM_001101)

61	cgccagctc	accatg <u>gatg</u>	<u>atgatatgc</u>	<u>cgcgctcgtc</u>	<u>gtcgacaacg</u>	gctccggcat
121	gtgcaaggcc	ggcttcgctg	gcgacgatgc	ccccggggcc	gtttccct	ccatcgtggg
181	gcgccccagg	caccagggcg	tgatggtggg	catgggtcag	aaggattcct	atgtgggcga
241	cgaggcccag	agcaagagag	gcacctcac	cctgaagtac	cccatcgagc	acggcatcgt
301	caccaactgg	gacgacatgg	agaaaatctg	gcaccacacc	ttctacaatg	agctgcgtgt
361	ggctcccag	gagcaccctg	tgctgctgac	cgaggccccc	ctgaaccca	aggccaaccg
421	cgagaagatg	accagatca	tgtttgagac	cttcaacacc	ccagccatgt	acgttgctat
481	ccaggctgtg	ctatccctgt	acgcctctgg	ccgtaccact	ggcatcgtga	tggactccgg
541	tgacggggtc	accacactg	tgccatcta	cgaggggtat	gccctcccc	atgccatcct
601	gcgtctggac	ctggctggcc	gggacctgac	tgactacctc	atgaagatcc	tcaccgagcg
661	cggctacagc	ttcaccacca	cggccgagcg	ggaaatcgtg	cgtgacatta	aggagaagct
721	gtgctacgtc	gcctggact	tcgagcaaga	gatggccacg	gctgctcca	gctcctcct
781	ggagaagagc	tacgagctgc	ctgacggcca	ggtcatcacc	attggcaatg	<u>agcgttccg</u>
841	<u>ctgcctgag</u>	<u>gcactctcc</u>	agccttctt	cctgggcatg	gagtctgtg	gcacccacga

Abbildung 9. Sequenzen der durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente von LOX, LOXL2 und ACTB inklusive der verwendeten Primer. Die Primersequenzen sind unterstrichen und fettgedruckt dargestellt. Beachte, dass die mRNA als DNA-Sequenz dargestellt ist.

3.4 mRNA-Level von LOX und LOXL2 in Karzinom-Proben

Die mRNA-Level der maligne transformierten Proben wurden anhand der Differenz zwischen dem Mittelwert der mRNA-Level der Referenzproben und dem Wert des mRNA-Levels jeder maligne transformierten Probe in Gruppen eingeteilt und mit $0,6 < x < 0,8$ REE als extrem ($\downarrow\downarrow\downarrow$), $0,4 < x < 0,6$ REE als stark ($\downarrow\downarrow$), $0,2 < x < 0,4$ REE als mäßig (\downarrow), $0,0 < x < 0,2$ REE als leicht (\downarrow) reduziert und mit $x < 0$ REE als erhöht (\uparrow) beurteilt (Tabelle 5 und 6).

3.4.1 mRNA-Level von LOX in Karzinom-Zelllinien

Sechs Karzinom-Zelllinien zeigen mäßig reduzierte mRNA-Level von LOX mit einer Differenz zwischen 0,3 und 0,4 (UT-SCC-16A) und zwischen 0,2 und 0,3 (UM-SCC-1, -9, -19, -22B, UT-SCC-24B). Sieben Zelllinien präsentierten leicht reduzierte mRNA-Level mit einer Differenz zwischen 0,1 und 0,2 (UM-SCC-14A, -14B, -14C, UT-SCC-8, -19A, UMB-SCC-745) und zwischen 0 und 0,1 (UM-SCC-27). Bei zwei Zelllinien war der mRNA-Level erhöht mit einer Differenz zwischen 0 und -0,1 (UT-SCC-24A) und zwischen -0,3 und -0,2 (UT-SCC-10) (Tabelle 5).

3.4.2 mRNA-Level von LOX in Karzinom-Gewebeproben

Bei neun Karzinom-Gewebeproben ergaben sich extrem reduzierte mRNA-Level von LOX mit einer Differenz zwischen 0,7 und 0,8 (477, 619, 620) und zwischen 0,6 und 0,7 (503, 542, 564, 693, 747, 852). Zehn Gewebeproben zeigten stark reduzierte mRNA-Level mit einer Differenz zwischen 0,5 und 0,6 (465, 576, 612, 778, 865) und zwischen 0,4 und 0,5 (500, 662, 700, 799, 854). Bei vier Gewebeproben war der mRNA-Level mäßig reduziert mit einer Differenz zwischen 0,3 und 0,4 (496, 621, 745) und zwischen 0,2 und 0,3 (524). Bei der Gewebeprobe 657 ergab sich ein nur leicht reduzierter mRNA-Level mit einer Differenz zwischen 0 und 0,1. Vier Gewebeproben zeigten erhöhte mRNA-Level für LOX: die Proben 609 und 858 mit einer Differenz zwischen -0,1 und 0, Probe 680 mit einer Differenz zwischen -0,4 und -0,3 und Probe 772 mit einer Differenz zwischen -1 und -0,9 (Tabelle 6).

3.4.3 mRNA-Level von LOXL2 in Karzinom-Zelllinien

Sechs Karzinom-Zelllinien zeigten mäßig reduzierte mRNA-Level von LOXL2 mit einer Differenz zwischen 0,3 und 0,4 (UM-SCC-1, -3) und zwischen 0,2 und 0,3 (UM-SCC-14A, -14C, UT-SCC-19A, UMB-SCC-745) und bei sechs Zelllinien ergaben

sich leicht reduzierte mRNA-Level mit einer Differenz zwischen 0,1 und 0,2 (UM-SCC-14B, -22B, UT-SCC-16A) und zwischen 0 und 0,1 (UM-SCC-27, UT-SCC-8, -19B). Bei zwei Zelllinien war der Expressionslevel erhöht mit einer Differenz zwischen 0 und -0,1 (UM-SCC-4) und zwischen -0,2 und -0,1 (UT-SCC-24A) (Tabelle 5).

3.4.4 mRNA-Level von LOXL2 in Karzinom-Gewebeproben

Bei 18 Karzinom-Gewebeproben stellten sich leicht reduzierte mRNA-Level von LOXL2 mit einer Differenz zwischen 0,1 und 0,2 (466, 477, 542, 564, 619, 620, 621, 783) und zwischen 0 und 0,1 (465, 500, 503, 576, 609, 612, 662, 700, 745, 747) heraus. Neun Gewebeproben zeigten erhöhte mRNA-Level: vier Proben mit einer Differenz zwischen -0,1 und 0 (657, 852, 854, 865), drei Proben mit einer Differenz zwischen -0,2 und -0,1 (496, 524, 858), Probe 799 mit einer Differenz zwischen -0,3 und -0,2 und Probe 772 mit einer Differenz zwischen -0,6 und -0,5 (Tabelle 6).

Tabelle 5. Staging, Grading, LOX- und LOXL2-mRNA-Level der untersuchten HNSCC-Zelllinien.

n	HNSCC-Zelllinien	Stadium		Grad	untersucht auf	mRNA-Level-Differenz		mRNA-Level	
		TNM	UICC			LOX	LOXL2	LOX	LOXL2
1	UMB-SCC-745	T4N2bM0	IV	G2	LOX / LOXL2	0,1811	0,2918	↓	↓↓
2	UM-SCC-1	T2N0M0	II	G2	LOX / LOXL2	0,2374	0,3218	↓↓	↓↓
3	UM-SCC-3	T1N0M0	I	G2	LOXL2		0,3328		↓↓
4	UM-SCC-4	T3N2M0	IV	G3	LOXL2		-0,0562		↑
5	UM-SCC-9	T2N0M0	II	G1-G2	LOX	0,2074		↓↓	
6	UM-SCC-14A	T1N0M0	I	G2-G3	LOX / LOXL2	0,1807	0,2748	↓	↓↓
7	UM-SCC-14B	T1N0M0	I	G3	LOX / LOXL2	0,1306	0,1651	↓	↓
8	UM-SCC-14C	T2N1M0	III	G3	LOX / LOXL2	0,1393	0,2413	↓	↓↓
9	UM-SCC-19	T2N1M0	III	G1-G2	LOX	0,2603		↓↓	
10	UM-SCC-22B	T2N1M0	III	G1-G2	LOX / LOXL2	0,215	0,1655	↓↓	↓
11	UM-SCC-27	T1N0M0	I	G1-G2	LOX / LOXL2	0,0742	0,0932	↓	↓
12	UT-SCC-8	T2N0M0	II	G1	LOX / LOXL2	0,1511	0,0121	↓	↓
13	UT-SCC-10	T1N0M0	I	G2	LOX	-0,2314		↑	
14	UT-SCC-16A	T3N0M0	III	G3	LOX / LOXL2	0,3435	0,192	↓↓	↓
15	UT-SCC-19A	T4N0M0	IV	G2	LOX / LOXL2	0,1701	0,2352	↓	↓↓
16	UT-SCC-19B	T4N0M0	IV	G2	LOXL2		0,0407		↓
17	UT-SCC-24A	T2N0M0	II	G2	LOX / LOXL2	-0,0575	-0,1685	↑	↑
18	UT-SCC-24B	T2N0M0	II	G2	LOX	0,2599		↓↓	

mRNA-Level-Differenzen in REE.

Table 6. Staging, Grading, LOX- und LOXL2-mRNA-Level der untersuchten HNSCC-Gewebeproben.

n	HNSCC-Gewebe-proben	Stadium		Grad	untersucht auf	mRNA-Level-Differenz		mRNA-Level	
		TNM	UICC			LOX	LOXL2	LOX	LOXL2
1	465	T4N0M0	IV	G4	LOX / LOXL2	0,5052	0,0171	↓↓↓	↓
2	466	TxN2bM0	IV	,	LOXL2		0,1012		↓
3	477	T4N0M0	IV	G2	LOX / LOXL2	0,7327	0,1242	↓↓↓↓	↓
4	496	T3N0M0	III	G2	LOX / LOXL2	0,3637	-0,169	↓↓	↑
5	500	T4N2cM0	IV	G3	LOX / LOXL2	0,47	0,0499	↓↓↓	↓
6	503	T4N2aM0	IV	G2	LOX / LOXL2	0,6228	0,0903	↓↓↓↓	↓
7	524	T3N2cM0	IV	,	LOX / LOXL2	0,2209	-0,1578	↓↓	↑
8	542	T4N2cM0	IV	G2	LOX / LOXL2	0,6705	0,1008	↓↓↓↓	↓
9	564	T1N0M0	I	G2	LOX / LOXL2	0,6684	0,1166	↓↓↓↓	↓
10	576	T4N2bM0	IV	G1	LOX / LOXL2	0,5479	0,06	↓↓↓	↓
11	609	T4N2cM0	IV	G2	LOX / LOXL2	-0,0386	0,0565	↑	↓
12	612	T4N2bM0	IV	G2	LOX / LOXL2	0,571	0,0319	↓↓↓	↓
13	619	T4N2cM0	IV	G2	LOX / LOXL2	0,7509	0,1357	↓↓↓↓	↓
14	620	T4N2cM0	IV	G2	LOX / LOXL2	0,7328	0,1071	↓↓↓↓	↓
15	621	T4N2cM0	IV	G3	LOX / LOXL2	0,3224	0,1342	↓↓	↓
16	657	T4N2cM0	IV	G2	LOX / LOXL2	0,0664	-0,0609	↓	↑
17	662	T2N1M0	III	G3	LOX / LOXL2	0,4311	0,0986	↓↓↓	↓
18	680	T2N0M0	II	G1	LOX	-0,3182		↑	
19	693	T2N2aM0	IV	G3	LOX	0,6524		↓↓↓↓	
20	700	T3N0M0	III	G3	LOX / LOXL2	0,4323	0,0363	↓↓↓	↓
21	745	T4N2bM0	IV	G2	LOX / LOXL2	0,3277	0,0233	↓↓	↓
22	747	T3N0M0	III	G3	LOX / LOXL2	0,6166	0,0882	↓↓↓↓	↓
23	772	T2N1M0	III	G2	LOX / LOXL2	-0,9711	-0,5326	↑	↑
24	778	T4N3M0	IV	G2-G3	LOX	0,5869		↓↓↓	
25	783	T4N1M0	IV	G2	LOXL2		0,131		↓
26	799	T4N3Mx	IV	G3	LOX / LOXL2	0,4771	-0,2424	↓↓↓	↑
27	852	T4NxMx	IV	G2	LOX / LOXL2	0,603	-0,0265	↓↓↓↓	↑
28	854	T2N2cM0	IV	G2	LOX / LOXL2	0,4194	-0,0708	↓↓↓	↑
29	858	T3N0M0	III	G2	LOX / LOXL2	-0,0621	-0,1824	↑	↑
30	865	T4	IV	G2	LOX / LOXL2	0,5557	-0,0078	↓↓↓	↑

mRNA-Level-Differenzen in REE.

3.5 Statistische Auswertung

3.5.1 Skalenniveau

Aufgrund der Durchführung der PCR unter Verwendung eines internen Standards, der Verwendung des Dokumentationssystem *Gel Doc 2000* zur Akquisition der Elektropherogramme und der *Quantity One® Quantitation Software* zur Erfassung der Helligkeit der Elektrophoresebanden kann Intervallskalenniveau für die ermittelten Werte der mRNA-Level von LOX und LOXL2 in HNSCC- und Referenz-Zellen und -Gewebeproben angenommen werden [8].

3.5.2 Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

Der Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung zeigte, dass für die ermittelten Werte der LOX- und LOXL2-mRNA-Level für die jeweilige Stichprobe (n1 – n8) eine Normalverteilung angenommen werden kann, da für keine der Stichproben eine zweiseitige asymptotische Signifikanz auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ gegeben ist (Tabelle 7).

Tabelle 7. Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung der Werte der LOX- und LOXL2-mRNA-Level für die untersuchten Stichproben n1 – n8.

Stichprobe	Z-Wert	p (2-seitig)
n1 = LOX in HNSCC-Zelllinien	0,9398	0,3402
n2 = LOX in Referenz-Zellen	0,9257	0,3582
n3 = LOX in HNSCC-Gewebeproben	1,1250	0,1590
n4 = LOX in Referenz-Gewebeproben	0,5891	0,8784
n5 = LOXL2 in HNSCC-Zelllinien	0,6548	0,7845
n6 = LOXL2 in Referenz-Zellen	0,9259	0,3580
n7 = LOXL2 in HNSCC-Gewebeproben	1,0737	0,1992
n8 = LOXL2 in Referenz-Gewebeproben	0,6477	0,7956

Die ermittelten Z-Werte mit den entsprechenden Signifikanzniveaus (*p*) sind dargestellt.

3.5.3 Deskriptive Statistik

Da Intervallskalenniveau und Normalverteilung der Werte der LOX- und LOXL2-mRNA-Level für die jeweilige Stichprobe gegeben sind, wurde die Angabe von Mittelwert, Standardabweichung, Wertebereich und Spannweite gewählt, um die Ergebnisse deskriptiv statistisch aufzuarbeiten (Tabellen 8 und 9).

Table 8. Deskriptive Statistik der mRNA-Expressionsergebnisse für LOX.

LOX in	Mittelwert	Standardabweichung	Wertebereich	Spannweite
HNSCC-Zellen	0,2101	0,1399	0,0174 - 0,5922	0,5748
Referenz-Zellen	0,3608	0,3564	0,0406 - 1,1218	1,0812
HNSCC-Gewebe	0,3717	0,3742	0,0121 - 1,7342	1,7221
Referenz-Gewebe	0,7631	0,6960	0,0486 - 1,7008	1,6522

Die Ergebnisse sind in REE angegeben.

Table 9. Deskriptive Statistik der mRNA-Expressionsergebnisse für LOXL2.

LOXL2 in	Mittelwert	Standardabweichung	Wertebereich	Spannweite
HNSCC-Zellen	0,2172	0,1505	0,0374 - 0,5387	0,5013
Referenz-Zellen	0,3702	0,3700	0,0169 - 1,5537	1,5368
HNSCC-Gewebe	0,1512	0,1508	0,0175 - 0,6857	0,6683
Referenz-Gewebe	0,1532	0,1211	0,0187 - 0,2985	0,2797

Die Ergebnisse sind in REE angegeben.

3.5.3.1 Deskriptiver Vergleich der mRNA-Level

Die Mittelwerte der mRNA-Level von LOX waren in den untersuchten HNSCC-Zelllinien (0,2101 REE) und -Gewebeproben (0,3717 REE) vermindert im Vergleich zu denen der Referenz-Zellen (0,3608 REE) und -Gewebeproben (0,7631 REE) (Abbildung 10).

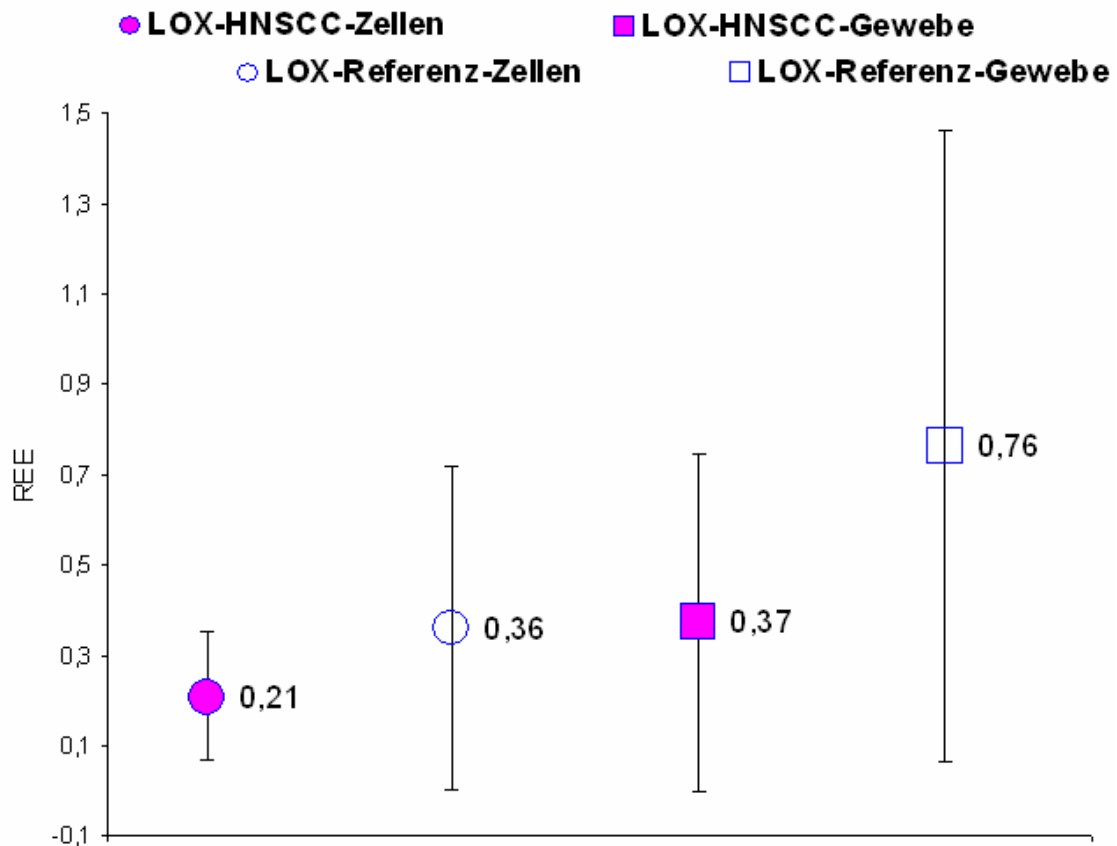


Abbildung 10. Vergleich der LOX-mRNA-Level in HNSCC- und Referenz-Proben. Mittelwert und Standardabweichung sind für die jeweilige Stichprobe dargestellt. mRNA-Level in REE.

Der Mittelwert der mRNA-Level von LOXL2 in den HNSCC- Zelllinien (0,2172 REE) war im Vergleich zu dem der Referenz-Zellen (0,3702 REE) ebenfalls deutlich reduziert, während die Mittelwerte der mRNA-Level von LOXL2 in Karzinom-Gewebe (0,1512 REE) und in Referenz-Gewebe (0,1532 REE) fast gleich waren (Abbildung 11).

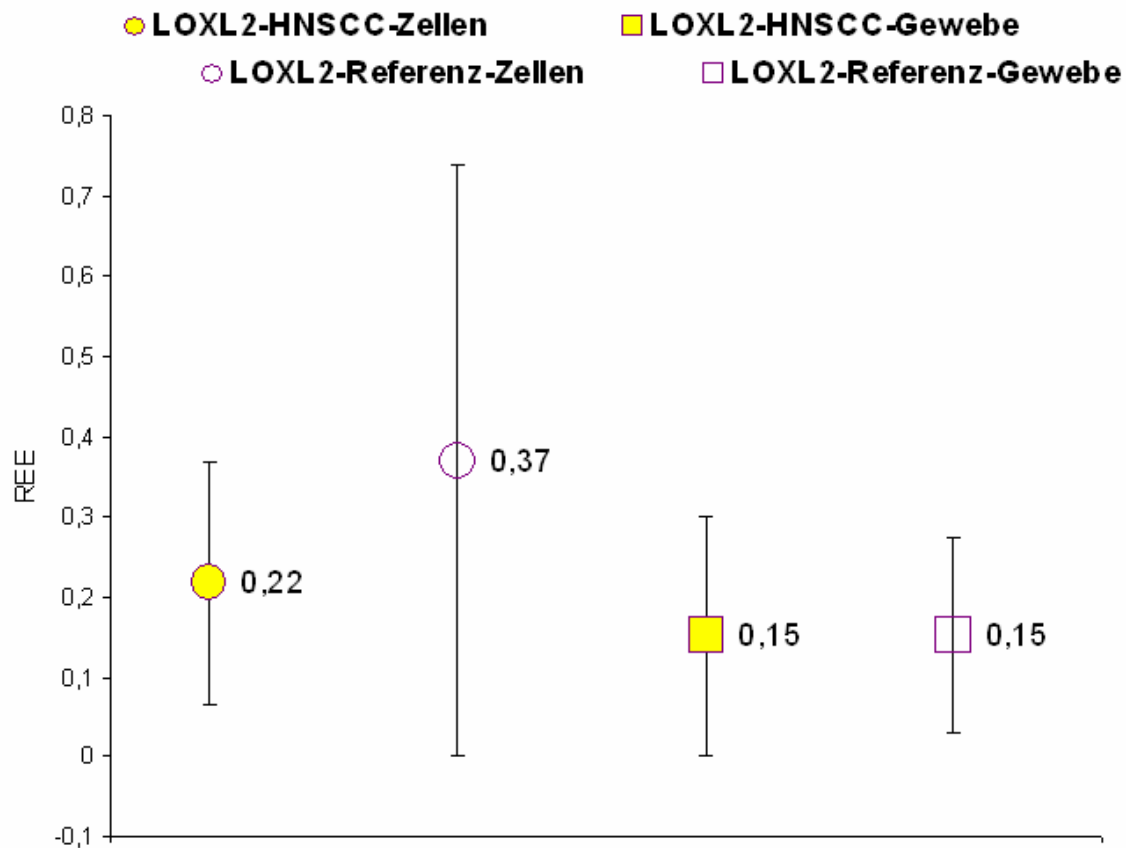


Abbildung 11. Vergleich der LOXL2-mRNA-Level in HNSCC- und Referenz-Proben. Mittelwert und Standardabweichung sind für die jeweilige Stichprobe dargestellt. mRNA-Level in REE.

So stellten sich reduzierte mRNA-Level von LOX in HNSCC-Zellen und -Geweben im Vergleich zu Referenz-Material durch RT-PCR dar. Weiterhin zeigte sich ein reduzierter Level der LOXL2-mRNA in Karzinom-Zellen. In den untersuchten HNSCC-Gewebeproben war der mRNA-Level von LOXL2 jedoch kaum geringer als in den entsprechenden Referenzproben.

3.5.3.2 Effektgrößen

Die Effektgrößen für die Unterschiede der LOX- und LOXL2-Expression in den jeweils miteinander zu vergleichenden HNSCC- und Referenz-Stichproben sind in Tabelle 10 dargestellt. Dabei wird eine Effektgröße von 0,2 als klein, von 0,5 als mittel und von 0,8 als groß klassifiziert [17].

Tabelle 10. Effektgrößen (*d*) zur Darstellung der standardisierten Mittelwertdifferenzen der Expression von LOX und LOXL2 in HNSCC- und Referenz-Zellen und -Gewebeproben.

	Zelllinien	Gewebeproben
LOX	d = 0,56	d = 0,70
LOXL2	d = 0,54	d = 0,01

Die ermittelten Effektgrößen sprechen dafür, dass der Effekt der Reduktion der mRNA-Level von LOX in HNSCC-Zellen und –Gewebe im Vergleich zu Referenzmaterial als mittel bis groß zu klassifizieren ist. Auch für die mRNA-Level von LOXL2 in Karzinom-Zellen konnte ein mittlerer Effekt der Reduktion nachgewiesen werden. Die Effektgröße für den Vergleich der LOXL2-mRNA-Level in Gewebeproben ist allerdings sehr gering, so dass hier von keiner bedeutenden Reduktion in HNSCC gegenüber Referenzmaterial ausgegangen werden kann.

3.5.4 Inferenzstatistik – Levene-Test und T-Test

Aus oben genannten Gründen (siehe 3.5.3) konnte zum Vergleich der LOX- und LOXL2-mRNA-Level der Karzinomproben mit denen der Referenzproben der T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt werden (Tabelle 12). Ob Homogenität der Varianzen vorlag, wurde vorab durch den Levene-Test überprüft mit einem zweiseitigen Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ (Tabelle 11).

Tabelle 11. Levene-Test der Varianzhomogenität.

	Zelllinien	Gewebeproben
LOX	F = 7,850; p = 0,009	F = 9,971; p = 0,003
LOXL2	F = 2,750; p = 0,108	F = 0,001; p = 0,979

Die ermittelten F-Werte mit den entsprechenden Signifikanzniveaus (*p*) sind dargestellt.

Die Varianzen der Werte für die LOX-mRNA-Level der Karzinomproben und dazugehörigen Referenzproben waren nicht homogen, für die jeweiligen Werte der LOXL2-mRNA-Level lag Varianzgleichheit vor. Daraufhin wurden entsprechende T-Tests mit einem zweiseitigen Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ durchgeführt (Tabelle 12).

Tabelle 12. T-Test zum Vergleich der LOX- und LOXL2-mRNA-Level der Karzinomproben mit denen der Referenzproben.

	Zelllinien	Gewebeproben
LOX	T = -1,433; df = 15,185; p = 0,172	T = -1,528; df = 8,190; p = 0,164
LOXL2	T = -1,448; df = 29; p = 0,158	T = -0,34; df = 33; p = 0,973

Die ermittelten T-Werte mit den dazugehörigen Freiheitsgraden (df) und den entsprechenden zweiseitigen Signifikanzniveaus (p) sind angegeben.

Im T-Test für unabhängige Stichproben stellte sich heraus, dass die Unterschiede der mRNA-Level von LOX bzw. LOXL2 in HNSCC gegenüber den jeweiligen Kontrollen nicht signifikant waren.

3.5.5 Power-Analysen: Teststärke und Fallzahlbestimmung

Zur Ermittlung der jeweiligen Teststärke der durchgeführten T-Tests wurden entsprechende Post-Hoc Poweranalysen durchgeführt. Ausgehend von den entsprechenden Stichprobenumfängen für LOX und LOXL2, den jeweiligen Irrtumswahrscheinlichkeiten und den ermittelten Effektgrößen ergeben sich bezüglich der T-Tests für unabhängige Stichproben die errechneten Teststärken ($1 - \beta$) [17] (Tabelle 13).

Tabelle 13. Power-Analysen zur Ermittlung der jeweiligen Teststärken der T-Tests für LOX- und LOXL2-Expression in den unterschiedlichen Stichproben.

	Zelllinien		Gewebeproben	
	Bedingungen	Power	Bedingungen	Power
LOX	n1 = 15; n2 = 13; d = 0,56; $\alpha = 0,172$	0,5364	n3 = 28; n4 = 8; d = 0,70; $\alpha = 0,164$	0,6300
LOXL2	n5 = 14; n6 = 17; d = 0,54; $\alpha = 0,158$	0,5253	n7 = 27; n8 = 8; d = 0,01; $\alpha = 0,973$	0,9730

n1 – n8 = Stichprobenumfänge für LOX und LOXL2, n1, n3, n5, n7 = jeweilige HNSCC-Proben, n2, n4, n6, n8 = jeweilige Referenz-Proben, d = Effektgröße, α = Irrtumswahrscheinlichkeit, Power = Teststärke (1- β).

Unter der Annahme, dass die gezeigten Effekte die zu erwartenden Effekte widerspiegeln, wurden entsprechende A Priori Power-Analysen zur Fallzahlbestimmung für nachfolgende Untersuchungen durchgeführt. Um die gefundenen Effekte auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ und mit einer Power von 90% in nachfolgenden Studien nachweisen zu können und somit zu überprüfen, ob sie generell gültig sind, müssten für LOX in Zelllinien 68 Proben pro Gruppe, für LOX in Gewebeproben 44 Proben pro Gruppe und für LOXL2 in Zelllinien 74 Proben pro Gruppe untersucht werden. Die mRNA-Level von LOXL2 in Gewebeproben unterscheiden sich zwischen HNSCC- und Referenz-Proben kaum, was auch die niedrige Effektgröße widerspiegelt.

3.5.6 Korrelationen für HNSCC-Proben

Um mögliche Zusammenhänge zwischen den mRNA-Leveln von LOX und LOXL2 und den klinischen Parametern der HNSCC-Proben aufzuzeigen, wurden entsprechende Korrelationen zwischen den mRNA-Leveln von LOX sowie LOXL2, den TNM- bzw. UICC-Stadien und dem Grading der HNSCC-Proben und dem Geschlecht und dem Alter der Patienten berechnet. Alle Korrelationen basieren auf einem zweiseitigen Signifikanzniveau von 5%.

Die mRNA-Level von LOX und LOXL2 korrelierten sowohl bei den Karzinom-Zelllinien als auch bei den Karzinom-Gewebeproben signifikant miteinander. Weiterhin korrelierten bei den Karzinom-Zelllinien der mRNA-Level von LOXL2

signifikant negativ mit dem Alter und der mRNA-Level von LOX negativ mit dem T-Stadium, dem UICC-Stadium und dem Alter (Tabelle 14). Die nicht erwähnten Korrelationen hatten einen Korrelationseffizienten von $r < 0,400$ bzw. $r > -0,400$.

Tabelle 14. Korrelationen für HNSCC-Proben nach Spearman-Rho zwischen den mRNA-Leveln von LOX, LOXL2 und den klinischen Daten der Proben.

HNSCC-Zelllinien				HNSCC-Gewebeproben			
		mRNA-Level				mRNA-Level	
		LOX	LOXL2			LOX	LOXL2
LOX- mRNA-Level				LOX- mRNA-Level			
LOXL2- mRNA-Level	r	0,645*		LOXL2- mRNA-Level	r	0,638**	
	p	0,032			p	0,001	
	n	11			n	25	
T-Stadium	r	-0,516	0,135	T-Stadium	r	-0,290	-0,324
	p	0,059	0,645		p	0,134	0,099
	n	14	14		n	28	27
N-Stadium	r	-0,305	-0,050	N-Stadium	r	-0,095	0,053
	p	0,289	0,866		p	0,639	0,798
	n	14	14		n	27	26
				M-Stadium	r	-0,091	0,327
					p	0,652	0,103
					n	27	26
UICC-Stadium	r	-0,524	0,150	UICC-Stadium	r	-0,297	-0,162
	p	0,055	0,609		p	0,124	0,420
	n	14	14		n	28	27
Grading	r	0,056	-0,116	Grading	r	-0,058	-0,002
	p	0,843	0,693		p	0,776	0,991
	n	15	14		n	27	25
Geschlecht	r	-0,072	-0,124	Geschlecht	r	-0,265	0,027
	p	0,808	0,687		p	0,172	0,895
	n	14	13		n	28	27
Alter	r	-0,424	-0,668*	Alter	r	0,141	0,375
	p	0,149	0,018		p	0,474	0,054
	n	13	12		n	28	27

r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanzniveau, n = Anzahl der in Betracht gekommenen Proben. * Korrelation ist signifikant auf einem zweiseitigen 5%-Signifikanzniveau. ** Korrelation ist signifikant auf einem zweiseitigen 1%-Signifikanzniveau.

3.6 Interpretation der Ergebnisse

Viele Tumore wie auch HNSCC sind in ihrer Zusammensetzung heterogen und enthalten Regionen von Bindegewebe, Blutgefäßen und auch inflammatorischen Zellen, die in den Tumor einwandern [84]. Diesem Umstand muss bei der Interpretation der anhand von HNSCC-Gewebeproben erhobenen vorliegenden Ergebnisse Rechnung getragen werden. Weiterhin kann aus den mRNA-Leveln nicht direkt auf die Enzymaktivität der LO bzw. LOL2 geschlossen werden, da diese neben der Genexpression von weiteren Faktoren abhängt. So kann die Enzymaktivität möglicherweise durch posttranslationale Faktoren wie z.B. proteolytische Prozessierung und destruktive katabolische Aktivitäten reguliert werden [144]. Daher müssen die hier durch RT-PCR und Gelelektrophorese erzielten Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden, bevor sie nicht durch andere Techniken bestätigt werden können [148]. Auch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit mit Ergebnissen anderer Studien ist aufgrund der Anwendung unterschiedlicher Methoden und Versuchsanordnungen nur bedingt möglich.

4 Diskussion

4.1 LOX-mRNA-Level in HNSCC

Die reduzierte Expression der LOX-mRNA in HNSCC-Zelllinien und -Gewebebeobachten im Vergleich zu Referenz-Material steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer durchgeführter Studien und unterstützt die angenommene Tumorsuppressor-Funktion von LOX. Weiterhin lassen sich die vorliegenden Ergebnisse auch mit einer „Anti-Tumor-Funktion“ von LOX vereinbaren.

4.1.1 Erniedrigte LOX-Expression in Zelllinien

Zahlreiche Studien an natürlich vorkommenden und experimentell induzierten malignen Tumoren wiesen auf die reduzierte Expression der LOX-mRNA in malignen Zelllinien im Vergleich zu Referenz-Zellen hin. So konnte für humane Tumor-Zelllinien, die von überwiegend mesenchymalen und einigen chorioepithelialen Zellen abstammten, gezeigt werden, dass die LO-Aktivität in ihrem Kulturmedium [80], ihre LOX-mRNA-Level und ihre LO-Transkriptions-Level [50] deutlich vermindert waren. Murine Prostata-Zelllinien, die von Metastasen abstammten, zeigten gegenüber solchen, die von Primärtumoren abstammten, reduzierte LOX-Expression, die sich auch nicht mehr durch TGF- β 1 stimulieren ließ [114]. Epigenetische Veränderungen wie methylierungs-assoziiertes Silencing von LOX wurde in Karzinom (CA)-Zelllinien von Magen, Colon, Lunge und Ovar beobachtet [73]. In murinen Zellen aus den dominant erblichen CA-Syndromen *Multiple Endokrine Neoplasie* war LOX im Vergleich zu gesunden Zellen reprimiert [148] und auch in Lungen-CA-Zelllinien konnte LOX nicht entdeckt werden [132]. Weiterhin exprimierten wenig invasive bzw. nichtmetastasierende Tumor-Zelllinien vom humanem Mamma-CA, humanem uvealen und dermalen Melanom und Prostata-CA der Ratte nur wenig bis gar kein LOX [76] und in epidermalen Tumorzellen von Basalzellkarzinomen und SCC der Haut war keine LOX-Expression nachweisbar [11]. Auch die Abnahme der Fibronektin-Synthese in denselben Karzinomzellen, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden [46], steht in Einklang mit den hier nachgewiesenen reduzierten LOX-mRNA-Leveln.

4.1.2 Erniedrigte LOX-Expression in Gewebebeobachten

Für Prostata-Gewebebeobachten von Maus und Mensch konnte eine kontinuierliche Abnahme des LOX-Expressionlevels über die Sequenz benignes Epithel, Primärtumor

und Metastase nachgewiesen werden: je maligner und fortgeschrittener das Tumorwachstum war, umso niedriger war der Expressionslevel von LOX [114]. In Adeno-CAs des Colons waren die LOX-mRNA-Level ebenfalls herunterreguliert [25] und in humanen Magen-CAs fand keine LOX-Expression statt [73]. Auch bei Rezidiven und Metastasen von malignen Tumoren des oberen Digestivtrakts wie Ösophagus- und Magen-CAs und von malignen Herz-Tumoren konnte eine reduzierte Expressionsrate der LOX-mRNA nachgewiesen werden, die in Tumorgeweben mit Lymphknotenmetastasen sowie Tumoren mit Infiltration der tiefen Muskelschichten besonders gering war [52]. Für das Ovarial-CA konnte ebenfalls eine Reduktion des LOX-mRNA-Levels gegenüber normalem Ovar gezeigt werden [109]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Untersuchung aufgezeigt, dass die mRNA-Level von LOX in HNSCC-Gewebeproben deutlich geringer waren als die in den Referenz-Geweben. Die Assoziation interstitieller und kompletter Verluste von Chromosom 5q, der Lokalisation von LOX [49], mit verschiedenen Malignomen wie dem Adeno-CA des Magens, Lungen-CA, Prostata-CA, männlichen Keimzell-Tumor, Colon-CA [25] und Ösophagus-CA [23], weist weiterhin auf eine Rolle der LOX-Expression bei der Pathogenese von Malignomen hin.

4.1.3 Erniedrigte LOX-Expression in *ras*-transformierten Zellen

Passend zu der hier demonstrierten Verminderung der LOX-mRNA-Level in Zelllinien und Gewebebiopsien von HNSCC schien LOX auch speziell in Zellen vermindert zu sein, die durch *ras* oder *ras*-abhängige Onkogene transformiert waren [39]. So wurden reduzierte LOX-mRNA-Level in experimentellen Tumoren gefunden, die aus *c-H-ras* transformierten Zellen von Maus [20, 74, 98, 114], Ratte [48, 98] und Mensch [24] oder *v-Ki-ras* transformierten Zellen der Maus [127] resultierten. Andererseits war LOX eines der Hauptgene, die gleichzeitig mit dem Reversions-Prozess induziert wurden [20, 40, 48, 74, 79, 98, 127]. Dieser Zusammenhang und die *Anti-ras-Aktivität* von LOX [40] wiesen auf eine mögliche tumorsuppressive Funktion von LOX hin, die durch die vorliegenden Daten auch bei HNSCC-Tumoren wahrscheinlich ist.

4.2 LOX: Tumorsuppressor-Funktion

Ein erster Hinweis auf eine mögliche Rolle der LOX-Expression bei der Tumorsuppression ergab sich aufgrund der deutlichen Übereinstimmung der cDNA-Sequenz des murinen *ras-recision-Gens* (*rrg*), einem vermeintlichen Antionkogen von *ras* [20], mit einer 2672 bp cDNA der Ratten-LOX: *Rrg*, ein Regulator der *ras*-Expression, kodierte die Lysyl Oxidase [74]. Weiterhin bestand eine auffallende Aminosäure-Sequenzhomologie zwischen humaner LO und murinem *rrg* [91]. Auch das wachstumshemmende Potential von LOX auf *c-Ha-ras* exprimierende murine Fibroblasten [136] und im Zusammenhang mit u.a. *Ha-ras*-induzierter Oozyten-Maturation wurde als Anhalt für eine mögliche tumorsuppressive Funktion von LOX gewertet [26]. Die Reduktion der Proliferationsraten von durch bFGF-Überexpression transformierten Zellen durch LOX [86] sowie die Größen-Reduktion sich aus Magen-CA-Zelllinien entwickelnder Tumoren *in vitro* und *in vivo* auf das Wiederherstellen der LOX-Expression [73] wiesen ebenfalls auf die tumorsuppressive Funktion von LOX hin. Die Induktion der Transformation durch Herunterregulation von LOX in normalen Nierenfibroblasten der Ratte mit möglicherweise tumorigenetischem Potential, war ein weiterer Hinweis auf die Tumorsuppressor-Aktivität von LOX. Diese transformierten Zellen zeigten einen Verlust der PDGF- und IGF-1-Regulation sowie eine konstitutive Aktivierung des *ras*-Proto-Onkogens [39]. Da die Induktion der *rrg*-Expression im Zusammenhang mit Reversion unabhängig vom Stimulus der Reversion und der Art der transformierten Zellen zu sein scheint, aus denen die revertierten Zellen hervorgehen [79], spielt LOX bei der Tumorsuppression möglicherweise eine generelle Rolle, die über den Zusammenhang mit *ras*-Onkogen-induzierter Transformation hinausgeht [60].

So liegen verschiedene Befunde vor, die LOX als Tumorsuppressor auszeichnen. LOX-Herunterregulation in ursprünglichen, normalen Zellen scheint nicht zur Transformation auszureichen [20, 74], in normalen Zellen mit möglicherweise tumorigenetischem Potential führte sie allerdings zur malignen Transformation [39]. Weiterhin erfordert eine onkogen-induzierte zelluläre Transformation möglicherweise die Herunterregulation von LOX [20, 74], während die Tumorigenität von onkogen-transformierten Zellen durch Überexpression von LOX nicht antagonisiert werden konnte [69]. Das Fehlen des Tumorsuppressors kann den Transformationsprozess triggern, wenn der genetische Background es erlaubt

(z.B. Onkogen-Aktivierung), aber seine Zunahme kann einen bereits stattfindenden tumorigenetischen Prozess nicht aufhalten [39]. Diese Funktion als Tumorsuppressor könnte auch in HNSCC eine Rolle spielen, worauf die reduzierten LOX-mRNA-Level in HNSCC hinweisen. Ein weiterer Beleg zur Unterstützung dieser These ist die negative Korrelation zwischen dem Expressionslevel der LOX-mRNA und dem T- bzw. UICC-Stadium, die eine mögliche Beziehung zwischen Reduktion der LOX-Expression und Zunahme des Tumor-Stadiums andeutet.

4.2.1 Mechanismus der Tumorsuppressor-Aktivität von LO

Bisher wurden verschiedene extra- und intrazelluläre bzw. intranukleäre Mechanismen angeführt, die die tumorsuppressive Funktion von LOX zumindest teilweise erklären könnten. Dass LO nukleäre Funktionen beeinflussen kann, wurde durch die Beobachtung eines weniger dichten Kondensations-Status des Chromatins bestätigt, der direkt durch LOX-Transfektion induziert wurde [93]. Elektrostatische Interaktionen zwischen positiv geladenen Aminosäure-Seitenketten von nukleosomalen Proteinen und Oxyanionen der DNA scheinen einen Einfluss auf die Transkription der DNA zu haben [147]. Aufgrund der intrazellulären bzw. intranukleären Lokalisation und katalytischen Aktivität von LO [26, 85, 97, 146] wurde ein intrazelluläres Substrat angenommen, das ihre Fähigkeit vermitteln könnte, den Zellphänotyp zu kontrollieren [39]. Da die durch LO katalysierte Reaktion in dem Verlust der ϵ -Aminogruppe und folglich der positiven Ladung des Substrat-Lysylrestes resultiert, könnte die Oxidative Desaminierung des Peptidyl-Lysins nukleärer Proteine Regulationsphänomene durch Beeinträchtigung der Interaktionen zwischen Nukleinsäuren und nukleosomalen und möglicherweise auch weiteren intranukleären Proteinen beeinflussen [85]. Die desaminierten Proteine könnten von den Desoxyribonukleo-Protein-Komplexen dissoziieren, was Gen-Transkription erlauben würde [94].

So könnte LO auf der Basis spezifischer Interaktionen mit den Histonen H1 und H2 seine tumorsuppressive Aktivität durch transkriptionale Regulation spezifischer Gene ausüben und möglicherweise über die Steuerung der Phosphorylierung von H1 den Phänotyp kontrollieren [42]. Weiterhin könnten einige der LO-Tumorsuppressor-Aktivitäten möglicherweise durch eine verbesserte *Ku*-abhängige DNA-Reparatur-Aktivität und daher einen stabileren genomischen Status der Zelle erklärt werden. *Ku* supprimiert als „*Caretaker-Gene*“ unter bestimmten Umständen

maligne Transformation [40]. Außerdem könnte LOX die regulierte Expression des antionkogenen Interferon Regulatory Factor (IRF)-1 beeinflussen und dessen biphasisches Expressionsmuster in durch stabile Transfektion mit LOX-cDNA generierten revertierten Zellen wiederherstellen [18]. LOX könnte auch ihren tumorsuppressiven Effekt durch Hemmung von bFGF ausüben, der durch sein mitogenes Potential in Transformationsprozesse involviert ist [86].

Die tumorsuppressiven, antionkogenen Effekte von LOX beruhen möglicherweise auf ihrer Fähigkeit, die durch onkogenes *ras* und andere Onkogene wie *Her2/neu* über den *PI3K/Akt*-Stoffwechselweg bzw. über den *Raf/MEK*-Stoffwechselweg bewirkte Aktivierung von Nukleärem Faktor- κ B (NF- κ B) durch Blockade weiter upstream gelegener Zwischenschritte zu hemmen, was zur Reversion des transformierten Phänotyps führt [60]. Darüber hinaus kann LOX möglicherweise die Transkription durch Blockade des Stoffwechselweges downstream von phosphorylierter und somit aktivierter Extrazellulär regulierter Kinase 2 (Erk2) regulieren, die einen verschmelzenden Schritt in den Signal-Stoffwechselwegen von *ras/MEK1* und *Progesteron* darstellt. Auf diese Weise könnte möglicherweise die LOX-Hemmung *ras*-induzierter Effekte wie Maturation, Mitogenese und Transformation erklärt werden [26].

Daneben gab es Hinweise darauf, dass die Reversion von *ras*-transformierten Zellen und somit die Hemmung *ras*-abhängiger Transformation nicht durch die mature LOX selbst, sondern durch das während der proteolytischen Prozessierung von Pro-LOX entstehende Propeptid von LOX vermittelt wird [101], möglicherweise über die Blockade Fibronectin-vermittelter Zellmigration [155].

4.3 LOX: Anti-Tumor-Funktion

Die ECM stellt eine spezielle Umgebung für die Tumorzell-Expansion dar und spielt eine entscheidende Rolle bei der Zelldifferenzierung und Tumor-Morphogenese [6, 92, 151]. Eine Stromareaktion mit aktivierter Kollagensynthese und erhöhter stromaler LOX-Expression als Reaktion auf Tumorwachstum wurde als Versuch interpretiert, einen Abwehrmechanismus gegen die Proliferation von Tumorzellen aufzubauen, indem eine physikalische Barriere gegenüber der Invasionsfront des Tumors gebildet wird mit limitierter Angiogenese, Zunahme von Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren und dem Potential, das Wachstum von Tumorzellen im Zaum zu halten [82, 124]. Zusätzlich könnte die Aufrechterhaltung der Integrität der ECM der Freisetzung von mitogenen Wachstumsfaktoren vorbeugen [138]. So könnte LOX eine „Anti-Tumor-Funktion“ durch seine Fähigkeit ausüben, die ECM kovalent zu modifizieren. Dadurch könnten Zellen fest in der ECM verankert und deren Bewegung und Expansion eingeschränkt werden, wodurch Expansion verhindert oder sogar angehalten würde [126]. Dem entgegengesetzt kann die stromale Reaktion bei einem Mangel von fibrogenetischen Komponenten wie LOX auch eine Unterstützung bei dem Fortschreiten des Tumorwachstums darstellen mit einer Auflockerung der Matrix durch Proteasen und Angiogenese [82, 106, 107].

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass die LOX-Expression ein wichtiger Schutz-Faktor in der stromalen Reaktion auf bösartige Tumoren ist. Die Entwicklung einer LOX-reichen quervernetzten Matrix in der Umgebung nicht invasiver, weniger maligner Mamma-CAs spiegelt einen möglichen *Host-defense*-Mechanismus wider, während die Stromareaktion der invasiven Karzinome, bei der LOX fehlt, die Tumordispersion begünstigt [107]. Der Nachweis der hochregulierten LOX-Expression bei der stromalen Antwort auf die Präkanzerose Orale Submuköse Fibrose (OSF) und auf SSC der Mundhöhle [142] und die verschiedenen Expressionsmuster von LOX in der stromalen Reaktion auf bronchopulmonale Karzinome (BC) sind weitere Hinweise auf diese „Anti-Tumor-Funktion“ von LOX [106]. Auch in der stromalen Reaktion um invasive Tumorzellen von Basalzellkarzinomen und SCC der Haut, die selbst keine LOX-Expression zeigten, konnte eine Hochregulation der LOX festgestellt werden [11].

Unter der Annahme, dass die untersuchten Gewebeproben von HNSCC nicht nur aus Tumorzellen bestehen, sondern auch noch gesunde Stromazellen des Wirts vorhanden

sind [84], könnte man die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der reduzierten LOX-mRNA-Level in HNSCC-Gewebeproben ebenfalls auf diese Weise interpretieren. Durch verminderte stromale LOX-Expression, möglicherweise bedingt durch onkogene Mediatoren oder auch die Verminderung LOX-synthetisierender Stromazellen, könnte das Entstehen der HNSCC begünstigt oder sogar erst ermöglicht werden. Die stromale Abwehr der Tumorproliferation durch die LOX-Expression war folglich möglicherweise bereits zusammengebrochen.

4.4 Mechanismus der Verminderung der LOX-mRNA-Level

Die Regulation der LOX-Expression spielt sich in einem komplexen Netzwerk aus einer Vielfalt von Mediatoren und Regulationsfaktoren ab. Auf welchen Mechanismen die Verminderung von LOX bei malignem Tumorwachstum bzw. deren Herunterregulation als Tumorsuppressor bei der malignen Transformation beruht, ist noch unklar. Es gibt jedoch verschiedene Ansätze, die eine Erklärungsmöglichkeit für diese Vorgänge bieten und auch bei HNSCC eine Rolle spielen [15, 96].

Die Verminderung der LOX-mRNA-Level konnte größtenteils durch transkriptionale Herunterregulation der LOX erklärt werden, wobei nicht ausgeschlossen werden konnte, dass auch eine Abnahme der mRNA-Stabilität zu niedrigen mRNA- und Enzymaktivitäts-Leveln beitragen kann [50]. Die nach *ras*-Transformation gefundene deutlich reduzierte Menge von LOX-mRNA resultierte jedoch aus einer Hemmung der LOX-Transkription [24], nicht aus Message-Instabilität [21].

Bei dem Mechanismus der Kontrolle der LOX-Genexpression scheint besonders während ihrer *ras*-vermittelten Herunterregulation funktionellen DNA-Sequenz-Elementen innerhalb der LOX-Promotor-Region 5' von Exon 1 (regulative Elemente zwischen -796 und -274; *Ras-Regulatory-Element* [25]) und innerhalb des ersten Introns eine bedeutende Rolle zuzukommen [24]. Verlust oder reduzierte Funktion der LO könnten auch ein direktes Ergebnis von Deletionen und anderen somatischen Mutationen (Intragenetische Alteration, Punktmutation, Rearrangement, Nukleotid-Expansion) während der Tumorentwicklung sein, woraus Veränderungen des LOX-Genlocus bei Chromosom 5q23.1 wie LOH, allelische Imbalance und Vorhandensein neuer Allele resultieren, die ebenfalls im Zusammenhang

mit reduzierter LOX und malignem Tumorwachstum beobachtet und in humanen malignen Neoplasien als Inaktivationsmechanismen für LOX gezeigt wurden [25, 73]. Ein weiterer Mechanismus für die Inaktivierung von Genen, so auch Tumorsuppressor-Genen, ist die Methylierung von CpG-Inseln des Promotors. Diese Promotor-(Hyper-)Methylierung ist dafür bekannt, die Transkriptionsinitiation zu verhindern und dauerhafte Ruhigstellung von downstream gelegenen Genen zu bewirken [21, 73]. Zur Inaktivierung der LOX ist auch eine Kombination dieser verschiedenen Mechanismen denkbar, wie für LOH und Promotor-Methylierung nachgewiesen wurde [73]. Zusätzlich sind posttranskriptionale Regulationsmechanismen möglich [24].

4.4.1 Mechanismus der Transformation im Zusammenhang mit reduzierter LOX

Auch wenn noch nicht genau bekannt ist, wie Veränderungen der LOX-Level zu einem tumorösen Phänotyp führen [25], ist gut vorstellbar, dass LOX-Herunterregulation durch die verschiedenen vorgestellten Mechanismen mit Reduktion seiner tumorsuppressiven Funktion einhergeht und so zur Genese maligner Neoplasien führt. Der Verlust der *ras*-hemmenden Funktion von LOX könnte dabei eine entscheidende Rolle spielen, wobei noch unklar ist, ob die Aktivierung von *p21ras* eine direkte Konsequenz einer von LOX-Abwesenheit abhängigen Deregulation ist, oder ob sie eher ein indirektes Ergebnis der Zelltransformation ist. Weiterhin scheint die Abwesenheit von LOX eine Art Unabhängigkeit von den Wachstumsfaktoren PDGF und IGF-1 festzulegen, was möglicherweise schon alleine für die beobachtete Transformation verantwortlich ist [39, 41]. Außerdem werden durch LOX-Herunterregulation parallele und miteinander verschmolzene Signal-Stoffwechselwege aktiviert: Neben dem klassischen *ras*-Stoffwechselweg werden auch ein atypischer, *MAP*-Kinase unabhängiger *ras*-Stoffwechselweg und der *β-Catenin*-transformierende Stoffwechselweg aktiviert. Erhöhte *β-Catenin*-Level im Zytoplasma und im Nukleus waren von einer Hochregulation von *Cyclin D1* begleitet. Da *ras*-Aktivierung alleine oft nicht ausreicht, um einen transformierten Phänotyp zu bewirken, ist die parallele Aktivierung des *β-Catenin/Cyclin D1*-Stoffwechselweges möglicherweise ein zusätzlicher begünstigender Faktor, der die Zelle mit dem nötigen „Stress“-Stimulus versorgt, wodurch dann eventuell ein transformierter Phänotyp erreicht werden kann [41].

4.5 LOXL2-mRNA-Level in HNSCC

4.5.1 Erniedrigte LOXL2-Expression in Zelllinien

In einem gegenwärtigen Progressions-Modell für HNSCC [13, 96] wurde angenommen, dass Deletionen, die u.a. die chromosomale Region 8p miteinbeziehen, mit invasiven Läsionen assoziiert sein könnten. Die chromosomale Region 8p21, in der sich LOXL2 befindet, ist tatsächlich bei bösartigen Tumoren der Lunge, der Mamma, der Prostata und des Colons minimal deletiert. Weiterhin konnten LOH sowie Mikrosatelliteninstabilität der LOXL2 in Colon- und Ösophagus-CAs mit hoher Frequenz nachgewiesen werden, was mit einem vollständigen oder teilweisen Funktionsverlust von LOXL2 einherging [23, 36]. Schließlich wurde in drei Colon-Tumor-Zelllinien ein kompletter Verlust der LOXL2 beobachtet [36]. Diese Befunde stimmen mit dem reduzierten LOXL2-mRNA-Level in HNSCC-Zelllinien im Vergleich zu Referenz-Zellen überein, wie auch der Verlust der WS9-14-Genexpression in Verbindung mit dem Verlust der Adhäsion verschiedener Tumorzellen [121], der auf eine mögliche Rolle von LOXL2 bei der Entwicklung von Metastasen hinwies. Die Annahme, dass der Verlust der Zelladhäsion mit der Repression der LOXL2-Genexpression zusammenhängt, wurde durch die Analyse der Fibronectin-Expression unterstützt, die eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion spielt. Eine starke Abnahme der Fibronectin-Synthese wurde in denselben Karzinomzellen nachgewiesen, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden [46]. Interessanterweise bestand eine signifikant negative Korrelation zwischen Alter der Patienten und LOXL2-mRNA-Level der zugehörigen HNSCC-Zelllinien: Je älter die Patienten waren, umso geringer war die vorhandene Menge der LOXL2-mRNA. Dieser Befund könnte mit der Beobachtung in Zusammenhang stehen, dass sich hohes Alter negativ auf die Prognose von HNSCC auszuwirken scheint [62].

4.5.2 LOXL2-Expression in Gewebeproben

Das vorliegende Ergebnis bezüglich der LOXL2-mRNA-Level in HNSCC-Gewebeproben in Vergleich zu Referenz-Gewebe weist weder eindeutig in Richtung der verminderten noch der erhöhten LOXL2-Expression in malignen Tumoren. Es sind zwar einige der untersuchten maligne transformierten Gewebeproben vorhanden, deren LOXL2-mRNA-Level niedriger als der Mittelwert der LOXL2-mRNA-Level der Referenz-Gewebe liegen, jedoch besteht im Gesamtvergleich fast kein Unterschied zwischen den LOXL2-mRNA-Leveln von

HNSCC-Gewebeprobe und Referenz-Gewebe. Weiterhin gibt es keine nennenswerten Korrelationen zwischen den mRNA-Leveln von LOXL2 und den Tumorstadien oder dem Grading der HNSCC-Gewebeprobe, die diese Befunde erklären könnten. Es ist allerdings anzunehmen, dass auch LOXL2 unter der Kontrolle verschiedener Zytokine steht [36], deren komplexes Zusammenwirken zu verschiedenen Expressionsleveln der LOXL2 führen könnte.

4.6 LOXL2: Tumorsuppressor- bzw. Anti-Tumor-Funktion

Auch für LOXL2 wurde nahe gelegt, dass es ein neues mutmaßliches Tumorsuppressorgen sei oder zumindest eine wichtige Rolle bei Zellwachstum, Entwicklung und der Pathogenese von Neoplasien spiele [36, 89]. Diese These wird von dem hier erzielten Ergebnis bezüglich der LOXL2-mRNA-Level in HNSCC-Zelllinien unterstützt, das auf einen möglichen Einfluss der LOXL2-Expression auf die Onkogenese in HNSCC hinweist. Die mit LOXL2-Expression einhergehende Verminderung der Wachstumsrate von Tumoren, die sich aus mit LOXL2 transfizierten Mamma-CA-Zellen entwickelten [1] ist ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Funktion von LOXL2 als Tumorsuppressor.

Auch eine der LOX-Expression von Stromazellen als Tumorabwehr analoge Funktion der LOXL2 wurde angedeutet. So ist es denkbar, dass normale, LOXL2-produzierende Zellen einen hemmenden Einfluss auf die Invasivität von malignen Tumoren haben könnten, indem sie die Kollagensynthese von benachbarten Stromazellen induzieren und somit Fibrosierung zur Stabilisierung der ECM fördern könnten. Dabei induziert LOXL2 möglicherweise als Signalmolekül über einen parakrinen Mechanismus die Kollagensynthese in Stromazellen [1].

4.7 Erhöhte Expression von LOX und LOXL2

Gegenüber der verminderten Expression von LOX und LOXL2 bei maligner Neoplasie liegen verschiedene Berichte vor, die für einen Zusammenhang zwischen maligner Transformation und erhöhten Expressionsleveln von LOX und LOXL2 sprechen.

So wurde die Hochregulation von LOX mit invasivem Potential bei Zelllinien von humanem Mamma-CA, Melanom und Prostata-CA der Ratte [76, 111] und mit höherem Staging für Zelllinien und Gewebeproben von Nierenzell-CAs (RCC) assoziiert [132]. Auch Magen-CAs ohne methylierte LOX, in denen LOX aktiv war, neigten im Vergleich mit normalen Proben dazu, LOX zu überexprimieren [73]. Weiterhin schien LOX-Expression für die Bildung der so genannten „Prämetastatischen Nische“ von Bedeutung zu sein, die nachfolgende Metastasierung begünstigte [29].

Ein ähnlicher Trend der Hochregulation zeigte sich für LOXL2 bei hoch invasiven/metastasierenden Mamma-CA-Zellen und hoch invasiven, aggressiven uvealen Melanom-Zelllinien [76]. Weiterhin konnte beim Mamma-CA eine signifikante Assoziation zwischen LOXL2-Expression und dem Tumorgrad gezeigt werden: LOXL2 fördert die Tumor-Progression und verstärkt die Invasivität von Tumoren [1]. Außerdem zeigte sich eine erhöhte LOXL2-Expression in Colon- und Ösophagus-CAs und eine Assoziation dieser erhöhten LOXL2-Expression mit weniger differenzierten Colon-Tumoren [35]. Schließlich wurde erhöhte LOXL2-Expression mit Tumorprogression [104], Auftreten von Rezidiven und verminderter Überlebensrate bei verschiedenen Plattenepithelkarzinomen assoziiert [105].

Der Befund, dass die Hochregulation der LOX-mRNA-Expression und zu einem geringeren Anteil auch der LOXL2-mRNA-Expression mit einem invasiven Phänotyp in verschiedenen bösartigen Tumor-Zell-Typen bzw. weniger differenzierten Tumoren assoziiert ist, kann in dieser Arbeit für HNSCC nicht bestätigt werden. Zwischen dem LOX-mRNA-Level und dem T-Stadium von HNSCC-Zelllinien besteht eine nicht signifikante negative Korrelation, zwischen dem LOXL2-mRNA-Level und dem Staging bzw. Grading besteht sowohl bei HNSCC-Zelllinien als auch -Gewebeproben überhaupt keine nennenswerte Korrelation.

4.8 Erklärung konträrer Ergebnisse

Für diese unterschiedlichen und auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse der einerseits verminderten und andererseits erhöhten LOX- bzw. LOXL2-mRNA-Expression im Zusammenhang mit malignen Neoplasien [103] wurden verschiedene Erklärungsmöglichkeiten mit dem Versuch in Erwägung gezogen, die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse schlüssig zu vereinen. So könnten die unterschiedlichen Berichte über die Ausprägung der LOX- und LOXL2-mRNA-Level und deren Funktion bei malignen Neoplasien durch Unterschiede zwischen den jeweils untersuchten Zelltypen bezüglich Ursprung (Mesoderm, Ektoderm, Entoderm), Phänotyp und Differenzierungsgrad bedingt sein. In diesem Zusammenhang könnten Staging und Grading der entsprechenden Neoplasie eine wichtige Rolle spielen [76]. Der Grad der Gen-Expression und deren Konsequenzen könnten sich weiterhin je nach intra- bzw. extrazellulären Kontext unterscheiden. So hängen sie möglicherweise von den umgebenden stromalen Zellen mit ihrer Kollagenproduktion und somit der ECM ab [1, 76]. Zusätzlich könnte nicht nur die absolute Gen-Expression, sondern viel mehr die relative Expression von LOX und LOXL2 im Verhältnis zum normalen Ausgangsexpressionslevel der jeweils betrachteten Zelle für die Zunahme maligner Eigenschaften von Bedeutung sein [76]. Eine Überexpression von Tumorsuppressor-Genen im Zusammenhang mit malignem Tumorwachstum wäre auch denkbar, um der schnellen Proliferation von bösartigen Tumorzellen, in denen die Tumorsuppressor-Gene noch funktionieren, entgegenzuwirken [73]. Umgekehrt könnte die durch LOX- bzw. LOXL2-Expression induzierte exzessive Ablagerung von ECM-Proteinen die Expression von Matrix-abbauenden Enzymen stimulieren, die folglich lokale inhibitorische Effekte der abgelagerten ECM überwinden könnten, was die Invasivität verstärken würde [1]. – Die Unterschiede der berichteten Expressionslevel könnten auch durch methodologische Gesichtspunkte erklärt werden. So führen unterschiedliche Versuchsanordnungen mit den jeweiligen Nachweis-Methoden der Gen-Expression möglicherweise zu verschiedenen Ergebnissen. Weiterhin sollte beim Vergleich unterschiedlicher Ergebnisse auch genau darauf geachtet werden, auf welches Ausgangsmaterial sie sich beziehen und wie differenziert sie sind: Handelt es sich z.B. bei Ergebnissen bezüglich Tumorgewebe um reines Tumorgewebe, das nur aus Tumorzellen besteht, oder sind die den Tumor umgebenden Stromazellen bzw. die peritumorale ECM gemeint, oder möglicherweise eine Mischung daraus?

4.9 Vergleich der Lysyl Oxidasen

Die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Bedeutung des tumorsuppressiven Charakters von LOX und LOXL2 auch bei HNSCC-Tumoren. Die intra- und extrazelluläre Lokalisation von LOXL2 und seine extensive C-terminale Homologie bezüglich der Sequenz und Genstruktur mit LOX führte zu der Annahme, dass LOXL2 für einige der Funktionen verantwortlich sein könnte, die vorher LOX zugeschrieben wurden [65]. Diese These wird durch die Befunde unterstützt, dass LOXL2 in Zellwachstum und Entwicklung, Zelldifferenzierung, und die Pathogenese von Neoplasien involviert sein könnte [36, 121]. Dabei spricht die unterschiedliche Zell- und Gewebe-Verteilung von LOX und LOXL2 auch dafür, dass die beiden entsprechenden Enzyme ihre Funktionen zumindest teilweise räumlich und zeitlich verschieden voneinander erfüllen [94]. Die in der vorliegenden Studie signifikanten Korrelationen der mRNA-Level von LOX und LOXL2 in HNSCC-Zelllinien und -Gewebebeurteilungen deuten ebenfalls darauf hin, dass diese beiden Enzyme auch bei HNSCC ähnliche Funktionen erfüllen könnten. Diese Annahme wird durch die ähnlichen mRNA-Expressions-Muster von LOX and LOXL2 bei den untersuchten Zelllinien unterstützt. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich ihre mRNA-Expressions-Muster bei den Gewebebeurteilungen, was möglicherweise eine ergänzende Rolle von LOXL2 in Bezug zu LOX in HNSCC anzeigt.

Die tumorsuppressive Funktion von LOX spielt sich in einem komplizierten Netzwerk einer Vielfalt von Mediatoren und Regulationsfaktoren ab, und auch LOXL2 steht wahrscheinlich unter der Kontrolle verschiedener Zytokine. Die unterschiedlichen mRNA-Level der zwei untersuchten Gene in den jeweiligen HNSCC-Proben müssen unter diesem Aspekt gesehen werden. Dabei scheint LOX im Vergleich zu LOXL2 eine größere Rolle als Tumorsuppressor zu spielen. LOXL2 könnte zwar einige Funktionen von LOX teilen, sie aber nicht komplett ersetzen. Die zwei verwandten Gene scheinen viel eher auf eine sich ergänzende Art zu agieren. Die Herunterregulation der LOXL und LOXL4 in malignen Geweben könnte eine ähnliche Rolle dieser LOX-Familienmitglieder bei der Tumorsuppression andeuten [40, 109, 152]. Für komplementäre Funktionen der einzelnen verwandten LOX-Enzyme [23] spricht auch die Beobachtung, dass Osteosarkom-Zellen, die nur geringe Mengen der LOX-mRNA aufwiesen, relativ hohe LOX-Enzymaktivität zeigten. So exprimieren diese Zellen möglicherweise andere, der LOX homologe Gen-Produkte, die zu der beobachteten

LOX-Aktivität führen. Dafür kämen natürlich an erster Stelle die LOX-like Gene in Frage [144].

Beim Mamma-CA zeigen LOX und LOXL2 ebenfalls interessante, einander entgegengesetzte Expressionsmuster: Während beim in-situ-CA die Tumorzellen selbst keine LOX-, wohl aber LOXL2-Expression zeigen [1, 76, 107], ist in der stromalen Reaktion auf das in-situ-CA hingegen eine deutliche LOX-, jedoch keine LOXL2-Expression nachweisbar [1, 107]. Im Stroma hochmaligner, invasiver Karzinome ist kaum noch LOX vorhanden [107], die Tumorzellen selbst produzieren allerdings deutliche Mengen von LOX und LOXL2 [1, 76]. Auch bei weiteren Malignomen wurde im Zusammenhang mit verstärkter Invasivität und Tumorprogression eine erhöhte Expression von LOX [29, 73, 132], LOXL2 [35, 76, 105], LOXL, LOXL3 und LOXL4 beobachtet [54, 76, 104]. So scheint die Expression der LOX-like Gene in humanen Geweben durch ein komplexes Expressionsmuster und eine große Variation in den mRNA-Leveln gekennzeichnet zu sein. Dafür sprechen weiterhin die differenziellen Expressionsprofile von LOXL2, LOXL3 und LOXL4 in Tumoren, welche die serösen Höhlen miteinbeziehen [125].

Während LOX und LOXL in den meisten Geweben exprimiert sind, ist die Expression von LOXL2, LOXL3 und LOXL4 restriktiver [94]. Die genauere Untersuchung individueller Funktionen einzelner LOL-Proteine kann möglicherweise in *Drosophila* erfolgen. Hier sind nur zwei LOL-Proteine vorhanden, die örtlich und zeitlich unterschiedlich exprimiert werden [94, 95]. Zusätzlich wurden zur detaillierten Charakterisierung der LOX eine rekombinante Form der *Drosophila*-LOX (rDmLOXL-1) entwickelt [10] bzw. reine und aktive Formen von LOX (LOX-p) und LOXL (LOXL-p1, LOXL-p2) synthetisiert [66], deren Verfügbarkeit bei der Aufklärung der spezifischen Funktionen dieser Enzyme sehr hilfreich sein kann.

Während in HNSCC die mRNA-Level von LOX und LOXL2 nicht erhöht waren, zeigte sich eine Überexpression von LOXL4 [54]. So scheint das Wachstum hoch proliferativer HNSCC-Zellen mit der Überexpression von LOXL4 assoziiert zu sein [47]. Die Funktionen von LOX und LOXL2 bei den hier untersuchten HNSCC-Tumoren scheinen sich zu überlappen, während die Expression von LOXL4 möglicherweise eine entgegengesetzte Rolle spielt. So könnte aus den Einzelwerten der

jeweiligen Gen-Expressionen oder aus dem Expressionsmuster von LOX, LOXL2 und LOXL4 auf den Malignitätsgrad eines HNSCC bzw. auch anderer maligner Tumoren geschlossen werden, was einen zukünftigen diagnostischen, prognostischen oder auch therapeutischen Ansatzpunkt bieten könnte [118, 149].

5 Zusammenfassung

Angeregt durch Berichte über eine verminderte Expression der Lysyl Oxidase (LOX) in verschiedenen Malignomen und die angedeutete Möglichkeit, dass die verwandte Lysyl Oxidase Like 2 (LOXL2) der LOX vergleichbare Funktionen erfüllen könnte, wurde die Menge an LOX- und LOXL2-mRNA in Zelllinien und Gewebebiopsien aus Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes (HNSCC) mittels Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht.

Die mRNA-Level von LOX in HNSCC-Zellen und -Gewebe zeigten sich im Vergleich zu normalen Kontrollen reduziert. Weiterhin war eine Verminderung von LOXL2-mRNA in Karzinom-Zellen nachweisbar. In den untersuchten HNSCC-Gewebeproben hingegen war die Menge an LOXL2-mRNA kaum geringer als in den entsprechenden normalen Referenzproben. Die erzielten Ergebnisse unterstützen daher den schon in früheren Studien vermuteten tumorsuppressiven Charakter von LOX und LOXL2. Damit wird eine mögliche Tumorsuppressor-Funktion oder auch eine „Anti-Tumor-Funktion“ von LOX und LOXL2 zum ersten Mal auch bei HNSCC-Tumoren aufgezeigt. Diese Ergebnisse wurden bereits an einer kleineren Stichprobenzahl in Auszügen veröffentlicht. Eine Invasivitäts-fördernde Funktion von LOX- und LOXL2 konnte für HNSCC nicht gezeigt werden. Auch wenn die Unterschiede zwischen den mRNA-Leveln von LOX und LOXL2 in HNSCC- verglichen mit den Referenz-Proben nicht signifikant waren, zeigte sich doch eine Trend zu einer verminderten Expression von LOX und LOXL2 in HNSCC-Tumoren. Ob die beobachteten Effekte der Verminderung der entsprechenden mRNA-Level in HNSCC- gegenüber den Referenz-Proben generell gültig sind, ist in weiteren Studien anhand größerer Stichproben (siehe Poweranalysen bzw. Fallzahlbestimmungen) und mittels weiterer Methoden wie z.B. Western-Blot-Analyse zu überprüfen. Hierbei ist insbesondere auch die Frage zu klären, ob die nachgewiesenen mRNA-Level mit der entsprechenden Proteinexpression in Zellen und Gewebe korrelieren.

Die zugrunde liegende Ursache für die Herunterregulation oder den Verlust von LOX und LOXL2 bei maligner Transformation bzw. deren Überexpression bei progressivem Tumorwachstum ist bisher nur unzureichend geklärt und nur zu einem geringen Anteil

verstanden. Weiterführende Untersuchungen bezüglich der molekularen Basis, der Regulation und des Expressionsmusters von LOX und LOXL2 bei HNSCC sind nötig, um ihre mögliche tumorsuppressive Rolle bei HNSCC genauer einschätzen zu können.

LOX und LOXL2 könnten mögliche *Kandidatengene* darstellen, deren jeweiliger Expressionsgrad bzw. spezifische Expressionsmuster eventuell auch in Kombination mit dem Expressionsmuster anderer LOXLs von diagnostischer, prognostischer oder auch therapeutischer Bedeutung für Patienten mit HNSCC-Tumoren sein könnten. Beide Gene, LOX und LOXL2, sollten als potentielle Tumorsuppressor-Gene oder zumindest als Komponenten eines tumorsuppressiven Stoffwechselweges bei HNSCC-Tumoren angesehen werden und könnten möglicherweise als Angriffspunkt für neue molekulartherapeutische Konzepte dienen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Akiri, G., Sabo, E., Dafni, H., Vadasz, Z., Kartvelishvily, Y., Gan, N., Kessler, O., Cohen, T., Resnick, M., Neeman, M., Neufeld, G. (2003): Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. *Cancer Res.* 63, 1657-1666.
- 2 Al-Sarraf, M. (2002): Treatment of locally advanced head and neck cancer: historical and critical review. *Cancer Control.* 9, 387-399.
- 3 Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- 4 Asuncion, L., Fogelgren, B., Fong, K. S., Fong, S. F., Kim, Y., Csiszar, K. (2001): A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain. *Matrix Biol.* 20, 487-491.
- 5 Atsawasuwan, P., Mochida, Y., Katafuchi, M., Kaku, M., Fong, K. S., Csiszar, K., Yamauchi, M. (2008): Lysyl oxidase binds transforming growth factor-beta and regulates its signaling via amine oxidase activity. *J.Biol.Chem.* 283, 34229-34240.
- 6 Attard, F. A., Contente, S., Yeh, T. J., Buchhagen, D. L., Friedman, R. M. (2005): Mechanisms of deregulation of IFN regulatory factor-1 in ras-transformed fibroblasts. *J.Interferon Cytokine Res.* 25, 418-423.
- 7 Biolchini, F., Pollastri, G., Figurelli, S., Chiarini, L. (2005): Carcinogen metabolism, DNA damage repair and oral head and neck squamocellular carcinoma (HNSCC). A review. *Minerva Stomatol.* 54, 405-414.
- 8 Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland. Telefonische Information, 16.05.08.
- 9 Bockmühl, U., Schwendel, A., Dietel, M., Petersen, I. (1996): Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 56, 5325-5329.

- 10 Bollinger, J. A., Brown, D. E., Dooley, D. M. (2005): The Formation of lysine tyrosylquinone (LTQ) is a self-processing reaction. Expression and characterization of a Drosophila lysyl oxidase. *Biochemistry*. 44, 11708-11714.
- 11 Bouez, C., Reynaud, C., Noblesse, E., Thepot, A., Gleyzal, C., Kanitakis, J., Perrier, E., Damour, O., Sommer, P. (2006): The lysyl oxidase LOX is absent in basal and squamous cell carcinomas and its knockdown induces an invading phenotype in a skin equivalent model. *Clin.Cancer Res*. 12, 1463-1469.
- 12 Boyd, C. D., Mariani, T. J., Kim, Y., Csiszar, K. (1995): The size heterogeneity of human lysyl oxidase mRNA is due to alternate polyadenylation site and not alternate exon usage. *Mol.Biol.Rep*. 21, 95-103.
- 13 Califano, J., van der Riet P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W., Sidransky, D. (1996): Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 56, 2488-2492.
- 14 Casey, M. L., MacDonald, P. C. (1997): Lysyl oxidase (ras recision gene) expression in human amnion: ontogeny and cellular localization. *J.Clin.Endocrinol.Metab*. 82, 167-172.
- 15 Choi, P., Chen, C. (2005): Genetic expression profiles and biologic pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 104, 1113-1128.
- 16 Choudhary, B., Zhou, J., Li, P., Thomas, S., Kaartinen, V., Sucov, H. M. (2009): Absence of TGFbeta signaling in embryonic vascular smooth muscle leads to reduced lysyl oxidase expression, impaired elastogenesis, and aneurysm. *Genesis*. 47, 115-121.
- 17 Cohen, J. (1994): The earth is round ($p < .05$). *American Psychologist* 49, 997-1003.
- 18 Contente, S., Attard, F. A., Yeh, T. J., Buchhagen, D. L., Friedman, R. M. (2003): Deregulated expression of interferon regulatory factor-1 in oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J.Interferon Cytokine Res*. 23, 639-647.

- 19 Contente, S., Csiszar, K., Kenyon, K., Friedman, R. M. (1993): Structure of the mouse lysyl oxidase gene. *Genomics*. 16, 395-400.
- 20 Contente, S., Kenyon, K., Rimoldi, D., Friedman, R. M. (1990): Expression of gene *rrg* is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-H-ras. *Science*. 249, 796-798.
- 21 Contente, S., Kenyon, K., Sriraman, P., Subramanyan, S., Friedman, R. M. (1999): Epigenetic inhibition of lysyl oxidase transcription after transformation by *ras* oncogene. *Mol.Cell Biochem*. 194, 79-91.
- 22 Cronshaw, A. D., Fothergill-Gilmore, L. A., Hulmes, D. J. (1995): The proteolytic processing site of the precursor of lysyl oxidase. *Biochem.J*. 306, 279-284.
- 23 Csiszar, K. (2001): Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol*. 70, 1-32.
- 24 Csiszar, K., Entersz, I., Trackman, P. C., Samid, D., Boyd, C. D. (1996): Functional analysis of the promoter and first intron of the human lysyl oxidase gene. *Mol.Biol.Rep*. 23, 97-108.
- 25 Csiszar, K., Fong, S. F., Ujfalusi, A., Krawetz, S. A., Salvati, E. P., Mackenzie, J. W., Boyd, C. D. (2002): Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors. *Int.J.Cancer*. 97, 636-642.
- 26 Di Donato, A., Lacal, J. C., Di Duca, M., Giampuzzi, M., Ghiggeri, G., Gusmano, R. (1997): Micro-injection of recombinant lysyl oxidase blocks oncogenic p21-Ha-Ras and progesterone effects on *Xenopus laevis* oocyte maturation. *FEBS Lett*. 419, 63-68.
- 27 Dimery, I. W., Hong, W. K. (1993): Overview of combined modality therapies for head and neck cancer. *J.Natl.Cancer Inst*. 85, 95-111.
- 28 El Naggar, A. K., Kim, H. W., Clayman, G. L., Coombes, M. M., Le, B., Lai, S., Zhan, F., Luna, M. A., Hong, W. K., Lee, J. J. (2002): Differential expression profiling of head and neck squamous carcinoma: significance in their phenotypic and biological classification. *Oncogene*. 21, 8206-8219.

- 29 Erler, J. T., Bennewith, K. L., Cox, T. R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q. T., Giaccia, A. J. (2009): Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*. 15, 35-44.
- 30 Erler, J. T., Bennewith, K. L., Nicolau, M., Dornhofer, N., Kong, C., Le, Q. T., Chi, J. T., Jeffrey, S. S., Giaccia, A. J. (2006): Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*. 440, 1222-1226.
- 31 Fan, C. Y. (2001): Genetic alterations in head and neck cancer: interactions among environmental carcinogens, cell cycle control, and host DNA repair. *Curr.Oncol.Rep.* 3, 66-71.
- 32 Faul, F., Erdfelder, E. (1992): GPOWER: A priori-, post hoc-, and compromise power analyses for MS-DOS [computer program]. Bonn, Germany: Bonn University.
- 33 Feres-Filho, E. J., Menassa, G. B., Trackman, P. C. (1996): Regulation of lysyl oxidase by basic fibroblast growth factor in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J.Biol.Chem* 271, 6411-6416.
- 34 Fogelgren, B., Polgar, N., Szauter, K. M., Ujfaludi, Z., Laczko, R., Fong, K. S., Csiszar, K. (2005): Cellular fibronectin binds to lysyl oxidase with high affinity and is critical for its proteolytic activation. *J.Biol.Chem.* 280, 24690-24697.
- 35 Fong, S. F., Dietzsch, E., Fong, K. S., Hollosi, P., Asuncion, L., He, Q., Parker, M. I., Csiszar, K. (2007): Lysyl oxidase-like 2 expression is increased in colon and esophageal tumors and associated with less differentiated colon tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 46, 644-655.
- 36 Fong, S. F. T., Mink, M., Hinek, A., Asuncion, L., Song, J., Saux, C. J., Fong, K. S. K., Csiszar, K. (2000): Functional studies of LOXL2, a new putative tumor suppressor gene, in humans and drosophila. *American Association for Cancer Research 91st annual meeting* 41, 746.
- 37 Gacheru, S. N., Trackman, P. C., Shah, M. A., O'Gara, C. Y., Spacciapoli, P., Greenaway, F. T., Kagan, H. M. (1990): Structural and catalytic properties of copper in lysyl oxidase. *J.Biol.Chem.* 265, 19022-19027.

- 38 Genden, E. M., Ferlito, A., Bradley, P. J., Rinaldo, A., Scully, C. (2003): Neck disease and distant metastases. *Oral Oncol.* 39, 207-212.
- 39 Giampuzzi, M., Botti, G., Cilli, M., Gusmano, R., Borel, A., Sommer, P., Di Donato, A. (2001): Down-regulation of lysyl oxidase-induced tumorigenic transformation in NRK-49F cells characterized by constitutive activation of ras proto-oncogene. *J.Biol.Chem.* 276, 29226-29232.
- 40 Giampuzzi, M., Botti, G., Di Duca, M., Arata, L., Ghiggeri, G., Gusmano, R., Ravazzolo, R., Di Donato, A. (2000): Lysyl oxidase activates the transcription activity of human collagene III promoter. Possible involvement of Ku antigen. *J.Biol.Chem.* 275, 36341-36349.
- 41 Giampuzzi, M., Oleggini, R., Di Donato, A. (2003): Altered adhesion features and signal transduction in NRK-49F cells transformed by down-regulation of lysyl oxidase. *Biochim.Biophys.Acta.* 1647, 239-244.
- 42 Giampuzzi, M., Oleggini, R., Di Donato, A. (2003): Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: definition of the regions involved. *Biochim.Biophys.Acta.* 1647, 245-251.
- 43 Ginos, M. A., Page, G. P., Michalowicz, B. S., Patel, K. J., Volker, S. E., Pambuccian, S. E., Ondrey, F. G., Adams, G. L., Gaffney, P. M. (2004): Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 64, 55-63.
- 44 Gonzalez, H. E., Gujrati, M., Frederick, M., Henderson, Y., Arumugam, J., Spring, P. W., Mitsudo, K., Kim, H. W., Clayman, G. L. (2003): Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 129, 754-759.
- 45 Görögh, T., Beier, U. H., Baumken, J., Meyer, J. E., Hoffmann, M., Gottschlich, S., Maune, S. (2006): Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.* 28, 31-39.

- 46 Görögh, T., Maune, S., Lippert, B. M., Rudert, H., Gottschlich, S., Hoffmann, M., Meyer, J., Heidorn, K., Werner, J. A. (2001): Transcriptional repression of the human fibronectin gene in laryngeal squamous cell carcinoma cells. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 127, 166-172.
- 47 Görögh, T., Weise, J. B., Holtmeier, C., Rudolph, P., Hedderich, J., Gottschlich, S., Hoffmann, M., Ambrosch, P., Csiszar, K. (2007): Selective upregulation and amplification of the lysyl oxidase like-4 (LOXL4) gene in head and neck squamous cell carcinoma. *J.Pathol.* 212, 74-82.
- 48 Hajnal, A., Klemenz, R., Schafer, R. (1993): Up-regulation of lysyl oxidase in spontaneous revertants of H-ras-transformed rat fibroblasts. *Cancer Res.* 53, 4670-4675.
- 49 Hämäläinen, E. R., Jones, T. A., Sheer, D., Taskinen, K., Pihlajaniemi, T., Kivirikko, K. I. (1991): Molecular cloning of human lysyl oxidase and assignment of the gene to chromosome 5q23.3-31.2. *Genomics.* 11, 508-516.
- 50 Hämäläinen, E. R., Kemppainen, R., Kuivaniemi, H., Tromp, G., Vaheri, A., Pihlajaniemi, T., Kivirikko, K. I. (1995): Quantitative polymerase chain reaction of lysyl oxidase mRNA in malignantly transformed human cell lines demonstrates that their low lysyl oxidase activity is due to low quantities of its mRNA and low levels of transcription of the respective gene. *J.Biol.Chem.* 270, 21590-21593.
- 51 Hämäläinen, E. R., Kemppainen, R., Pihlajaniemi, T., Kivirikko, K. I. (1993): Structure of the human lysyl oxidase gene. *Genomics.* 17, 544-548.
- 52 He, J., Tang, H. J., Wang, Y. Y., Xiong, M. H., Zhou, F., Shao, K., Li, T. P. (2002): [Expression of lysyl oxidase gene in upper digestive tract carcinomas and its clinical significance]. *Ai.Zheng.* 21, 671-674.
- 53 Hein, S., Yamamoto, S. Y., Okazaki, K., Jourdan-LeSaux, C., Csiszar, K., Bryant-Greenwood, G. D. (2001): Lysyl oxidases: expression in the fetal membranes and placenta. *Placenta.* 22, 49-57.

- 54 Holtmeier, C., Görögh, T., Beier, U., Meyer, J., Hoffmann, M., Gottschlich, S., Heidorn, K., Ambrosch, P., Maune, S. (2003): Overexpression of a novel lysyl oxidase-like gene in human head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 23, 2585-2591.
- 55 Hornstra, I. K., Birge, S., Starcher, B., Bailey, A. J., Mecham, R. P., Shapiro, S. D. (2003): Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *J.Biol.Chem.* 278, 14387-14393.
- 56 Hsiung, D. T., Marsit, C. J., Houseman, E. A., Eddy, K., Furniss, C. S., McClean, M. D., Kelsey, K. T. (2007): Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 16, 108-114.
- 57 Hu, Y. C., Sidransky, D., Ahrendt, S. A. (2002): Molecular detection approaches for smoking associated tumors. *Oncogene.* 21, 7289-7297.
- 58 Ito, H., Akiyama, H., Iguchi, H., Iyama, K., Miyamoto, M., Ohsawa, K., Nakamura, T. (2001): Molecular cloning and biological activity of a novel lysyl oxidase-related gene expressed in cartilage. *J.Biol.Chem.* 276, 24023-24029.
- 59 Jacobs, B. (2005): Klassische Effektstärkeberechnung. www.phil.unisb.de/~jakobs/seminar/vpl/bedeutung/effektstaerketool.htm. Zugriff am 18.05.08.
- 60 Jeay, S., Pianetti, S., Kagan, H. M., Sonenshein, G. E. (2003): Lysyl oxidase inhibits ras-mediated transformation by preventing activation of NF-kappa B. *Mol.Cell Biol.* 23, 2251-2263.
- 61 Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M. J. (2008): Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J.Clin.* 58, 71-96.
- 62 Jones, A. S., Beasley, N., Houghton, D., Husband, D. J. (1998): The effects of age on survival and other parameters in squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx and larynx. *Clin.Otolaryngol.Allied Sci.* 23, 51-56.

- 63 Jourdan-Le Saux, C., Le Saux, O., Donlon, T., Boyd, C. D., Csiszar, K. (1998): The human lysyl oxidase-related gene (LOXL2) maps between markers D8S280 and D8S278 on chromosome 8p21.2-p21.3. *Genomics*. 51, 305-307.
- 64 Jourdan-Le, Saux C., Le Saux, O., Gleyzal, C., Sommer, P., Csiszar, K. (2000): The mouse lysyl oxidase-like 2 gene (mLOXL2) maps to chromosome 14 and is highly expressed in skin, lung and thymus. *Matrix Biol.* 19, 179-183.
- 65 Jourdan-Le Saux, C., Tronecker, H., Bogic, L., Bryant-Greenwood, G. D., Boyd, C. D., Csiszar, K. (1999): The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues. *J.Biol.Chem.* 274, 12939-12944.
- 66 Jung, S. T., Kim, M. S., Seo, J. Y., Kim, H. C., Kim, Y. (2003): Purification of enzymatically active human lysyl oxidase and lysyl oxidase-like protein from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expr.Purif.* 31, 240-246.
- 67 Kagan, H. M. (1986): Characterization and regulation of lysyl oxidase. In: *Regulation of Matrix Accumulation*, Vol. 1, 321-398 (R.P. Mecham, Hrsg.). Academic Press, Orlando, FL.
- 68 Kagan, H. M., Sullivan, K. A., Olsson, T. A., III, Cronlund, A. L. (1979): Purification and properties of four species of lysyl oxidase from bovine aorta. *Biochem.J.* 177, 203-214.
- 69 Kagan, H. M., Trackman, P. C. (1991): Properties and function of lysyl oxidase. *Am.J.Respir. Cell Mol.Biol.* 5, 206-210.
- 70 Kagan, H. M., Tseng, L., Trackman, P. C., Okamoto, K., Rapaka, R. S., Urry, D. W. (1980): Repeat polypeptide models of elastin as substrates for lysyl oxidase. *J.Biol.Chem.* 255, 3656-3659.
- 71 Kagan, H. M., Williams, M. A., Calaman, S. D., Berkowitz, E. M. (1983): Histone H1 is a substrate for lysyl oxidase and contains endogenous sodium borotritide-reducible residues. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 115, 186-192.

- 72 Kagan, H. M., Williams, M. A., Williamson, P. R., Anderson, J. M. (1984): Influence of sequence and charge on the specificity of lysyl oxidase toward protein and synthetic peptide substrates. *J.Biol.Chem.* 259, 11203-11207.
- 73 Kaneda, A., Wakazono, K., Tsukamoto, T., Watanabe, N., Yagi, Y., Tatematsu, M., Kaminishi, M., Sugimura, T., Ushijima, T. (2004): Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res.* 64, 6410-6415.
- 74 Kenyon, K., Contente, S., Trackman, P. C., Tang, J., Kagan, H. M., Friedman, R. M. (1991): Lysyl oxidase and rrg messenger RNA. *Science.* 253, 802.
- 75 Kim, Y., Boyd, C. D., Csiszar, K. (1995): A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. *J.Biol.Chem.* 270, 7176-7182.
- 76 Kirschmann, D. A., Seftor, E. A., Fong, S. F., Nieva, D. R., Sullivan, C. M., Edwards, E. M., Sommer, P., Csiszar, K., Hendrix, M. J. (2002): A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res.* 62, 4478-4483.
- 77 Kobayashi, H., Ishii, M., Chanoki, M., Yashiro, N., Fushida, H., Fukai, K., Kono, T., Hamada, T., Wakasaki, H., Ooshima, A. (1994): Immunohistochemical localization of lysyl oxidase in normal human skin. *Br.J.Dermatol.* 131, 325-330.
- 78 Krebs, C. J., Krawetz, S. A. (1993): Lysyl oxidase copper-talon complex: a model. *Biochim.Biophys.Acta.* 1202, 7-12.
- 79 Krzyzosiak, W. J., Shindo-Okada, N., Teshima, H., Nakajima, K., Nishimura, S. (1992): Isolation of genes specifically expressed in flat revertant cells derived from activated ras-transformed NIH 3T3 cells by treatment with azatyrosine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89, 4879-4883.
- 80 Kuivaniemi, H., Korhonen, R. M., Vaheri, A., Kivirikko, K. I. (1986): Deficient production of lysyl oxidase in cultures of malignantly transformed human cells. *FEBS Lett.* 195, 261-264.

- 81 Kuivaniemi, H., Savolainen, E. R., Kivirikko, K. I. (1984): Human placental lysyl oxidase. Purification, partial characterization, and preparation of two specific antisera to the enzyme. *J.Biol.Chem.* 259, 6996-7002.
- 82 Lagacé, R., Grimaud, J. A., Schurch, W., Seemayer, T. A. (1985): Myofibroblastic stromal reaction in carcinoma of the breast: variations of collagenous matrix and structural glycoproteins. *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histopathol.* 408, 49-59.
- 83 Le, Q. T., Kong, C., Lavori, P. W., O'byrne, K., Erler, J. T., Huang, X., Chen, Y., Cao, H., Tibshirani, R., Denko, N., Giaccia, A. J., Koong, A. C. (2007): Expression and prognostic significance of a panel of tissue hypoxia markers in head-and-neck squamous cell carcinomas. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 69, 167-175.
- 84 Leethanakul, C., Patel, V., Gillespie, J., Pallente, M., Ensley, J. F., Koontongkaew, S., Liotta, L. A., Emmert-Buck, M., Gutkind, J. S. (2000): Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. *Oncogene.* 19, 3220-3224.
- 85 Li, W., Nellaiappan, K., Strassmaier, T., Graham, L., Thomas, K. M., Kagan, H. M. (1997): Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 12817-12822.
- 86 Li, W., Nugent, M. A., Zhao, Y., Chau, A. N., Li, S. J., Chou, I. N., Liu, G., Kagan, H. M. (2003): Lysyl oxidase oxidizes basic fibroblast growth factor and inactivates its mitogenic potential. *J.Cell Biochem.* 88, 152-164.
- 87 Li, W., Liu, G., Chou, I. N., Kagan, H. M. (2000): Hydrogen peroxide-mediated, lysyl oxidase-dependent chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J.Cell Biochem.* 78, 550-557.
- 88 Lopez, B., Querejeta, R., Gonzalez, A., Beaumont, J., Larman, M., Diez, J. (2009): Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure. *Hypertension.* 53, 236-242.

- 89 Maki, J. M., Kivirikko, K. I. (2001): Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme. *Biochem.J.* 355, 381-387.
- 90 Mandic, R., Schamberger, C. J., Muller, J. F., Geyer, M., Zhu, L., Carey, T. E., Grenman, R., Dünne, A. A., Werner, J. A. (2005): Reduced cisplatin sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma cell lines correlates with mutations affecting the COOH-terminal nuclear localization signal of p53. *Clin.Cancer Res.* 11, 6845-6852.
- 91 Mariani, T. J., Trackman, P. C., Kagan, H. M., Eddy, R. L., Shows, T. B., Boyd, C. D., Deak, S. B. (1992): The complete derived amino acid sequence of human lysyl oxidase and assignment of the gene to chromosome 5 (extensive sequence homology with the murine ras recision gene). *Matrix.* 12, 242-248.
- 92 Martinez-Hernandez, A. (1988): The extracellular matrix and neoplasia. *Lab.Invest.* 58, 609-612.
- 93 Mello, M. L., Contente, S., Vidal, B. C., Planding, W., Schenck, U. (1995): Modulation of ras transformation affecting chromatin supraorganization as assessed by image analysis. *Exp.Cell Res.* 220, 374-382.
- 94 Molnar, J., Fong, K. S., He, Q. P., Hayashi, K., Kim, Y., Fong, S. F., Fogelgren, B., Szauter, K. M., Mink, M., Csiszar, K. (2003): Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim.Biophys.Acta.* 1647, 220-224.
- 95 Molnar, J., Ujfaludi, Z., Fong, S. F., Bollinger, J. A., Waro, G., Fogelgren, B., Dooley, D. M., Mink, M., Csiszar, K. (2005): Drosophila lysyl oxidases Dmlox1-1 and Dmlox1-2 are differentially expressed and the active DmLOXL-1 influences gene expression and development. *J.Biol.Chem.* 280, 22977-22985.
- 96 Nagai, M. A. (1999): Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 32, 897-904.
- 97 Nellaiappan, K., Risitano, A., Liu, G., Nicklas, G., Kagan, H. M. (2000): Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth-muscle cells. *J.Cell Biochem.* 79, 576-582.

- 98 Oberhuber, H., Seliger, B., Schafer, R. (1995): Partial restoration of pre-transformation levels of lysyl oxidase and transin mRNAs in phenotypic ras revertants. *Mol.Carcinog.* 12, 198-204.
- 99 Ohkawa, K., Fujii, K., Nishida, A., Yamauchi, T., Ishibashi, H., Yamamoto, H. (2001): Lysyl oxidase-catalyzed cross-linking and insolubilization reactions of Lys-containing polypeptides and synthetic adhesive proteins. *Biomacromolecules.* 2, 773-779.
- 100 Oleggini, R., Gastaldo, N., Di Donato, A. (2007): Regulation of elastin promoter by lysyl oxidase and growth factors: cross control of lysyl oxidase on TGF-beta 1 effects. *Matrix Biol.* 26, 494-505.
- 101 Palamakumbura, A. H., Jeay, S., Guo, Y., Pischon, N., Sommer, P., Sonenshein, G. E., Trackman, P. C. (2004): The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of ras-transformed cells. *J.Biol.Chem.* 279, 40593-40600.
- 102 Park, H. W., Song, S. Y., Lee, T. J., Jeong, D., Lee, T. Y. (2007): Abrogation of the p16-retinoblastoma-cyclin D1 pathway in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncol.Rep.* 18, 267-272.
- 103 Payne, S. L., Hendrix, M. J., Kirschmann, D. A. (2007): Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect. *J.Cell Biochem.* 101, 1338-1354.
- 104 Peinado, H., Del Carmen Iglesias-de la Cruz, Olmeda, D., Csiszar, K., Fong, K. S., Vega, S., Nieto, M. A., Cano, A., Portillo, F. (2005): A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* 24, 3446-3458.
- 105 Peinado, H., Moreno-Bueno, G., Hardisson, D., Perez-Gomez, E., Santos, V., Mendiola, M., de Diego, J. I., Nistal, M., Quintanilla, M., Portillo, F., Cano, A. (2008): Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 68, 4541-4550.
- 106 Peyrol, S., Galateau-Salle, F., Raccurt, M., Gleyzal, C., Sommer, P. (2000): Selective expression of lysyl oxidase (LOX) in the stromal reactions of broncho-pulmonary carcinomas. *Histol.Histopathol.* 15, 1127-1135.

- 107 Peyrol, S., Raccurt, M., Gerard, F., Gleyzal, C., Grimaud, J. A., Sommer, P. (1997): Lysyl oxidase gene expression in the stromal reaction to in situ and invasive ductal breast carcinoma. *Am.J.Pathol.* 150, 497-507.
- 108 Pinnell, S. R., Martin, G. R. (1968): The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to alpha-amino adipic-delta-semialdehyde (allysine) by an extract from bone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 61, 708-716.
- 109 Pires Martins R., Leach, R. E., Krawetz, S. A. (2001): Whole-body gene expression by data mining. *Genomics.* 72, 34-42.
- 110 Ponte, P., Ng, S. Y., Engel, J., Gunning, P., Kedes, L. (1984): Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res.* 12, 1687-1696.
- 111 Postovit, L. M., Abbott, D. E., Payne, S. L., Wheaton, W. W., Margaryan, N. V., Sullivan, R., Jansen, M. K., Csiszar, K., Hendrix, M. J., Kirschmann, D. A. (2008): Hypoxia/reoxygenation: a dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration. *J.Cell Biochem.* 103, 1369-1378.
- 112 Rae, M. T., Niven, D., Ross, A., Forster, T., Lathe, R., Critchley, H. O., Ghazal, P., Hillier, S. G. (2004): Steroid signalling in human ovarian surface epithelial cells: the response to interleukin-1alpha determined by microarray analysis. *J.Endocrinol.* 183, 19-28.
- 113 Ragin, C. C., Modugno, F., Gollin, S. M. (2007): The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J.Dent.Res.* 86, 104-114.
- 114 Ren, C., Yang, G., Timme, T. L., Wheeler, T. M., Thompson, T. C. (1998): Reduced lysyl oxidase messenger RNA levels in experimental and human prostate cancer. *Cancer Res.* 58, 1285-1290.
- 115 Resnick, D., Pearson, A., Krieger, M. (1994): The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem.Sci.* 19, 5-8.

- 116 Reynaud, C., Gleyzal, C., Jourdan-Le Saux, C., Sommer, P. (1999): Comparative functional study of the lysyl oxidase promoter in fibroblasts, Ras-transformed fibroblasts, myofibroblasts and smooth muscle cells. *Cell Mol.Biol.* 45, 1237-1247.
- 117 Rodriguez, C., Alcuia, J. F., Martinez-Gonzalez, J., Raposo, B., Navarro, M. A., Badimon, L. (2008): Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNFalpha: a new mechanism underlying TNFalpha-induced endothelial dysfunction. *Atherosclerosis*. 196, 558-564.
- 118 Rodriguez, C., Rodriguez-Sinovas, A., Martinez-Gonzalez, J. (2008): Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect.* 21, 218-224.
- 119 Roepman, P., Kemmeren, P., Wessels, L. F., Slootweg, P. J., Holstege, F. C. (2006): Multiple robust signatures for detecting lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 66, 2361-2366.
- 120 Rost, T., Pyritz, V., Rathcke, I. O., Görögh, T., Dünne, A. A., Werner, J. A. (2003): Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 23, 1565-1573.
- 121 Saito, H., Papaconstantinou, J., Sato, H., Goldstein, S. (1997): Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence. *J.Biol.Chem* 272, 8157-8160.
- 122 Sanderson, R. J., Ironside, J. A. (2002): Squamous cell carcinomas of the head and neck. *BMJ.* 325, 822-827.
- 123 Sankaranarayanan, R., Masuyer, E., Swaminathan, R., Ferlay, J., Whelan, S. (1998): Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res.* 18, 4779-4786.
- 124 Schürch, W., Lagace, R., Seemayer, T. A. (1982): Myofibroblastic stromal reaction in retracted scirrhous carcinoma of the breast. *Surg.Gynecol.Obstet.* 154, 351-358.

- 125 Sebban, S., Davidson, B., Reich, R. (2009): Lysyl oxidase-like 4 is alternatively spliced in an anatomic site-specific manner in tumors involving the serosal cavities. *Virchows Arch.* 454, 71-79.
- 126 Sharma, R., Kramer, J. A., Krawetz, S. A. (1997): Lysyl oxidase, cellular senescence and tumor suppression. *Biosci.Rep.* 17, 409-414.
- 127 Shibamura, M., Mashimo, J., Mita, A., Kuroki, T., Nose, K. (1993): Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1 -regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide. *Eur.J.Biochem* 217, 13-19.
- 128 Shingaki, S., Suzuki, I., Kobayashi, T., Nakajima, T. (1996): Predicting factors for distant metastases in head and neck carcinomas: an analysis of 103 patients with locoregional control. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 54, 853-857.
- 129 Smith-Mungo, L., Kagan, H. M. (2002): PKC-MEK-MAPK-dependent signal transduction pathway mediates the stimulation of lysyl oxidase expression by serum and PDGF in rat aortic smooth muscle cells. *J.Cell Biochem.* 85, 775-784.
- 130 Smith-Mungo, L. I., Kagan, H. M. (1998): Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol.* 16, 387-398.
- 131 Spitz, M. R. (1994): Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin.Oncol.* 21, 281-288.
- 132 Stassar, M. J., Devitt, G., Brosius, M., Rinnab, L., Prang, J., Schradin, T., Simon, J., Petersen, S., Kopp-Schneider, A., Zoller, M. (2001): Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. *Br.J.Cancer.* 85, 1372-1382.
- 133 Statistisches Bundesamt, Wiesbaden (2008): GENESIS-Online. www-genesis.destatis.de/genesis/online/online.jsessionid=B78B2B792C0E2C256BFEC5CBF2ADE755.tcggel1?operation=abruftabelleBearbeiten&levelindex=2&levelid=1235556351012&auswahloperation=abruftabelleAuspraegungAuswaehlen&auswahlverzeichnis=ordnungsstruktur&auswahlziel=werteabruf&werteabruf=Werteabruf. Zugriff am 25.02.2009.

- 134 Svinarich, D. M., Twomey, T. A., Macauley, S. P., Krebs, C. J., Yang, T. P., Krawetz, S. A. (1992): Characterization of the human lysyl oxidase gene locus. *J.Biol.Chem.* 267, 14382-14387.
- 135 Szauter, K. M., Cao, T., Boyd, C. D., Csiszar, K. (2005): Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin. *Pathol.Biol.(Paris)*. 53, 448-456.
- 136 Tan, R. S., Taniguchi, T., Harada, H. (1996): Identification of the lysyl oxidase gene as target of the antioncogenic transcription factor, IRF-1, and its possible role in tumor suppression. *Cancer Res.* 56, 2417-2421.
- 137 Thomas, G. R., Nadiminti, H., Regalado, J. (2005): Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int.J.Exp.Pathol.* 86, 347-363.
- 138 Thompson, K., Rabinovitch, M. (1996): Exogenous leukocyte and endogenous elastases can mediate mitogenic activity in pulmonary artery smooth muscle cells by release of extracellular-matrix bound basic fibroblast growth factor. *J.Cell Physiol.* 166, 495-505.
- 139 Trackman, P. C., Bedell-Hogan, D., Tang, J., Kagan, H. M. (1992): Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J.Biol.Chem.* 267, 8666-8671.
- 140 Trackman, P. C., Graham, R. J., Bittner, H. K., Carnes, D. L., Gilles, J. A., Graves, D. T. (1998): Inflammation-associated lysyl oxidase protein expression in vivo, and modulation by FGF-2 plus IGF-1. *Histochem.Cell Biol.* 110, 9-14.
- 141 Trackman, P. C., Pratt, A. M., Wolanski, A., Tang, S. S., Offner, G. D., Troxler, R. F., Kagan, H. M. (1990): Cloning of rat aorta lysyl oxidase cDNA: complete codons and predicted amino acid sequence [published erratum appears in *Biochemistry* 1991 Aug 20;30(33):8282]. *Biochemistry.* 29, 4863-4870.
- 142 Trivedy, C., Warnakulasuriya, K. A., Hazarey, V. K., Tavassoli, M., Sommer, P., Johnson, N. W. (1999): The upregulation of lysyl oxidase in oral submucous fibrosis and squamous cell carcinoma. *J.Oral Pathol.Med.* 28, 246-251.

- 143 UICC (1998): TNM Atlas. Illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren, 4. Aufl. (Hermanek P., Hutter R. V. P., Sobin L. H., Wagner G., Wittekind Ch., Hrsg). Springer, Berlin Heidelberg New York.
- 144 Uzel, M. I., Shih, S. D., Gross, H., Kessler, E., Gerstenfeld, L. C., Trackman, P. C. (2000): Molecular events that contribute to lysyl oxidase enzyme activity and insoluble collagen accumulation in osteosarcoma cell clones. *J.Bone Miner.Res.* 15, 1189-1197.
- 145 Vivek, R. S., Baludavid, M., Mohanram, R. (2006): Concurrent chemo-irradiation using accelerated concomitant boost radiation therapy in loco-regionally advanced head and neck squamous cell carcinomas. *J.Cancer Res.Ther.* 2, 90-96.
- 146 Wakasaki, H., Ooshima, A. (1990): Immunohistochemical localization of lysyl oxidase with monoclonal antibodies. *Lab.Invest* 63, 377-384.
- 147 Wang, S. X., Mure, M., Medzihradzky, K. F., Burlingame, A. L., Brown, D. E., Dooley, D. M., Smith, A. J., Kagan, H. M., Klinman, J. P. (1996): A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: redox function for amino acid side chains. *Science.* 273, 1078-1084.
- 148 Watanabe, T., Ichihara, M., Hashimoto, M., Shimono, K., Shimoyama, Y., Nagasaka, T., Murakumo, Y., Murakami, H., Sugiura, H., Iwata, H., Ishiguro, N., Takahashi, M. (2002): Characterization of gene expression induced by RET with MEN2A or MEN2B mutation. *Am.J.Pathol.* 161, 249-256.
- 149 Weise, J. B., Csiszar, K., Gottschlich, S., Hoffmann, M., Schmidt, A., Weingartz, U., Adamzik, I., Heiser, A., Kabelitz, D., Ambrosch, P., Görögh, T. (2008): Vaccination strategy to target lysyl oxidase-like 4 in dendritic cell based immunotherapy for head and neck cancer. *Int.J.Oncol.* 32, 317-322.
- 150 Werner, J. A., Rathcke, I. O., Mandic, R. (2002): The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin.Exp.Metastasis.* 19, 275-282.

- 151 Wiegand, S., Dünne, A. A., Muller, H. H., Mandic, R., Barth, P., Davis, R. K., Werner, J. A. (2005): Metaanalysis of the significance of matrix metalloproteinases for lymph node disease in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 104, 94-100.
- 152 Wu, G., Guo, Z., Chang, X., Kim, M. S., Nagpal, J. K., Liu, J., Maki, J. M., Kivirikko, K. I., Ethier, S. P., Trink, B., Sidransky, D. (2007): LOXL1 and LOXL4 are epigenetically silenced and can inhibit ras/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human bladder cancer. *Cancer Res*. 67, 4123-4129.
- 153 Wu, Y., Rich, C. B., Lincecum, J., Trackman, P. C., Kagan, H. M., Foster, J. A. (1992): Characterization and developmental expression of chick aortic lysyl oxidase. *J.Biol.Chem*. 267, 24199-24206.
- 154 Yan, B., Yang, X., Lee, T. L., Friedman, J., Tang, J., Van Waes, C., Chen, Z. (2007): Genome-wide identification of novel expression signatures reveal distinct patterns and prevalence of binding motifs for p53, nuclear factor-kappaB and other signal transcription factors in head and neck squamous cell carcinoma. *Genome Biol*. 8, R78.1-25.
- 155 Zhao, Y., Min, C., Vora, S. R., Trackman, P. C., Sonenshein, G. E., Kirsch, K. H. (2009): The lysyl oxidase pro-peptide attenuates fibronectin-mediated activation of focal adhesion kinase and p130Cas in breast cancer cells. *J.Biol.Chem*. 284, 1385-1393.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACTB	=	β -Aktin
Akt	=	Proteinkinase B
β -APN	=	β -Amino-Proprio-Nitril
bFGF	=	basic Fibroblastic Growth Factor
bp	=	base pairs
CA	=	Karzinom
cDNA	=	complementary Desoxyribonukleinsäure
Cu	=	Kupfer
CRL	=	Cytokine Receptor-Like
CYP1A1	=	Cytochrom P 450 1A1
DEPC	=	Diethyl-Pyrocarbonat
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
ECM	=	Extrazelluläre Matrix
EGF	=	Epidermal Growth Factor
EMT	=	Epitheliale-Mesenchymale Transition
Erk	=	Extracellular regulated kinase
FCS	=	Fetales Kalbserum
FGF	=	Fibroblastic Growth Factor
GHK	=	Glycyl-Histidyl-Lysyl
GSTM1	=	Glutathion-S-Transferase M1
IGF-1	=	Insulin-like Growth Factor-1
IRF	=	Interferon Regulatory Factor
Her2	=	Human epidermal growth factor receptor 2
HNSCC	=	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
Kera	=	Keratinozytenkultur
kb	=	Kilo-Basen
kDa	=	Kilo-Dalton
KSFM	=	Keratinocyte Serum Free Medium
LO	=	Lysyl Oxidase Protein

LOH	=	Loss Of Heterozygosity
LOL	=	Lysyl Oxidase-Like Protein
LOX	=	Lysyl Oxidase Gen
LOXC	=	Lysyl Oxidase Gen der Maus
LOXL	=	Lysyl Oxidase-Like Gen
LOR	=	Lysyl Oxidase Related Gen
LTQ	=	Lysyl-Tyrosyl-Quinon
MAP	=	Mitogen-Activated Protein
MEK	=	Mitogen-activated protein kinase kinase
mRNA	=	messenger Ribonukleinsäure
NAT2	=	N-Acetyltransferase 2
nt	=	nucleotides
OD ₂₆₀	=	Optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge
OSF	=	Orale Submuköse Fibrose
PBS	=	Phosphate Buffered Saline
PCP	=	Prokollagen-C-Proteinase
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PDGF	=	Platelet Derived Growth Factor
PI3K	=	Phosphatidylinositol 3-Kinase
Raf	=	Rapidly growing fibrosarcoma oder Rat fibrosarcoma
ras	=	rat sarcoma
RCC	=	Renal Cell Carcinoma
RNA	=	Ribonukleinsäure
rRNA	=	ribosomale Ribonukleinsäure
REE	=	Relative Expressions-Einheiten
rrg	=	ras recision gene
RT	=	Reverse Transkription
RT-PCR	=	Reverse-Transcriptase Polymerase-Chain-Reaction
SCC	=	Squamous Cell Carcinoma
SRCR	=	Scavenger Receptor Cystein Rich
TGF- β 1	=	Transforming Growth Factor- β 1
UICC	=	International Union Against Cancer
UTR	=	Untranslated Region

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Gegenwärtiges Progressionsmodell für HNSCC.....	3
Abb. 2. Chromosomale Lokalisation und Struktur der Gene der LOX-Familie	5
Abb. 3. Schematischer Aufbau der Proteine der LO-Familie.....	6
Abb. 4. Beispielhaftes Sequenzierungsergebnis von MWG-Biotech.....	37
Abb. 5. Beispielhafter Sequenzvergleich	38
Abb. 6. Repräsentativer RNA-Qualitätsnachweis	39
Abb. 7. Repräsentative Gelelektrophorese für Referenz- und HNSCC-Proben.....	40
Abb. 8. Repräsentatives Elektrophorese-Ergebnis für die Negativkontrollen.....	41
Abb. 9. Sequenzen der durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente.....	42
Abb. 10. Vergleich der LOX-mRNA-Level in HNSCC- und Referenz-Proben.....	48
Abb. 11. Vergleich der LOXL2-mRNA-Level in HNSCC- und Referenz-Proben.....	49

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Klinische Daten der untersuchten HNSCC-Zelllinien.....	22
Tabelle 2. Klinische Daten der untersuchten HNSCC-Gewebeproben.....	23
Tabelle 3. Klinische Daten der Referenz-Zellen.	24
Tabelle 4. Klinische Daten der Referenz-Gewebeproben.	24
Tabelle 5. Staging, Grading, LOX- und LOXL2-mRNA-Level der untersuchten HNSCC-Zelllinien.....	44
Tabelle 6. Staging, Grading, LOX- und LOXL2-mRNA-Level der untersuchten HNSCC-Gewebeproben.	45
Tabelle 7. Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung.....	46
Tabelle 8. Deskriptive Statistik der mRNA-Expressionsergebnisse für LOX.	47
Tabelle 9. Deskriptive Statistik der mRNA-Expressionsergebnisse für LOXL2.....	47
Tabelle 10. Effektgrößen	50
Tabelle 11. Levene-Test der Varianzhomogenität.	50
Tabelle 12. T-Test	51
Tabelle 13. Power-Analysen	52
Tabelle 14. Korrelationen für HNSCC-Proben	53

8 Verzeichnis der Akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Bandmann, Barth, Basler, Baum, Benes, Berger, Bertalanffy, Bien, Bolm Cetin, Christiansen, Czubayko, Danielzik-Stork, Daut, Doss, Duda, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Folz, Fruhstorfer, Geks, Gemsa, Giese, Görg, Gotzen, Grau, Gressner, Griss, Grzeschik, Happle, Hasilik, Hellinger, Herzum, Hesse, Höffken, Höltermann, Hörle, Hofmann, Jungclas, Kern, Klenk, Klose, König, Koolman, Kretschmer, Krieg, Lammel, Lang, Lennartz, Leppek, Lill, Lippert, Löffler, Maisch, Mandic, Martin, Mattejat, McGregor, Meinhardt, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumann, Nies, Niessing, Oertel, Ramaswamy, Rau, Rausch, Renz, Richter, Röhm, Renschmidt, Richter, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schneyer, Seitz, Slenczka, Sommer, Steiniger, Stief, Sundermeyer, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Wennemuth, Werner, Westermann, Winter, von Wichert in Marburg,

Hempelmann, Ogal in Gießen,

Arens, Geesink, Kootstra, Majoor, van Rhijn, van Steijn, van Ooij in Maastricht,

Carter, Freedman, Hooper, Killcross, Pawsey, Seibel in Sydney,

Huber, Kappeler, Meier, Säuberli, Teufelberger in Baden,

Arps, Bonzel, Behr, Fassbinder, Höffken, Hölper, Janka, Jaspersen, Kroll, Langohr, Müller, Soldner, Tenckhoff, Wagner, Wörsdörfer in Fulda.

9 Danksagung

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

Für ihre fachlichen Ratschläge und die konstruktive Kritik zur formellen und inhaltlichen Gestaltung der Arbeit gilt mein Dank den Herren Dr. I. O. Rathcke und Dr. T. Görögh aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, sowie ganz besonders Herrn PD Dr. R. Mandic, dem Leiter des Molekularbiologischen Labors des Medizinischen Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Philipps-Universität Marburg.

Für den tolle Einsatz und die große Ausdauer bei der statistischen Beratung bedanke ich mich herzlich bei den Herren Diplom-Psychologen Dr. S. Sewing und Dr. D. Lehr.

Bei den Mitarbeiterinnen des Molekularbiologischen Labors des Medizinischen Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Philipps-Universität Marburg, Frau R. Peldszus und Frau G. Sadowski, sowie bei Frau S. Falkenberg, möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils meiner Doktorarbeit bedanken. Sie unterstützten meine Arbeit nach Kräften und sorgten stets für eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein großer Dank gilt Frau Dr. V. Sengpiel, die im Rahmen ihrer Dissertation im Molekularbiologischen Labor des Medizinischen Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Philipps-Universität Marburg tätig war. Der Zusammenarbeit mit ihr ist es zu verdanken, dass die Experimente für die vorliegende Arbeit durchgeführt und abgeschlossen werden konnten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Ehefrau Mirjam Wege, die mich während der gesamten Zeit der Erstellung der Arbeit unterstützt und getragen hat.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Expression der mRNA von Lysyl Oxidase und Lysyl Oxidase Like 2 in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes“ in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde unter der Leitung von Prof. Dr. J. A. Werner mit Unterstützung durch Dr. I. O. Rathcke, Dr. T. Görögh und PD Dr. R. Mandic ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan in Auszügen veröffentlicht:

Rost, T., Pyritz, V., Rathcke, I. O., Görögh, T., Dünne, A. A., Werner, J. A. (2003): Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 23, 1565-1573.

Marburg, 23.07.2009

Tobias Wege-Rost