

Aus dem CharitéCentrum für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie  
Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie,  
Klinische Navigation und Robotik  
Direktor: Prof. Dr. Dr. mult. h. c. J. Bier

**Untersuchungen zum Einfluss von Estradiol, Tamoxifen und  
ICI 182,780 auf Adhäsionsmoleküle von drei oralen  
Plattenepithelkarzinomzelllinien *in vitro***

Habilitationsschrift  
zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach  
Oralchirurgie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frau Dr. med. dent. Katja Nelson  
geboren am 14.06.1966 in Fulda

eingereicht am: August 2007  
Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul  
Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. Metelmann  
2. Prof. Dr. Kristiansen

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	5
1.1 Plattenepithelkarzinome	5
1.2 Adhäsionsmoleküle und Karzinogenese epithelialer Tumore	7
1.3 Zelladhäsionsmoleküle	9
1.3.1 E-Cadherin	9
1.3.2 $\beta$ -Catenin	11
1.3.3 Integrine	13
1.3.3.1 $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin	15
1.3.3.2 $\alpha$ 6 $\beta$ 4-Integrin	16
1.4 Modulierende Agenzien	17
1.4.1 Estradiol und Östrogenrezeptoren	18
1.4.2 Tamoxifen	22
1.4.3 ICI 182,780	23
1.5 Fragestellung	25
<b>2. Material und Methode</b>	27
2.1 Zelllinien	27
2.1.1 Plattenepithelkarzinomzellen	27
2.1.2 Mammakarzinomzellen	28
2.1.3 Bakterienstamm	28
2.2 Zellkultur- und Versuchsmedien	30
2.3 Zellkultur	30
2.4 Methoden zur phänotypischen Charakterisierung	30
2.4.1 Proliferationsanalyse	30
2.4.2 Zell-Zell Adhäsion	31
2.4.3 Adhäsion der Zellen an Laminin-1	32
2.5 Ermittlung der Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen und zellulären Rezeptoren	32
2.5.1 Immunfluoreszenz-Färbung	32
2.5.2 Durchflusszytometrie	33
2.5.3 Western Blot und Immunopräzipitation	34
2.5.3.1 Messung der Proteinkonzentration	34
2.5.3.2 Vorbereitung der Gele und Proben	34
2.5.3.3 Gelelektrophorese und Proteintransfer	35
2.5.3.4 Antikörperapplikation und Detektion der Proteinbande	36
2.6 Darstellung der Proteinsynthese	36
2.6.1 Isolation und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
2.6.2 Reverse Transkription von RNA und Elektrophorese	37
2.6.3 Northern Blot	38
2.6.3.1 DNA-Agarosegelelektrophorese und Elution	39
2.6.3.2 Die klassische Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
2.6.3.3 Klonierung spezifischer PCR-Produkte und Vermehrung von Bakterienkolonien	40
2.6.3.4 Präparation von Plasmid-DNA und Sequenzierung	41
2.6.3.5 Radioaktive Markierung und enzymatische Restriktion von DNA	41
2.7 Quantitative <i>real time</i> PCR	42
2.8 Statistische Auswertung	42

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	43
3.1	Einfluss von E2, Tam und ICI auf das Wachstumsverhalten	43
3.2	Fähigkeit zur Zell-Zell-Adhäsion	46
3.3	Adhäsionsverhalten der Zellen an das extrazelluläre Matrixprotein Laminin-1	47
3.4	Darstellung der Morphologie der Zellen und des Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen mittels Histomorphometrie	49
3.4.1	Darstellung der Expression von E-Cadherin und $\beta$ -Catenin durch immunfluoreszierende Färbungen	50
3.4.1.1	E-Cadherin	50
3.4.1.2	$\beta$ -Catenin	52
3.4.2	Betrachtung der $\alpha$ 3, $\alpha$ 6, $\beta$ 1 und $\beta$ 4-Integrinuntereinheit durch immunfluoreszierende Färbungen	53
3.4.2.1	$\alpha$ 3-Integrin	53
3.4.2.2	$\beta$ 1-Integrin	54
3.4.2.3	$\alpha$ 6-Integrin	55
3.4.2.4	$\beta$ 4-Integrin	58
3.5	Darstellung der Veränderungen der Expression der Zelladhäsionsmoleküle mittels Durchflusszytometrie, Immunoblot und molekularbiologischer Methoden	60
3.5.1	E-Cadherin und $\beta$ -Catenin Proteinexpression	60
3.5.2	Regulation der Transkription von E-Cadherin	62
3.5.3	Oberflächenexpression von $\alpha$ 3, $\alpha$ 6, $\beta$ 1 und $\beta$ 4-Integrin	63
3.5.4	Regulation der Transkription von $\alpha$ 3, $\alpha$ 6, $\beta$ 1 und $\beta$ 4-Integrin	64
3.6	Östrogenrezeptor-Status von UM-SCC-14A, UM-SCC-14B und UM-SCC-14C	66
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	68
4.1	Steroidhormone und Tumorwachstum	68
4.2	Einfluss von Estradiol, Tamoxifen und ICI182,780 auf die Zell-Zell Adhäsion	71
4.3	Veränderung der Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion an Laminin-1	71
4.4	Morphologische Alterationen der Expressionsmuster der Zelladhäsionsmoleküle in der histomorphometrischen Analyse	72
4.5	Veränderungen der Expression und Translation der Proteine E-Cadherin, $\beta$ -Catenin und der Integrine	74
4.5.1	E-Cadherin und $\beta$ -Catenin	74
4.5.2	Integrine	77
4.6	Rolle des Östrogenrezeptors (oder Wirkweise der Hormone)	81
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	83
<b>6.</b>	<b>Summary</b>	86
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	88
	<b>Danksagung</b>	103

**For Lara and my parents**

## 1. Einleitung

### 1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

Kopf- und Halstumore gelten als vierthäufigste Todesursache bei Männern in der Europäischen Union mit mehr als 600 000 neuen Fällen jährlich weltweit (Jakse et al 2003). Bezüglich der Bundesrepublik Deutschland ist nach Schätzung der Deutschen Krebsgesellschaft/Robert-Koch Institut im Jahre 2005 festzustellen, dass Tumore der Mundhöhle und des Rachens (ICD-9 140-149) mit 3-4% bei Männern und 1% bei Frauen die siebthäufigste Krebsneuerkrankung bei Männern, mit einem stetigen Anstieg der Inzidenz bei beiden Geschlechtern, darstellen (Fröhlich 1991; Bundesministerium für Gesundheit 1993; Becker 1999). Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Verhältnis 2,9:1) (Robert Koch-Institut 1999) und der Altersgipfel liegt im 3-6 Lebensjahrzehnt. Die Ausbildung eines Plattenepithelkarzinoms (ICD-0 8070/3 und 8071/3) gilt als die am häufigsten diagnostizierte Tumorentität in der Gruppe maligner Neoplasien des Kopf-Hals-Bereiches (World Health Organization 1990).

Plattenepithelkarzinome (PECA) entstehen zu gleichen Anteilen im Mundboden (ICD 144), an der Zunge (ICD 141) sowie im Bereich des Rachenrings (ICD 146) und des Hypopharynx (ICD 148). Sie stellen sich in über 90% der Fälle als in die Umgebung einstrahlend dar (Abb. 1). Eine rasche Infiltration in umliegendes Gewebe und frühe Metastasierung in die regionären Lymphknoten, später auch in tiefergelegene Lymphknoten, ist zu beobachten. Häufig liegt eine langjährige Tabak- und Alkoholanamnese der betroffenen Patienten vor. Diese prädisponierenden Faktoren steigern das Malignomrisiko im Vergleich zum Nichtraucher oder Nichttrinker um das 20-fache, wobei der kombinierte Genuss ein multiplizierendes Risiko in sich birgt (Becker 1999; Jakse, Auberger et al. 2003).



Abb. 1.1 Ausgeprägtes Plattenepithelkarzinom im Bereich des anterioren Mundboden, mit exophytischen Anteilen und ulzerierter Oberfläche.

Llewellyn et al. (Llewellyn, Johnson et al. 2001) beschreiben, dass besonders in den letzten Jahren eine deutliche Neuerkrankungszunahme bei alten (>80 Jahre) und jungen (<40 Jahre) Menschen beobachtet werden konnte. Ein Großteil der unter 40jährigen gab an, nie geraucht oder Alkohol in übermäßigem Ausmaß konsumiert zu haben. Im Vergleich zu älteren Patienten wäre die Lebenszeitdauer für eine maligne Zelltransformation viel zu kurz. Es besteht bisher keine Einigkeit, ob die Karzinogenese der oralen Karzinome junger Menschen der von älteren Patienten gleicht. Weiterhin wird bei den neu diagnostizierten Manifestationen von PECA ein vermehrter Anteil von Frauen beobachtet, bei denen ebenfalls keine offensichtlichen, ätiologischen Faktoren ausgemacht werden können (Sturgis, Moore et al. 2005; Chitapanarux et al. 2006; Gilroy, Morris et al. 2005; Verschuur 1999).

Trotz weiterentwickelter diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten bei Patienten mit PECA, besteht weiterhin eine 3-7%ige jährliche Rezidivrate, ebenso konnte die Überlebensrate der davon betroffenen Patienten bisher nicht entscheidend verlängert werden (Bier 1991).

## 1.2 Adhäsionsmoleküle und Karzinogenese epithelialer Tumore

Eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese der epithelialen Tumore kommt der Integrität des Epithelzellverbandes zu. Diese wird im Wesentlichen durch integrale Membranproteine sog. Zelladhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der Epithelzellen gewährleistet (Johnson, Rowe et al. 1992). Sie vermitteln nicht nur den Zusammenhalt der Epithelzellen im Zellverband (Zell-Zell-Adhäsion) und deren Bindung an die Extrazellulärmatrix (Zell-Matrix-Adhäsion), sondern sind auch an der Steuerung und Koordination der Proliferation, der Differenzierung sowie der Wanderung der Epithelzellen innerhalb der Mukosa beteiligt (Kohn, Liotta 1995; Wong, Todd et al. 1996). Erste Untersuchungen weisen darauf hin, dass Störungen der Expression oder der Funktion von Adhäsionsmolekülen mit einer veränderten Gewebsarchitektur und mit Funktionsdefekten des Epithelzellverbandes mit der Karzinogenese assoziiert sind (Akiyama 1996; Vermeulen, Van Marck et al. 1996). Bei Karzinomen scheint der Verlust von funktioneller Zellpolarität und Zelladhäsion als Voraussetzung für das invasive und metastasierende Wachstum entscheidend zu sein (Akiyama, Olden et al. 1995; Shiozaki, Oka et al. 1996; Woodhouse, Chuaqui et al. 1997). Die normale Epithelfunktion wird durch die regelrechte Expression und Funktion einzelner Adhäsionsmoleküle gewährleistet; wird dieses koordinierte Zusammenwirken gestört, resultieren Defekte des zellulären Adhäsionsapparates. Zu den Adhäsionsmolekülen werden die Cadherine, die Integrine, die Selektine und Mitglieder der Superfamilie der Immunglobulingene gezählt. Regulär bestehen diese Moleküle aus einer intrazellulären, einer transmembranären und einer extrazellulären Domäne. Die eigentliche Adhäsion wird dabei durch die extrazelluläre Domäne vermittelt. Der Signaltransduktion ins Innere dient die intrazelluläre Domäne. Humane epitheliale Tumore zeichnen sich häufig durch ein verändertes Expressions- und Funktionsmuster der genannten Zelladhäsionsmoleküle aus. Insbesondere wirken sich Veränderungen von E-Cadherin und spezifischen Integrinen auf die Invasivität der Tumorzellen und die Metastasierung aus (Shimoyama, Hirohashi 1991; Behrens 1994; Liotta, Kohn 2001; Jin, Varner 2004; Janes, Watt 2006).

Therapeutika, welche eine modulierende Funktion auf Integrine und E-Cadherin aufweisen, könnten hoffentlich zukünftig als potentielle Tumorstimmulanzinhibitoren bzw. -modulatoren zum Einsatz kommen (Jin, Varner 2004). Hierzu zählen Substanzen wie Tamoxifen (TAM) und Estradiol, die in der Therapie von Brustkarzinomen und Gliomen sowie Lungenkarzinomen zunehmend an Bedeutung gewonnen haben (Saintier 2004). Bereits veröffentlichte Untersuchungen lieferten Hinweise dafür, dass Steroide zu einer Veränderung der Expression von E-Cadherin in bestimmten Arten von Geweben im Tiermodell führen (MacCalman, Brodt et al. 1994; MacCalman, Farookhi et al. 1994; Saintier, Burde et al. 2004). Die Bedeutung von Steroidhormonen bei der Entwicklung von epithelialen Tumoren ist seit einigen Jahren Gegenstand der Forschung (MacCalman, Brodt et al. 1994; MacCalman, Farookhi et al. 1994; Hopert, Beyer et al. 1997). Untersuchungen an humanen epithelialen Tumoren im Bereich der Brust haben ergeben, dass das Wachstum von einem Drittel der Tumore durch Östrogene stimuliert wird, und somit diese Tumore einer Therapie mit Antiöstrogenen zugänglich sind (El Khissiin, Cleeren et al. 1997; Tonetti, Jordan 1997). Damit übereinstimmend zeigten Arbeiten bereits ein signifikant verändertes Wachstumsverhalten von Plattenepithelkarzinomzelllinien in Abhängigkeit von Tamoxifen (Shapira, Virolainen 1986; Hoffmann, Bojar et al. 2002; Tavassoli, Soltaninia et al. 2002; Kim, Lee et al. 2007, Nelson, Helmstaedter et al. 2006).



### 1.3. Zelladhäsionsmoleküle

#### 1.3.1 E-Cadherin

E-Cadherin wird als ein transmembranäres Protein der Gruppe der klassischen Cadherine (Typ 1) bezeichnet, welche sich in neun Untergruppen unterteilt.

Tab. 1.1 Klassifikation der Cadherine

Cadherin-Typ	Bezeichnung	Representative Mitglieder
<b>I</b>	Klassisches Cadherin	E-Cadherin P-Cadherin N-Cadherin
<b>II</b>	Atypisches Cadherin	M-Cadherin Cadherin-5 Cadherin-8 Cadherin-12
<b>III</b>	Peptid Transporter	LI-Cadherin  (intestinaler protonen-abhängiger Peptid-transporter)
<b>IV</b>	Trunkierte Cadherine	T-Cadherin
<b>V</b>	Protocadherine	Protocadherin 43
<b>VI</b>	Desmocollin	Desmocollin 1
<b>VII</b>	Desmoglein	Desmoglein 1
<b>VIII</b>	Rezeptor Tyrosin Kinase	c-ret
<b>IX</b>	Andere	<i>Fat</i> protein

Die Cadherine sind essentiell an der embryonalen Morphogenese beteiligt (Takeichi 1991). Das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zell-Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin ist überwiegend in epithelialen Geweben vorhanden, in welchem es für die Zellpolarität innerhalb des Epithelzellverbandes sowie für die Stabilisierung der Zell-Zellkontakte von großer Bedeutung ist.

E-Cadherin stellt sich als ein membranäres Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 120 kD mit fünf extrazellulären Domänen (EC), einer transmembranären und zwei intrazelluläre Regionen (Abb. 1.2).

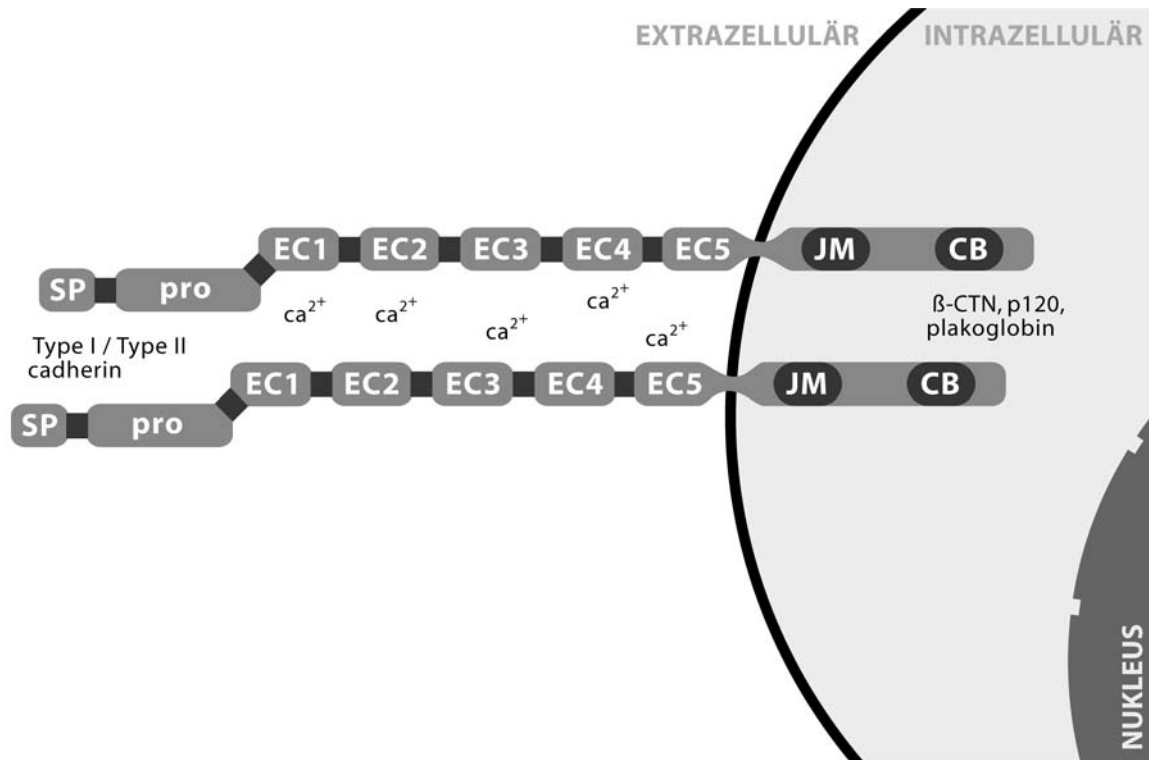


Abb. 1.2 Die extrazelluläre Domäne (EC) besteht aus fünf repetitiven Einheiten von 110 Aminosäuren, deren N-Terminale ein gemeinsames Bindungsmotiv für alle klassischen Cadherine aufweist. Eine laterale Dimerisierung zweier Cadherinmoleküle erfolgt nur unter Bindung von  $Ca^{2+}$ -Ionen. Die zytosmatische Domäne (CB) kann  $\beta$ -Catenin, p120 Catenin und plakoglobin binden, welches über die Bindung an  $\alpha$ -Catenin eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellt. Das kodierende Gen CDH1/E-Cadherin befindet sich auf Chromosom 16 (16q22.1).

Bindungen an die Nachbarzelle erfolgen nach Bildung von parallelen cis-Dimeren in einer Zelle durch eine folgende trans-Dimerisierung mit einem identischen Cadherin-Dimer der Nachbarzelle und sind somit homophil (Shapiro, Fannon et al. 1995). Die Bindung an zytosmatische Proteine erfolgt über den C-Terminus mit seiner sog. „catenin-binding domain“ der intrazellulären Domäne. Hier erfolgt die Verknüpfung mit  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin, welche mit  $\alpha$ -Catenin interagieren, und hierdurch die notwendige Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett herstellen, die für eine effiziente Zell-Zellverbindung notwendig ist (Wheelock, Johnson 2003; Nelson, Nusse 2004). Eine direkte Interaktion der intrazellulären Domäne mit einem weiteren Molekül, das  $p120^{ctn}$ , erfolgt über die juxtamembranäre Domäne der Cadherine,

hierbei kommt es zu keiner Verbindung mit  $\alpha$ -Catenin und somit auch nicht mit dem Aktin-Zytoskelett (Hatzfeld 2005). Die Kernfunktionen dieser Bindung stellen die Regulierung des Cadherin-*turnovers* und die Transduktion von Signalen, die die Zellmotilität beeinflussend in das Zellinnere weitergeleitet werden, dar (Davis, Ireton et al. 2003; Reynolds, Aberdeen et al. 2004; Yanagisawa, Anastasiadis 2006).

Ein intakter E-Cadherin/Catenin-Komplex bildet die Grundvoraussetzung für einen regelrechten Epithelzellverband bzw. einer funktionierenden Zonula adhaerens und kann somit als Tumorsuppressor fungieren (Behrens 1999; Behrens 2000; Vermeulen 1995). Der Verlust dieser Funktion durch Störungen des E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplexes, z.B. aufgrund von Alterationen von  $\beta$ -Catenin, korreliert mit einem Erwerb von invasiven Eigenschaften (Barker 2000; Behrens, 1999).

### 1.3.2 $\beta$ -Catenin

$\beta$ -Catenin mit einer Molekülmasse von 88kD bindet direkt an E-Cadherin (Trent, Wiltshire et al. 1995) und ist ein wichtiges Element des Wingless/Wnt-Signalweges, welcher die zelluläre Differenzierung und Zell-Zell-Adhäsion maßgeblich steuert (Nelson and Nusse 2004). In nicht maligne transformierten Zellen wird die Menge an freiem ungebundenem zytosolischem  $\beta$ -Catenin streng durch sofortige Degradation mit Proteosomen reguliert (Barker 2000; Behrens 1999). Durch Phosphorylierung mit einer Serin/Threonin-Kinase der sog. Glykogen-Synthase-Kinase (GSK)-3 $\beta$  nach Bindung an den APC Multi-Protein-Komplex wird  $\beta$ -Catenin der Degradation durch Ubiquitination im *Ubiquitin-Proteasome-Pathway* zugeführt (Kimelman, Xu 2006).

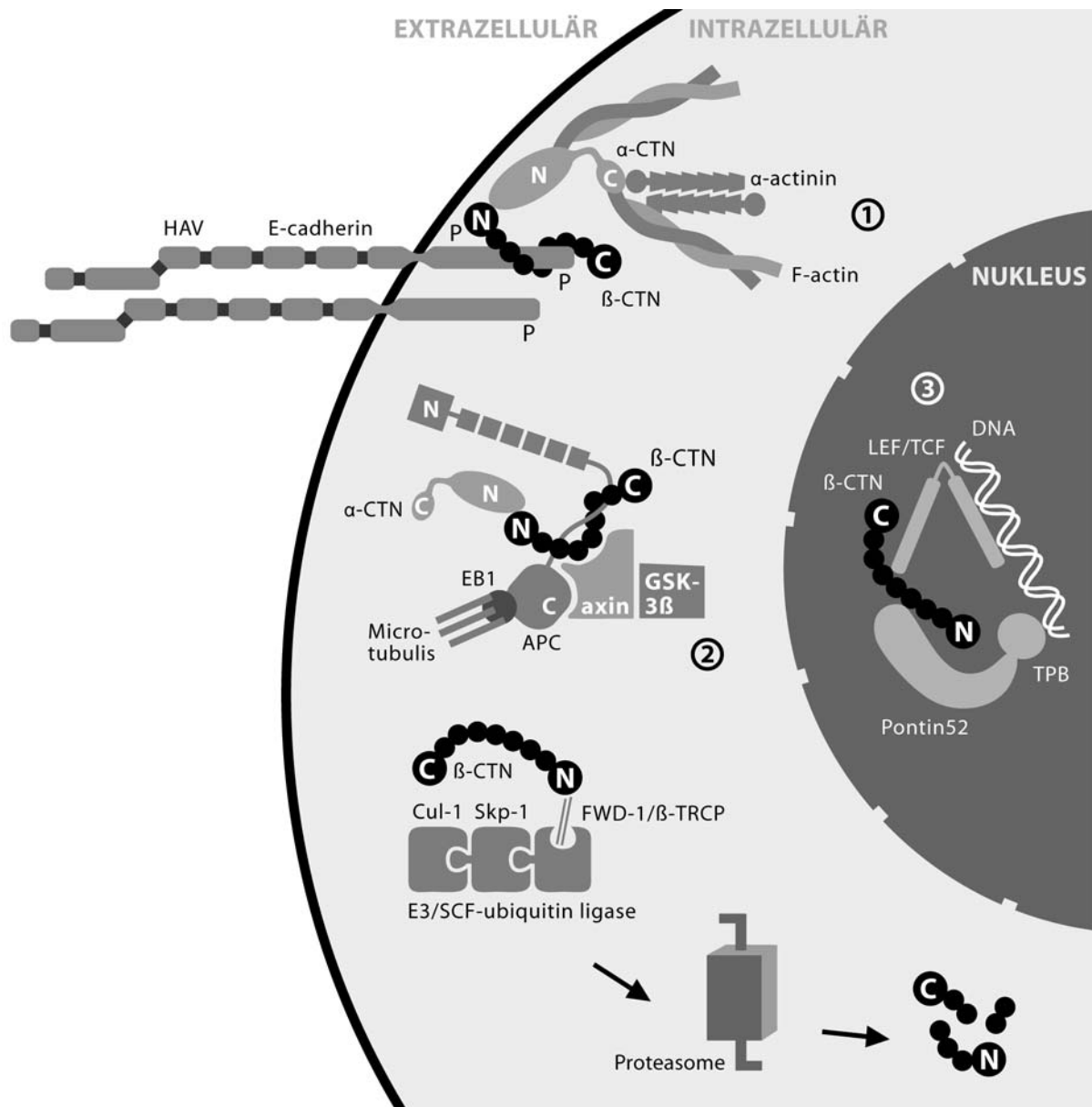


Abb. 1.3  $\beta$ -Catenin ist ein 90kD-Protein, welches die Bindung von E-Cadherin an das Aktinzytoskelett vermittelt (1). Es erfolgt die sofortige Degradation des  $\beta$ -Catenin, sobald dieses aus dem E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Komplex frei wird. Die Degradation beinhaltet die Bindung von  $\beta$ -Catenin an den GSK-3- Komplex, in welchem die Phosphorylierung von Serin und Threonin am N-terminalen Ende stattfindet; anschließend wird  $\beta$ -Catenin der Ubiquitination und Proteolyse zugeführt (2). Wird freies  $\beta$ -Catenin nicht der Degradation zugeführt, so kann es durch Bindung an den LEF/TCF-Komplex im Nukleus seine Signalwirkung entfalten (3).

Liegt eine gestörte Degradation vor, so kumuliert freies  $\beta$ -Catenin im Zytosol oder im Nukleus. Ebenso könnte eine Mutation oder Deletion des  $\beta$ -Catenin Gens eine mögliche Ursache darstellen (Wijnhoven, Dinjens et al. 2000). Eine Akkumulation von freiem  $\beta$ -Catenin wurde in Zellen des Plattenepithelkarzinoms beschrieben, eine Genmutation bzw. -deletion konnte jedoch nicht bei Plattenepithelkarzinomen

nachgewiesen werden, somit kann von einer post-translationalen Modifikation oder einem defekten Degradationsmechanismus ausgegangen werden (Wijnhoven, Dinjens et al. 2000; Diniz-Freitas, Garcia-Caballero et al. 2006; Ueda, Sunakawa et al. 2006). Diese Modifikationen umfassen in der Regel Tyrosinphosphorylierungen des  $\beta$ -Catenin-Moleküls, welche eine Bindung an E-Cadherin oder eine Degradation unmöglich machen (Bracke, Vyncke et al. 1993; Osborne, Zhao et al. 2000). Freies zytosolisches  $\beta$ -Catenin vermindert nicht nur die Zell-Zell-Adhäsion, sondern bindet auch bestimmte Transkriptionsfaktoren, welche proliferations- und migrations-spezifische Gene aktivieren (Nelson, Nusse 2004).

Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass eine geringere Überlebensrate von Patienten mit PECA mit einer verminderten Expression von einem intakten E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplex assoziiert ist (Hui, Zhang et al. 2004; Atallah, Flaherty 2005).

### 1.3.3 Integrine

Die Adhäsion der Epithelzellen an Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) erfolgt über heterodimere Proteine, sog. Integrine. Sie bestehen aus zwei nicht-kovalent gebundenen  $\alpha$ - (120-180kD) und  $\beta$ - (90-110kD) Untereinheiten, die in ihrer Struktur Glykoproteine darstellen und jeweils eine transmembranäre, eine extra- und eine intrazelluläre Domäne besitzen. Während erstere in der Zellmembran verankert ist, bilden die extrazellulären Domänen gemeinsam eine Ligandenbindungstasche, über welche sie spezifisch mit Proteinen der extrazellulären Matrix oder Rezeptoren anderer Zellen interagieren. Über die intrazellulären Integrinabschnitte erfolgt die Verankerung am Zytoskelett (Mizejewski 1999). 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ - Untereinheiten heterodimerisieren zu 24 Integrin-Rezeptoren, wobei ein Rezeptor mehr als ein Protein binden kann und die Transduktion von Signalen aus der ECM und vice versa ermöglicht (Abb. 1.4) (Gilcrease 2006).

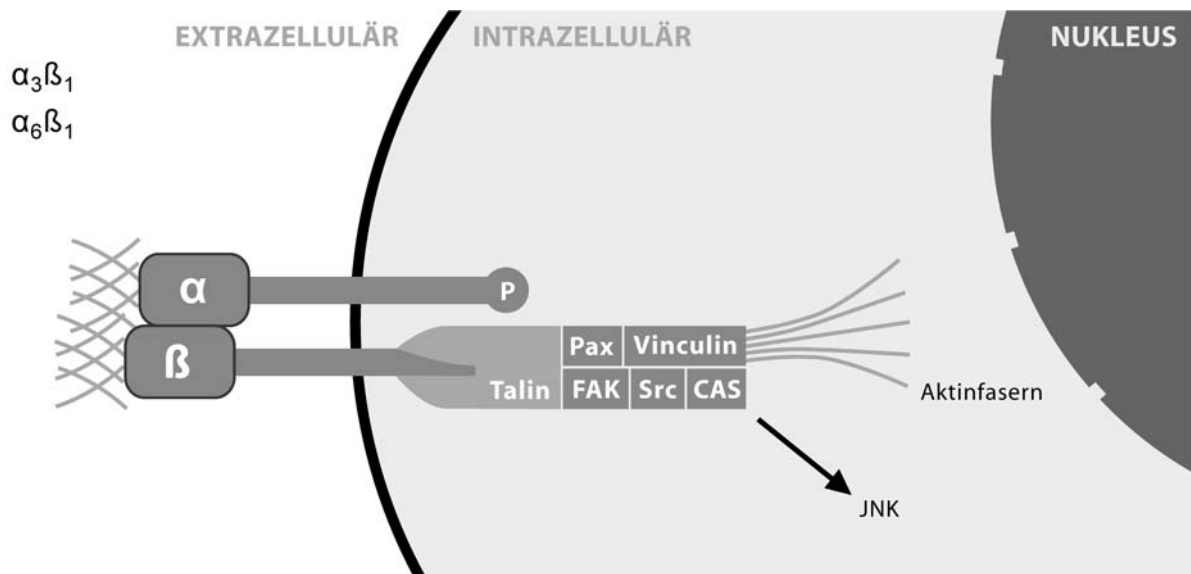


Abb. 1.4 Integrine sind Heterodimere, bestehend aus nicht kovalent gebundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten. Die spezifische Bindung von Liganden erfolgt in den Kopfreionen, welche durch lange Aminosäureketten (transmembranäre Region) in gebührendem Abstand zur Zellmembran positioniert werden. Der kurze zyttoplasmatische Anteil (ca. 1000 AS-Sequenzen in  $\alpha$  und 750 AS-Sequenzen) bindet mit seiner C-terminalen Domäne an zytoskelettale Bestandteile oder aktiviert intrazelluläre Signaltransduktion in Abhängigkeit der gebundenen Liganden.

Die Expression bestimmter Integrine und ihrer Bindung an Liganden ist zell- und gewebespezifisch, ebenso ist die Bindung bestimmter Liganden ausschlaggebend für die Funktion der Integrine in normalen und kanzerogenen Zellen. Es wird vermutet, dass ein verändertes ECM-Bindungsverhalten und eine alterierte  $\alpha/\beta$ -Zusammensetzung wesentlich zum Wachstumsverhalten sowie der erhöhten Invasivität von Tumorzellen beitragen (Janes, Watt 2006).

Integrine sind in der Lage, bidirektional Information vom Extrazellulärraum in die Zelle zu übertragen. Die Bindung von Integrinen an spezifische Liganden und eine dadurch induzierte lokale Konzentrierung von Integrinrezeptoren auf der Zelloberfläche (sog. *Clustering*) vermittelt dabei über den zytoplasmatischen Rezeptoranteil der Untereinheit die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden (Dogic, Rousselle et al. 1998; Gilcrease 2006). Ein früher Schritt, der durch Ligandenbindung an den Integrin-Rezeptor induziert wird, ist die Rekrutierung, Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Kinasen (z.B. *Focal Adhesion-Kinase* (FAK), MAP-Kinasen (MAPK), Phosphatidylinositol-Kinasen (PIK) und Proteinkinase C (PKC)), welche essentielle Bestandteile der Signalkaskaden von Proliferation, Migration und Kanzerogenese darstellen (Lipscomb, Mercurio 2005; Larsson 2006; Wu 2006).

Obwohl erhebliche Fortschritte im Verständnis der Integrine zu verzeichnen sind, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, wie und welche integrin-mediierten Signale an der Pathogenese von invasiven Karzinomen beteiligt sind. Einige Integrine, die an der Genese und Progression von Plattenepithelkarzinomen beteiligt sind, wurden bereits identifiziert; hierbei handelt es sich um die Integrine  $\alpha 3\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 4$  (Owens, Watt 2001; Giannelli, Astigiano et al. 2002; Kramer, Shen et al. 2005; Ghosh, Johnson et al. 2006).

### 1.3.3.1 $\alpha 3\beta 1$ -Integrin

Das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin kann mit einer Vielzahl von Membranproteinen wie Laminin, Kollagen IV und Fibronectin interagieren. Eine Interaktion mit Laminin-5, welches einen wichtigen Bestandteil der epithelialen Basalmembran darstellt, ist nur  $\alpha 3\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 4$  möglich. Das Vorhandensein von  $\alpha 3\beta 1$  in Fokalkontakten spricht für seine Beteiligung an schneller Adhäsion sowie Migration von Zellen innerhalb des Epithelzellverbandes. In "quiescent" Keratinozyten ist eine vermehrte polarisierte Expression von  $\alpha 6\beta 4$  in den Hemidesmosomen zu verzeichnen, wohingegen die Expression von  $\alpha 3\beta 1$  an den Zell-Zell-Kontakten zu finden ist (Giannelli, Astigiano et al. 2002). Bei migratorischem Phänotyp ist das Expressionsmuster völlig verändert, sodass an den basalen Flächen eine Expression von  $\alpha 3\beta 1$  und Disassemblierung der Hemidesmosomen zu erkennen ist. Die Mechanismen dieses Phänomens sind bislang ungeklärt, zeigen aber deutlich einen *cross-talk* zwischen den beiden Integrinen.

Diese beschriebene Alteration der Polarität des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins ist auch in verschiedenen Karzinomen sichtbar. So ist eine vermehrte Expression des Integrins an den terminalen Enden der invadierenden Karzinomen und Melanomen zu verzeichnen, welches auf seine mögliche Rolle bei der Zellmotilität hinweist. (Mueller, Gherzi et al. 1999; Plopper, Domanico et al. 1998). Untersuchungen an Gliom-, Melanom- und Kolonkarzinomzelllinien zeigten nach Inhibition von  $\alpha 3\beta 1$  eine verminderte Invasivität und Motilität der Zellen durch Matrigel und auf Laminin-5 (Melchiori, Mortarini et al. 1995; Stallmach, von Lampe et al. 1992; Fukushima, Ohnishi et al. 1998). Im Gegensatz hierzu zeigen Untersuchungen an

Adenokarzinomen der Lunge eine Korrelation erhöhter Invasivität bei verminderter  $\alpha 3\beta 1$ -Expression (Adachi, Taki et al. 1998).

Als Besonderheit von  $\alpha 3\beta 1$  gilt seine Beteiligung an der Signaltransduktion und Regulation verschiedenster Zellfunktionen auch ohne ECM-Ligation (Giannelli, Astigiano et al. 2002).

In der Formation und Progression von Plattenepithelkarzinomen ist die Rolle des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins noch ungeklärt; es existieren jedoch Hinweise für einen Einfluss auf Zellformation und -motilität auch in dieser Tumorentität (Mercurio, Rabinovitz et al. 2001; Owens, Watt 2001).

### 1.3.3.2 $\alpha 6\beta 4$ -Integrin

Das  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin stellt einen essentiellen Bestandteil epithelialer Hemidesmosomen dar und scheint eine Schlüsselrolle in der Ausbreitung invasiver Karzinome zu spielen, da es vorzugsweise an der Spitze invadierender Anteile zu finden ist (Giannelli, Astigiano et al. 2002; Jin, Varner 2004). Zur Ausbildung von funktionierenden Hemidesmosomen bzw. zur Gewährleistung der Signalübertragung ist ein *Clustering* der Integrine notwendig (Litjens, de Pereda et al. 2006; Dogic, Rousselle et al. 1998; Gilcrease 2006).

Laminin ist ein bevorzugter Ligand von  $\alpha 6\beta 4$ , sodass das Aktinzytoskelett mit der Basalmembran verknüpft wird. Somit wird ein entscheidender Beitrag zur Stabilisierung und Organisation der epithelialen Architektur geleistet (Mercurio 2001). Verdeutlicht wird diese Eigenschaft durch die Beobachtung, dass Defekte der  $\beta 4$ -Untereinheit sowohl in  $\beta 4$ -defizienten *knock-out*-Mäusen als auch beim Menschen zu epidermaler Blasenbildung bis zu vollständiger Ablösung der Epidermis führen (Vidal, Aberdam et al. 1995; Dowling, Yu et al. 1996; Ryan, Christiano et al. 1996). Weiterhin kann  $\alpha 6\beta 4$  durch Polymerisation des Zytoskeletts Zellformveränderungen und die Ausbildung von Lamelli- und Filopodia induzieren (Lipscomb, Mercurio 2005). Gleichzeitig können intrazelluläre Signalmoleküle aktiviert werden, welche die chemotaktische Zellmigration und die Ausbildung und Stabilisierung der erwähnten Zellausläufer fördern (Rabinovitz, Mercurio 1997; O'Connor 2001; Horwitz, Parsons 1999; Rabinovitz 2001). Ebenso wird ein *cross-talk* zwischen



$\alpha 6\beta 4$  und  $\alpha 3\beta 1$  vermutet, da bei Dislokation von  $\alpha 6\beta 4$  aus den Hemidesmosomen eine Hochregulierung von  $\alpha 3\beta 1$  mit Stimulation der Zellmigration auf Laminin zu verzeichnen ist (Litjens 2006; Santoro 2003; Russell, Fincher et al. 2003).

Eine verstärkte Expression des Integrins  $\alpha 6\beta 4$  konnte vielfach für eine Tumorprogression verantwortlich gemacht werden, wie Studien über Plattenepithel- und Ovarialkarzinome zeigen (Kimmel, Carey 1986; Maschler 2005). In einer prospektiven Studie mit 119 Frauen, die an einem invasiven Mammakarzinom erkrankt waren, wurde die Expression der Integrinuntereinheit  $\alpha 6$  mit verminderter Überlebenszeit korreliert. Es wurde beobachtet, dass Patientinnen, deren Tumor keine  $\alpha 6$ -Expression (24 %) aufwies, nicht an der Erkrankung verstarben (Friedrichs, Ruiz et al. 1995). Es lässt sich annehmen, dass durch Modulation der Integrinexpression eine Alteration der Tumormalignität im Sinne einer Progression oder Regression zu erreichen ist. Die Invasivität von Prostatakarzinomzellen wurde durch  $\alpha 6\beta 4$ -supprimierende Androgenrezeptorexpression vermindert (Bonaccorsi, Carloni et al. 2000). In Mammakarzinomzellen konnte eine starke Hemmung von Migration und Invasion erreicht werden, indem die  $\alpha 6$ - und  $\beta 4$ -Integrinuntereinheiten durch spezifische siRNA ausgeschaltet wurden (Lipscomb, Dugan et al. 2003). Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass eine Veränderung der Integrinexpression einen zukunftsweisenden Schritt in der Therapie von Tumorerkrankungen darstellt.

#### 1.4 Modulierende Agenzien

Im Hinblick auf den entscheidenden Einfluss der Zelladhäsionsmoleküle auf Tumorwachstum und Metastasierung erscheint es sinnvoll, hier nach modulierenden Agenzien zu suchen (Jin, Varner 2004). Langjährige Erfahrung und exzellente Studien mit adjuvanten Therapeutika, wie z.B. Tamoxifen und ICI 182,780, liegen für hormonsensitive Tumoren wie z.B. Mammakarzinom vor (Russo, Hasan Lareef et al. 2003; Robertson, Semiglazov et al. 2006; Perey, Paridaens et al. 2006; Howell 2006). Hier zeigt sich u.a. ein Einfluss der Therapeutika auf Zelladhäsionsmoleküle und das Tumorwachstum (Hoffmann 2002; Yang, Cheng et al. 1999). Grundlage für das Verständnis der Wirkweisen dieser adjuvanten Agenzien ist die Kenntnis der Wirkung von Östrogen auf die Zielzelle abhängig von deren zell- und gewebetypischem Aufbau. Weitgehend unerforscht sind bislang die

Wirkmechanismen von Estradiol, Tamoxifen (TAM) und ICI 182,780 (ICI) auf nicht primär hormonsensitive Zellen wie z.B. die Plattenepithelzellen des Mundes. Die Verwendung des Begriffes SERM (selektive Östrogenrezeptor-modulierende Therapeutika) für Substanzen wie Tamoxifen und ICI 182,780 kann im folgenden Text auftreten.

### 1.4.1 Estradiol und Östrogenrezeptoren

Das Geschlechtshormon Estradiol (Abb. 1.5) ist eines der wichtigsten natürlichen Östrogene, dessen Synthese aus Cholesterol im Ovar und der Plazenta, und in geringen Mengen auch in der Nebenniere und im Hoden, erfolgt. Estradiol reguliert Zellwachstum, Differenzierung und die Funktion reproduktiver Gewebe (Neumann, Schenck 1990; Nelson, Bulun 2001; Giguere, Yang et al. 1988).

#### **Estradiol**

Molmasse: 272,39  
Summenformel:  $C_{18}H_{24}O_2$

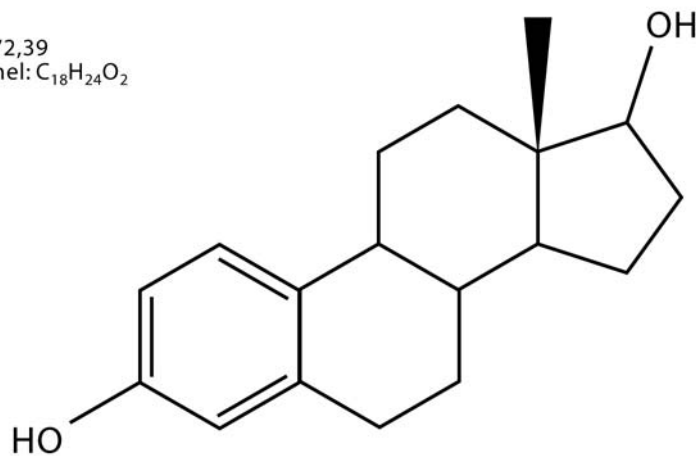


Abb. 1.5 Die Darstellung von 17- $\beta$  Estradiol, welches zu der Gruppe der Steroidhormonen zählt.

Seine Wirkung entfaltet Östrogen klassischerweise über nukleäre Rezeptoren mit Aktivierung der Transkription spezifischer Zielgene. Hierzu muss Estradiol in die Zielzelle gelangen und an den Östrogen-Rezeptor (ER) binden (Matthews, Gustafsson 2003; Gronemeyer, Gustafsson et al. 2004). Bis zum Jahr 1995 war

lediglich ein nukleärer ER bekannt, nach Entdeckung eines zweiten Rezeptors (ER $\beta$ ) erfolgte die Umbenennung des ersten Rezeptors in ER $\alpha$  (Greene, Gilna et al. 1986; Webb, Lopez et al. 1995). Beide Rezeptoren zeigen unterschiedliche Transkriptionseigenschaften und unterschiedliche Ligandenspezifität (Paech, Webb et al. 1997; Harrington, Sheng et al. 2003)(Abb. 1.6).

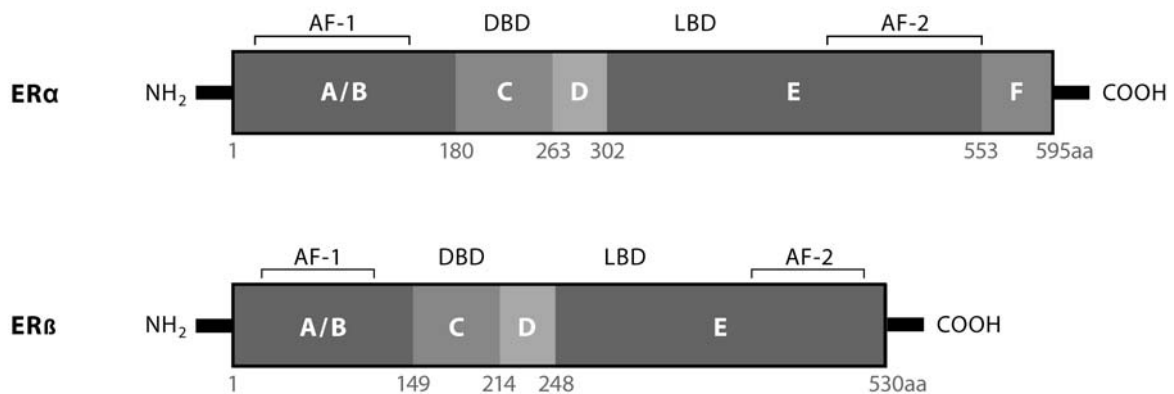
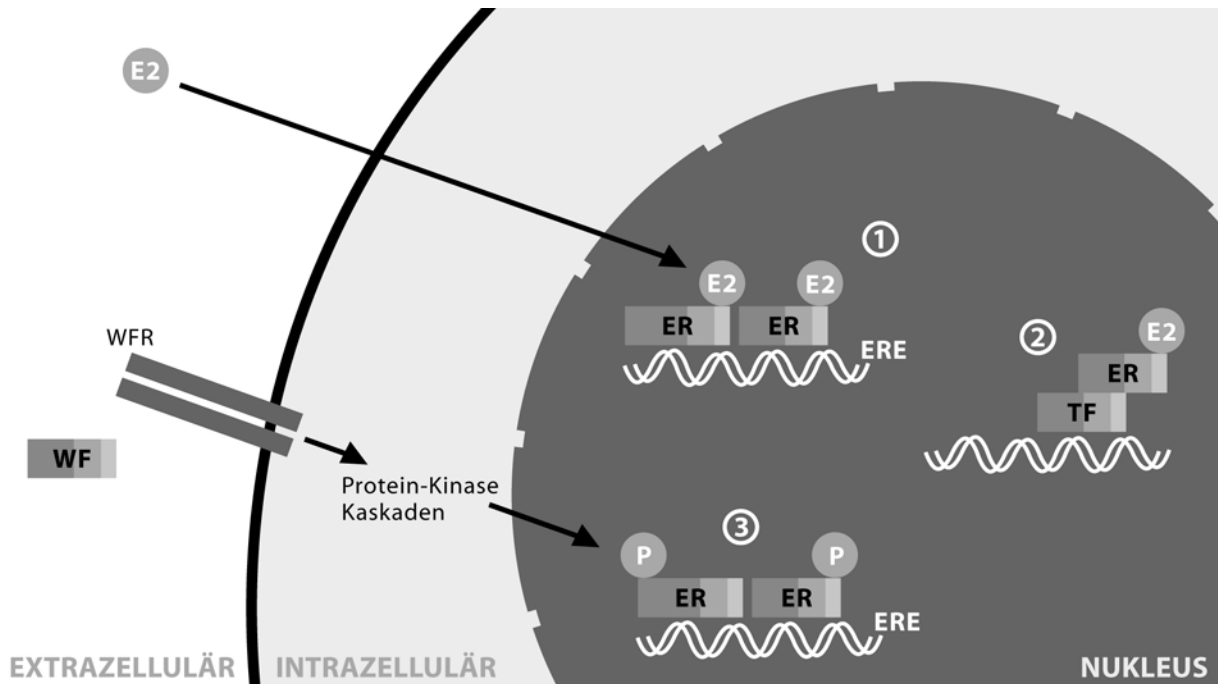


Abb. 1.6 Funktionelle Domänen des ER $\alpha$  und ER $\beta$ . Die ER besitzen 6 distinkte funktionelle Domänen A-F, gezeigt vom Amino- bis Carboxyterminus. Die A/B-Domäne stellt die hormonunabhängige Transkriptions-Aktivierungsfunktion 1 (AF1) dar. Die C-Domäne korrespondiert mit der hoch konservierten DNA-Bindungsdomäne (DBD), welche für die Bindung des Rezeptors an die ERE im Promoter der Zielgene verantwortlich ist. D ist eine „hinge region“. Die Kodierung der die Ligandenbindungsdomäne erfolgt im carboxyterminalen Bereich des Rezeptors durch hydrophobe Taschen, in denen E2 oder SERM binden können. Im Bereich der E-Domäne befindet sich auch eine zweite Transkriptions-Aktivierungsfunktion 2 (AF2), welche durch E2 oder synthetische Agonisten die Transkription von spezifischen Zielgenen aktivieren kann. ER $\alpha$  und ER $\beta$  zeigen eine 96%ige Homologie im Bereich der DBD, wohingegen im N-terminalen Bereich (AF-1) ein großer funktioneller Unterschied zwischen den Rezeptoren besteht.

Der mit dem Hormon besetzte ER bindet an eine spezifische Gensequenz: das sog. *Estrogen Response Element* (ERE), bestehend aus zwei invertierten Hexanukleotid-Repeats wodurch die Transkription ER-regulierter Gene aktiviert wird. Ebenso kann durch Bindung des ER an den Aktivator-Protein-1-Transkriptions-Faktor-Komplex (AP-1) eine Aktivierung der Zielgene erfolgen (Paech, Webb et al. 1997). Einige der Wirkungen von Estradiol entfalten sich schneller, als es durch RNA- und Proteinsynthese möglich ist. Diese werden als nicht-genomische Wirkweisen bezeichnet und resultieren vermutlich aus einer Aktivierung unterschiedlicher Proteinkinasen über Bindung des Estradiol an membranäre Rezeptoren (Abb. 1.6) (Losel and Wehling 2003; Wehling, Schultz et al. 2006) (Abb. 1.7).

A.



B.

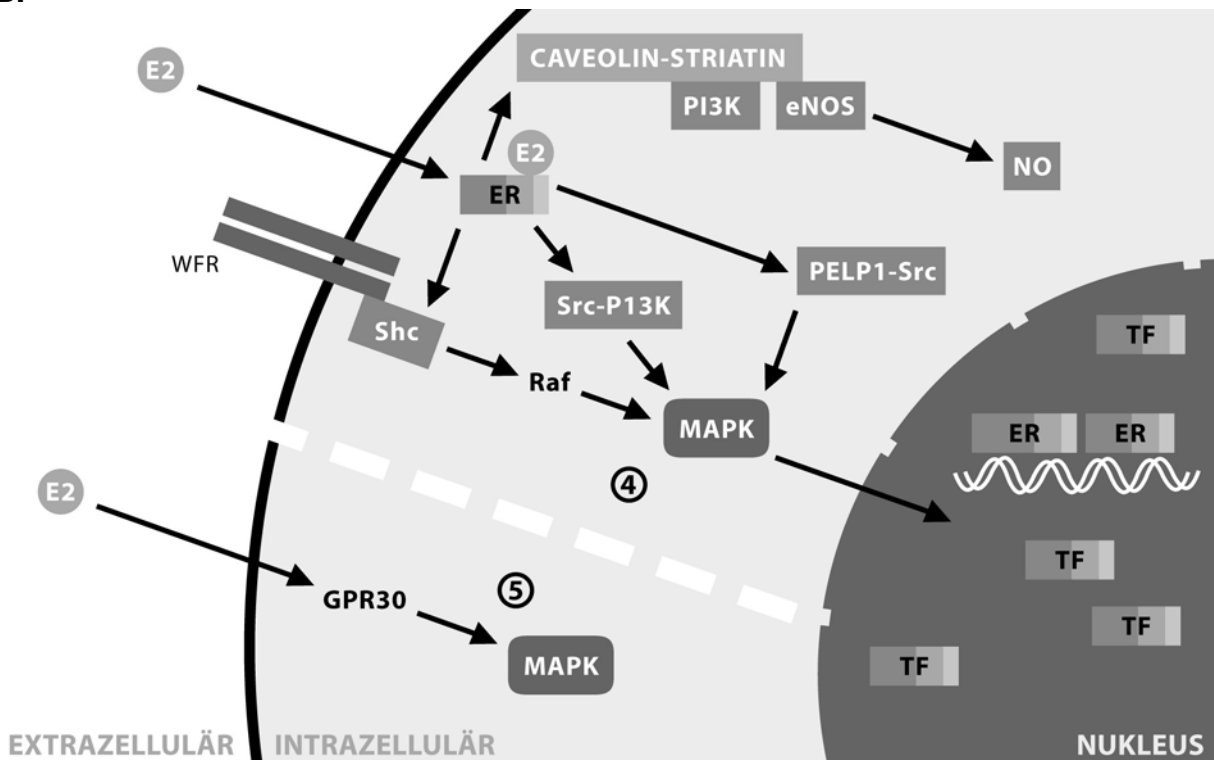


Abb. 1.7 **A.** Schematische Darstellung des Östrogenrezeptors und die Wirkweise von Estradiol. 1. Klassische Wirkweise von E2 (Estradiol), es bindet an ER im Nucleus und bindet an spezifische „Response-Elemente“ in den Promoterregionen von Zielgenen, den sog. ERE (Östrogen-Response-Element). 2. ERE-unabhängige genomische Wirkweise durch Bindung des E2-ER-Komplexes an einen Transkriptionsfaktorkomplex (TF), welcher Promoterregionen im Zielgen aktiviert. 3. Liganden-unabhängige genomische Aktivierung durch Phosphorylierung des ER und anschließender Bindung an ERE. Dieser Weg wird meist durch Wachstumsfaktoren aktiviert. **B.** 4. Non-genomische Aktivierung durch nicht nukleäre klassische Rezeptoren. Dies kann durch Phosphorylierung eines TF in Zielgenen erfolgen, hierzu bindet E2 an membranäre ER's. 5. Non-genomische und genomische Aktivierung durch nicht-klassische Rezeptoren, die ihre Wirkung über Proteinkinasen entfalten.

Generell kann Steroidhormonen eine entscheidende Bedeutung bei der Entwicklung von epithelialen Tumoren beigemessen werden (MacCalman, Brodt et al. 1994; MacCalman, Farookhi et al. 1994; Hopert, Beyer et al. 1997). Untersuchungen an humanen epithelialen Tumoren im Bereich der Brust haben ergeben, dass das Wachstum von einem Drittel der Tumore durch Östrogene stimuliert wird, und somit diese Tumore einer Therapie mit Antiöstrogenen zugänglich sind (El Khissiin, Cleeren et al. 1997; Tonetti, Jordan 1997). Ein Einfluss von Östrogenen auf die Zellen der Mundschleimhaut ist durch Beobachtungen von mukosalen Veränderungen wie Hyperplasien und Auftreten von pyogenen Granulomen bei schwangeren Frauen bekannt (Felgentreff, Ittrich et al. 1980; Reynolds, Aberdeen et al. 2004). Östrogene modulieren die epitheliale Maturation in klassischen Zielorganen. Ähnliches scheint auch für die orale Schleimhaut zuzutreffen, da bei einem Abfall des Östrogenspiegels, wie z.B. in der Menopause, häufig die Ausbildung eines atrophischen, dünnen Epitheliums resultiert (Forabosco, Criscuolo et al. 1992). Ebenso wird vermutet, dass Östrogene einen Einfluss auf die Speichelbildung besitzen (Leimola-Virtanen, Salo et al. 2000; Valimaa, Savolainen et al. 2004). Es gibt einige wenige Studien, die einen Nachweis über das Vorhandensein von Östrogen-Rezeptoren in der Mundschleimhaut erbringen; in diesen wird das vermehrte Vorhandensein von ER $\beta$  aufgezeigt (Leimola-Virtanen, Salo et al. 2000; Valimaa, Savolainen et al. 2004). Bislang konnte in limitierten Studien gezeigt werden, dass beide Rezeptortypen auch in Plattenepithelkarzinomen vorkommen (Kim, Lee et al. 2007; Nelson, Helmstaedter et al. 2006). Der Wirkmechanismus der Hormone auf die Zellen der Mundschleimhaut ist bis heute ungeklärt.

### 1.4.2 Tamoxifen

Chemisch handelt es sich bei Tamoxifen um ein nicht-steroidales Therapeutikum, ein Triphenylethylen mit antiöstrogener Wirkung durch kompetitive Hemmung der Bindung von Östrogenen am Rezeptor (Abb. 1.8). Tamoxifen ist ein sog. „selektiver Östrogen Rezeptor Modulator“ (SERM), d.h. es stellt keinen reinen Östrogen-Antagonisten dar, sondern zeigt zell- und gewebeabhängig agonistische Eigenschaften (Katzenellenbogen, Katzenellenbogen 2002). Die Selektivität der Wirkung ist vermutlich von dem Vorhandensein von spezifischen Co-Repressoren bzw. Co-Aktivatoren am ligierten ER-Komplex der zu regulierenden Gensequenz der Zielzelle abhängig (Katzenellenbogen, Frasor 2004; Lewis 2005).

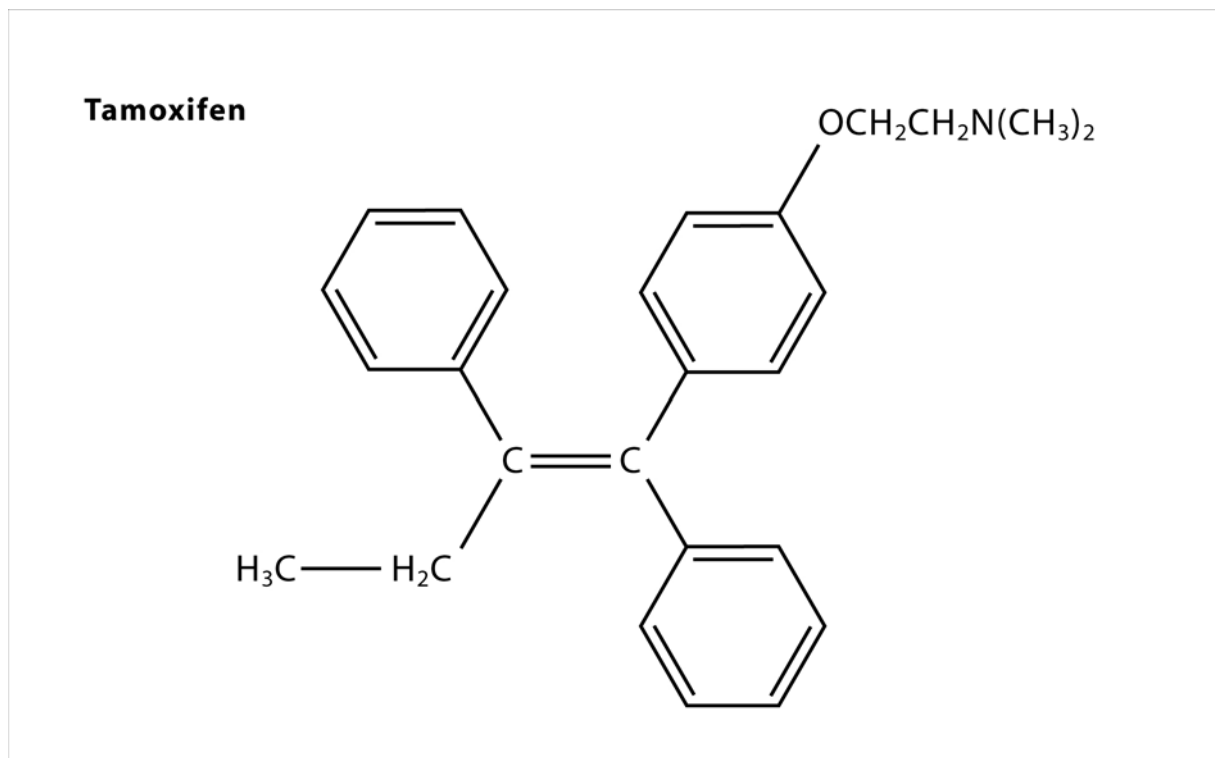


Abb. 1.8 Strukturformel von Tamoxifen, dessen chem. Bezeichnung (Z)-2-[4-(1,2 Diphenyl-1-butenyl)phenoxy]-N,N-dimethylethylamin lautet.

Es handelt sich bei Tamoxifen um ein anerkanntes adjuvantes Therapeutikum bei der Behandlung von Mammakarzinomen (Osborne, Zhao et al. 2000). In jüngerer Zeit findet es auch Eingang in die adjuvante Behandlung von Melanomen (Atallah, Flaherty 2005). Sein möglicher anti-tumoraler Effekt auf Zellen des Colon, der

Lunge und Gliome wird derzeit untersucht (Hui, Zhang et al. 2004; Yang, Cheng et al. 1999). Untersuchungen zum Einfluss von Tamoxifen auf orale maligne Plattenepithelzellen beschränkten sich bislang auf den Nachweis einer Wachstumsinhibition und Induktion von TGF  $\beta$ 1 (Hoffmann, Bojar et al. 2002; Kim, Lee et al. 2007; Shapira, Virolainen et al. 1986; Tavassoli, Soltaninia et al. 2002). Es ist bekannt, dass Tamoxifen modulierende Einflüsse auf die Zell-Zell-Adhäsion und die Integrine ausübt (Saintier, Burde et al. 2004; Yang, Cheng et al. 1999).

### 1.4.3 ICI 182,780

ICI 182,780 (ICI) steht für Imperial Chemical Industries 182,780 und ist auch unter dem Handelsnamen Faslodex® bekannt; es handelt sich um ein Estradiolderivat mit einer langen hydrophoben Seitenkette an der 7-alpha-Kette (Abb. 1.9). Es besitzt ein rein antiöstrogenes Profil mit einem im Vergleich zu anderen SERMs unterschiedlichen Wirkmechanismus. ICI blockiert den Östrogenrezeptor an AF-1 und AF-2 und verhindert dessen Dimerisierung, hierdurch erfolgt die Degradation des ER mit resultierender Reduktion des zytosolischen ER-Gehalts. Dies stellt einen der wichtigsten auf ICI zurückzuführenden Mechanismen dar. (Chang, Osborne 2002; Osborne, Wakeling et al. 2004; Ohmichi, Tasaka et al. 2005). ICI galt bislang als reiner Östrogenrezeptorantagonist, in jüngster Zeit konnte jedoch eine agonistische Wirkung von ICI über nicht-klassische Rezeptoren nachgewiesen werden (Filardo, Thomas 2005; Wehling, Schultz et al. 2006).

Bis dato existieren keinerlei Untersuchungen über die Wirkweise von ICI auf Zellen des oralen Epithels.

**Faslodex®**  
Estradiolderivat

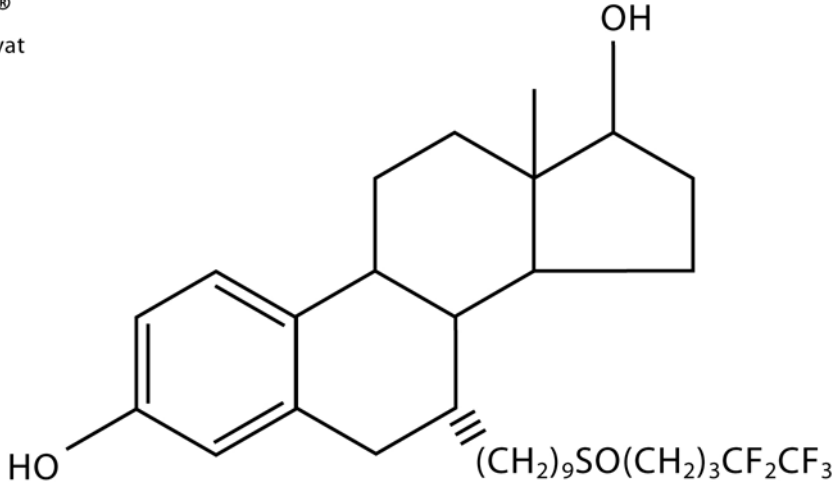


Abb. 1.9 Graphische Darstellung der Strukturformel des selektiven Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182,780.



## 1.5 Fragestellung

1. Bislang existierten in der Literatur lediglich Informationen über den Einfluss von Tamoxifen auf das Wachstumsverhalten von PECA-Zellen *in vitro*. Der Einfluss von Agonisten aus der Wirkstoffgruppe der Steroidhormone (Estradiol) und deren selektiven Antagonisten (ICI 182,780) auf das Wachstum der Zellen von Plattenepithelkarzinomen wurde bislang nicht untersucht.

Das Proliferationsverhalten von PECA-Zellen *in vitro* nach Administration von Estradiol und ICI182,780 sollte in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden.

Hierzu wurden Proliferationsassays mit verschiedenen PECA-Zelllinien und einer Mammakarzinomzelllinie als Kontrolle unter Administration der Wirkstoffe durchgeführt.

2. Es ist bekannt, dass das Proliferationsverhalten von epithelialen Tumorzellen von der Fähigkeit zur Zelladhäsion und dem Bindungsvermögen der Zellen an Proteine der extrazellulären Matrix abhängig ist; hieran sind spezifische Proteine, deren Modulation durch die oben erwähnten Therapeutika bislang ungeklärt ist, beteiligt. Zu Beginn der Untersuchung lagen keine Erkenntnisse über die Wirkung von Estradiol, Tamoxifen und dem Östrogenrezeptorantagonisten ICI182,780 auf das Zell-Zell-Adhäsionsverhalten und das Zell-ECM-Verhalten von PECA-Zellen *in vitro* vor.

Die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion sowie Veränderungen der assoziierten Proteine von PECA-Zellen *in vitro* wurden unter Gabe von Estradiol, Tamoxifen und ICI182,780 untersucht .

Die adhäsiven Eigenschaften wurden durch entsprechende Assays dargestellt. Ebenso erfolgte die Untersuchung der Expression und Translation der an diesen Vorgängen beteiligten Proteine sowie deren Beteiligung an der Bildung funktionaler Proteinkomplexe.

3. Der Einfluss von Steroidhormonen auf zelluläre Vorgänge ist gegenwärtig Gegenstand der wissenschaftlichen Untersuchungen und für Zellen des Mammakarzinoms bereits gut dokumentiert. Hierbei waren auch Wirkstoffe, welche eine selektiv antagonistische Wirkung haben, Gegenstand der Untersuchungen.

Das Vorhandensein von Östrogenrezeptoren in PECA-Zellen war bislang nicht untersucht, ebenso wenig lagen Erkenntnisse über deren mögliche Beteiligung an den vorgenannten zellulären Vorgängen vor.

In der vorliegenden Arbeit soll die Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus und dessen mögliche Einwirkung auf das Zell-Adhäsionsverhalten der betreffenden Zellen dargestellt werden.

Die Expression möglicher Östrogenrezeptoren in den Zellen der PECA-Zelllinien wurde auf RNA-Ebene durchgeführt und deren mögliche Rolle anhand der unter Punkt 1 und 2 gefundenen Veränderung durch Administration der Wirkstoffe diskutiert.

## 2. Material und Methode

### 2.1 Zelllinien

#### 2.1.1 Plattenepithelkarzinomzellen

Die verwendeten Zellen waren humane Plattenepithelkarzinomzellen (PECA), etabliert von einer weiblichen Patientin und deren Rezidivtumoren, sie stellen somit die Progression eines Tumors dar. Die genauen Charakteristika sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Bislang war der ER-Status der Zelllinien unbekannt.

Tabelle 2.1 Charakterisierung der verwendeten Zelllinien; S: chirurgische Resektion; RT: Radiatio; CX: Chemotherapie; \* die CX erfolgte mit 5-Fluorouracil, Velbam und Methotrexat ohne Erreichen einer Rezidivregression {Carey, 1994 #159; Sutherland, 1999 #163}

Zelllinie	Alter	Differenzierungsgrad	Charakterisierung Zelllinie
<b>UM-SCC-14A</b>	58 Jahre	Mäßig bis schlecht differenziert	Mundbodenrezidiv/ bisherige Therapie: S
<b>UM-SCC-14B</b>	59 Jahre	Schlecht differenziert	Mundbodenrezidiv/ bisherige Therapie: S, RT und S
<b>UM-SCC-14C</b>	59 Jahre	Schlecht differenziert	Mundbodenrezidiv/ bisherige Therapie: S, RT, S und CX*

Die Zelllinien wurden von Prof. T. E. Carey, Michigan Universität, USA zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2 Mammakarzinomzellen

Zwei humane Tumorzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden als Kontrolle verwendet. Bei der Wahl der Zelllinien wurde darauf geachtet, dass das Wachstumsverhalten und der Östrogenrezeptor-Status bekannt sind. MCF-7 exprimiert in hohem Maße ER $\alpha$  und nur zu einem geringen Teil ER $\beta$ , wohingegen MDA-MB-231 keinen ER aufweist. Ebenso zeigt die Zelllinie MDA-MB-231 keine

E-Cadherin-Expression und dient somit zur Negativkontrolle. Die Zelllinien wurden von ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) bezogen und deren Eigenschaften sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2 Charakterisierung der verwendeten Zelllinien (ER=Östrogenrezeptor) {Carey, 1994 #159; Sutherland, 1999 #163}

Zelllinie	Alter	ER Status	Charakterisierung Zelllinie
<b>MCF-7</b>	69 Jahre	ER $\alpha$	Infiltrierendes duktales Mammakarzinom aus einem Primärtumor
<b>MDA-MB-231</b>	51 Jahre	ER nicht vorhanden	Infiltrierendes duktales Mammakarzinom aus einem Primärtumor

### 2.1.3 Bakterienstamm

Bei dem in dieser Arbeit zur Durchführung des Northern Blots verwendeten, chemisch kompetenten Bakterienstamm *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, USA) handelt es sich nach den Angaben des Herstellers um folgenden Genotyp: *F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG*.

## 2.2 Zellkultur- und Versuchsmedien

Zur Kultivierung der Zelllinien MCF-7, UM-SCC 14A, UM-SCC 14B und UM-SCC 14C wurden die in Tabelle 2.3 genannten Medien eingesetzt. Zur Vermeidung einer möglichen Wirkung der im FKS befindlichen Hormone wurde 22 Stunden (Medium 22STD) und 2 Stunden (Medium 2STD) vor den Versuchen die Zusammensetzung der Medien verändert. Aufgrund der bekannten östrogenen Eigenschaften von Phenolrot wurde zu Versuchsbeginn phenolrotfreies Medium eingesetzt. Die Kohlebehandlung des fetalen Kälberserums erfolgte zur Extraktion der im Serum befindlichen Hormone, sodass eine Hormoneinwirkung außer der der applizierten Hormone auszuschließen war.

Tabelle 2.3 Zusammensetzung der *Medien zur Zellzüchtung* für die Zelllinien MCF-7, UM-SCC 14A, 14B und 14C; *Strep*: Streptomycin; *kohlebeh.*: kohlebehandelt

<b>Medium zur Zellzüchtung</b>	<b>Medium 22 Stunden vor Versuchsbeginn (22STD)</b>	<b>Medium 2 Stunden vor Versuchsbeginn (2STD)</b>
<b>DMEM/ F12</b> (500 ml) • mit L-Glutamin • mit 15 mM Hepes Buffer • mit Phenolrot	<b>DMEM/ F12</b> (500 ml) • mit L-Glutamin • mit 15 mM Hepes Buffer • ohne Phenolrot	<b>DMEM/ F12</b> (500 ml) • mit L-Glutamin • mit 15 mM Hepes Buffer • ohne Phenolrot
+ 10% FKS (50 ml) + 1% Penicillin (50U/ml)/ Strep (50µg/ml) (5 ml)	+ 10% FKS kohlebeh. (50 ml) + 1% Penicillin (50U/ml)/Strep (50µg/ml) (5 ml)	+ 1% Penicillin (50U/ml)/Strep (50µg/ml) (5 ml)

MDA-MB-231 wurde wie oben benannte Zellkulturen behandelt, jedoch wurde als Medium RPMI anstatt DMEM eingesetzt.

Den Versuchsmedien *Medium 22STD* und *Medium 2STD* wurden außerdem die jeweilige Menge 17-β-Estradiol, ICI 182,780 oder Tamoxifen zugesetzt (Tab. 2.4). Die Lösung der Wirksubstanzen erfolgte in Ethanol in einer 5mM Konzentration. Anschließend wurden sie als Stocklösung bei -20° gelagert. Ein Einfluss der Trägersubstanz Ethanol auf die Versuche wurde in Kontrollversuchen ausgeschlossen.

Tab. 2.4 Hormonkonzentrationen in den *Medien 22STD* bzw. *2STD*.

<b>Hormon/ Antihormon</b>	<b>Konzentration der Stocklösung</b>	<b>Zusatz zu 10 ml <i>Medium 22STD</i> bzw. <i>Medium 2STD</i></b>	<b>Endkonzentration in <i>Medium 22STD</i> bzw. <i>Medium 2STD</i></b>
<b>17-β-Estradiol</b>	50 mg/ 3,67 ml Aqua <sub>bidest.</sub> = 5 mM	2 µl	1 µM
		10 µl	5 µM
<b>ICI 182,780</b>	10 mg/ 3,29 ml 100% Ethanol = 5 mM	2 µl	1 µM
		10 µl	5 µM
<b>Tamoxifen</b>	100 mg/ 35,48 ml 100 % Ethanol = 5 mM	2 µl	1 µM
		10 µl	5 µM

## 2.3 Zellkultur

Die humanen Tumorzelllinien wurden als subkonfluente adhärenente Monolayerkulturen in *Medium zur Zellzüchtung* kultiviert und in einem Zellkulturschrank bei 37°C und 95% O<sub>2</sub> in Gegenwart von 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte in 2-3tägigem Rhythmus, wobei eine mikroskopische Beurteilung der in den Zellkulturschalen (Ø 10cm) befindlichen Zellen bezüglich der Zelldichte oder sonstiger Auffälligkeiten durchgeführt wurde. Eine Passagierung der Zellen erfolgte bei 70-90%iger Konfluenz, die enzymatische Ablösung der Zellen erfolgte mit 0,05% Trypsin (w/v) und 0,02% EDTA (w/v) (Biochrom). Zur Passagierung und zum Ansatz der Zellen für ein Experiment wurde die Zellzahl mittels einer Zählkammer nach Neubauer unter einem Durchlichtmikroskop von Olympus ermittelt und in der gewünschten Zahl kultiviert.

Die Arbeiten fanden unter einer sterilen Zellkulturbank mit sterilen Lösungen statt. Die verwendeten Kulturen wurden mittels PCR regelmäßig auf Mykoplasmenkontamination getestet (VenorGem, Minerva Biolabs, Germany).

## 2.4 Methoden zur phänotypischen Charakterisierung

### 2.4.1 Proliferationsanalyse

Um das Wachstumsverhalten der Zellen zu bestimmen, wurden diese in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen in 10 ml ausgesät. Die Zellschalen wurden in sieben Behandlungsgruppen unterteilt, die sich wie folgt zusammensetzen: eine unbehandelte Kontrolle und E2, TAM und ICI in den Konzentrationen 1 und 5µM. Jeweils 9 Zellschalen wurden je Gruppe eingesetzt, dies resultierte in insgesamt 49 Kulturschalen je Versuch, wovon an den Tagen 2, 4 und 6 jeweils drei Zellschalen der Gruppe zur Auswertung herangezogen wurden. Ab Versuchsbeginn wurde Medium 22STD ohne/mit Zusatz von E2, TAM oder ICI in den Konzentrationen 1 und 5µM eingesetzt, zu den gleichen Bedingungen erfolgte auch der 2-tägige Mediumwechsel bis zum Tag 6. Zu den Messzeitpunkten 2, 4, 6 (Tage) erfolgte die Quantifizierung der Zellzahl mit dem Zellzähler CASY® Schaerfe System, Germany, hierfür wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und in eine isotonische Lösung (Casyton®) überführt. Die Experimente wurden drei Mal wiederholt.

Das zur Zählung der Zellzahl verwendete Messgerät basiert auf der Verbindung eines Verfahrens der Partikelmessstechnik, dem sog. „Widerstandsmessprinzip“, mit einer Methode der Signalauswertung, der sog. „Pulsflächenanalyse“. Die zu zählenden Zellen werden in einer elektrolytischen Lösung durch eine Kapillare mit definierter Geometrie angesaugt. Während der Messung wird eine Spannung zwischen zwei Platinelektroden angelegt, die elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen elektrischen Widerstand dar, welcher bei Durchtritt einer Zelle entsprechend verändert wird.

Diese Widerstandsänderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Aus den Einzelmessungen wird das Integral des Messsignals berechnet und die ermittelten Signalfächen werden in einem Vielkanalanalysator akkumuliert. Aus der volumenlinearen Originalverteilung wird eine durchmesserlineare Größenverteilung mit einer Auflösung von 200 Kanälen berechnet. Alle weiteren Messparameter werden auf der Basis dieser Verteilung ermittelt.

#### **2.4.2 Zell-Zell-Adhäsion**

Zur Bestimmung der Zell-Zell-Adhäsionsfähigkeit wurde ein sog. „Fast Aggregation Assay“ nach Boterberg (Boterberg, Bracke et al. 2001) durchgeführt.

Zur numerischen Evaluation der Zell-Zell-Adhäsion wird es behandelten und unbehandelten in einem 5ml Polystyrene Rundbodenröhrchen (Falcon) „vereinzelten“ Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ , in einem Thermomixer bei 30°C, erlaubt, für 30 min zu aggregieren. Die Anzahl der Partikel, d.h. der gebildeten Zell-Zell-Aggregate wurde mit einem CASY® Zellmessgerät in oben beschriebener Weise gemessen. Die Experimente wurden drei Mal wiederholt.

### 2.4.3 Adhäsion der Zellen an Laminin-1

Die Haftfähigkeit der Zellen an das extrazelluläre Matrix (ECM)-Protein wurde mittels sogenanntem Adhäsionsassay bestimmt.

Hierzu wurden 100  $\mu$ l Laminin-1 (Sigma) auf eine 96-well Platte in einer Konzentration von 20 $\mu$ g/ml gelöst in PBS aufgetragen. Nach Trocknung der Matrixproteine über Nacht wurden, um unspezifische Bindungen der Zellen zu vermeiden, die Platten mit 1% BSA belegt, dass nach 1 Stunde durch Ausschlagen wieder entfernt wurde.  $4 \times 10^5$  Zellen wurden in jede Vertiefung eingebracht und für 90 min. bei 37,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nicht-adhärenente Zellen wurden durch Spülung mit PBS entfernt und die verbleibenden adhärenenten Zellen mit 0.5% Kristalviolett 30 min. gefärbt und anschliessend mit Aqua<sub>bidest</sub> gespült. Die Permeabilisation der Zellen erfolgte mit 0,1% Triton X100 mit einer Einwirkzeit von 12 Std.

Die optische Dichte der adhärenenten Zellen wurde mit einem Dynatech Reader bei 570 nm gemessen. Die angegebenen Werte sind als mean  $\pm$ SD von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's *t* Test.

## 2.5 Ermittlung der Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen und zellulären Rezeptoren

Unter Anwendung molekularbiologischer und zellbiologischer Methoden wurden sowohl Proteinexpression als auch messenger RNA-Level der Adhäsions- und Rezeptormoleküle der verschiedenen Zelllinien quantifiziert.

### 2.5.1 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Veränderung der Expression der Zelladhäsionsmoleküle wurde durch Immunfluoreszenz-Färbungen dargestellt. Die Zellen wurden auf in den Zellkulturschalen liegenden Deckgläschen gezüchtet. Es erfolgte eine Spülung der Deckgläschen mit gekühltem Phosphate Buffered Saline (PBS) zur Entfernung nicht-adhärenenter Zellen und Unreinheiten, danach wurden die Zellen mit einer



Lösung bestehend aus 1% Paraformaldehyd gepuffert in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Gibco) und 10mM Hepes (Pufferlösung) für 30 min. bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Die Permeabilisation wurde mit 0,3% Triton X-100/PBS durchgeführt. Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde eine Inkubation der Zellen mit einem 10%igen Blockpuffer (10% Ziegenserum (DAKO®), 0,1M Glycin in PBS) für 30 min bei RT durchgeführt. Nach dreimaliger Spülung der Präparate mit PBS wurden die Zellen für 60 min. bei RT in der Lösung mit dem Primärantikörper belassen. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundärem FITC-konjugierten Ziege anti-Maus/anti-Ratte IgG-Antikörper in einer feuchten abgedunkelten Kammer. Die abschliessende Einbettung erfolgte in ProLong™ Antifade Kit (Molecular Probes, Eugene, OR). Die Betrachtung und Erfassung morphologischer Veränderungen wurden an einem Zeiss Axiophot 2 Mikroskop durchgeführt.

### **2.5.2 Durchflusszytometrie**

Zur Quantifizierung der Oberflächenexpression wurden die Zellen im Durchflusszytometer untersucht. Hierfür wurden die vorbehandelten Zellen bei beschriebener Konfluenz mit 0,05% Trypsin (w/v) und 0,02% EDTA (w/v) (Biochrom) von den Zellkulturschalen abgelöst, und in einem 15ml Falconröhrchen in PBS incl. 0,5% BSA gesammelt und mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen in 5ml Polystyrene Rundbodenröhrchen aliquotiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (E-Cadherin und Integrin) erfolgte für 45 min bei 4°C. Nach dreimaliger Spülung der Zellen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem geeigneten FITC-konjugierten Antikörper für weitere 30 min bei 4°C. Direkt vor der Messung wurde Propidium Iodide (5µg/ml) zur Überprüfung der Vitalität zugegeben. Die Zellen wurden mit FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) analysiert.

### 2.5.3 Western Blot und Immunopräzipitation

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurden subkonfluente Lagen von Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit einem Disposable Cell Scraper vom Grund der Platte abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in einem 1,5ml Eppendorf-Hütchen mit Lysepuffer (50 mM Tris-HCL, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 1 % NP-40, 0,5 % Na-Desoxycholat, 0,1 % SDS mit Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany)) bei 4°C für 20 min. in einem Thermomixer lysiert. Der Überstand wurde gesammelt und bei 14000 rpm für 10 min. bei 4°C zentrifugiert und anschließend mit dem primären Antikörper (z.B. anti E-Cadherin MoAb oder β-Catenin (Transduction Laboratories, Lexington, KY) (2µg/ml)) bei 4°C für 12 Std. inkubiert.

#### 2.5.3.1 Messung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde eine Proteinstandardlösung (Albumin Standard, Pierce) mit einer Konzentration von 2mg/ml verwendet. Die Proteinstandardlösung wurde mit Aqua<sub>bidest</sub> verdünnt, um eine Standardkurve von 0-1,4mg/ml zu erhalten. Die Verdünnungsreihe und die zu bestimmenden Proben wurden auf Mikrotiterplatten aufgetragen und mit BCA (Protein Assay Reagent A and B von Pierce) in einer 1:50 Verdünnung 30 min bei 37°C inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 570nm mit einem Dynatech reader.

#### 2.5.3.2 Vorbereitung der Gele und Proben

Ein 7,5% SDS-Polyacrylamid Gel (15 ml Rothi 30, 12 ml Tris 1,875 M, 40µl 10%SDS 32ml Aqua<sub>bidest</sub>, 75 µl APS 10% und TEMED), das sog. Trenngel, wurde in einem „Gel Caster“ (Amersham Pharmacia Biotech) gegossen und mit 0,1% SDS, zum Erhalt einer glatten vollständig polymerisierten Oberfläche, überschichtet. Nach 1 Std. bei 4°C war eine vollständige Polymerisation des Gels erreicht, das SDS wurde entfernt und die Oberfläche mit Aqua<sub>bidest</sub> von den SDS-Resten gereinigt. Es erfolgte das Aufgießen des sog. Sammelgels, einem 4,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel (9 ml

Rothi 30, 6 ml Tris 1,25 M, 600µl 10%SDS, 44 ml Aqua dest., 25 µl APS 10% und TEMED) mit durch einen 10-zinkigen Kamm geformten Taschen zur Vorbereitung der Proben: Lysepuffer, Lysat und Probenpuffer (25µl Laemmli-Puffer, 3% Mercaptoethanol (v/v)) wurden in ein 1,5ml Eppendorf Röhrchen pipettiert und für 5 min. im Wasserbad erhitzt. Die Proben (30µg Protein) und der Molekulargewichtsmarker wurden gemäß üblichem Schema mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen eingefüllt und der Elektrophorese zugeführt.

Die Immunopräzipitation ist eine molekularbiologische Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Der Nachweis der Protein-Interaktion erfolgt bei einer IP *in vitro*, indem mit Hilfe eines Antikörpers ein bestimmtes Protein samt Interaktionspartner aus einem Proteingemisch heraus präzipitiert wird. In Abwandlung zum Western Blot wurde bei der Immunopräzipitation die mit primärem Antikörper inkubierte 50µg Protein beinhaltende Lösung mit Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) bei 4°C für 1Std. präzipitiert. Die Präzipitate wurden in Lysepuffer gewaschen, pelletiert und in Probenpuffer resuspendiert und bei 100° für 5 min. erhitzt. Aus dem durch Zentrifugation gewonnen Überstand wurden 20µl/Tasche verwendet und dann mit Hilfe der Elektrophorese aufgetrennt.

### **2.5.3.3 Gelelektrophorese und Proteintransfer**

Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120V und 4mA in einem Laufpuffer aus 114,2g Glycin, 30,3g Tris, 10g SDS ad 1,0l Aqua dest.

In einer Transferkammer (Mini Protean II Cell) wurden die Proteine unter Verwendung des Transferpuffers (58,4 g Glycin, 12,16g Tris, 400ml Ethanol ad 4,0l Aqua dest.) auf eine Nitrozellulose-Membran bei 220mA in ca. 50-60 min. transferiert.

### 2.5.3.4 Antikörperapplikation und Detektion der Proteinbande

Nach erfolgreichem Proteintransfer wurde die Membran für 5 min bei RT in 5% Trockenmilchpulver in PBS oder 3% Bovinem Serum Albumin (BSA) blockiert. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation mit dem zugehörigen Primär- bzw. bei Immunopräzipitation Sekundärantikörper (E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin,  $\beta$ 1-Integrin, Phosphotyrosin).

Die Detektion der Proteinbande erfolgte mit Hilfe der ECL-Methode (Amersham Corp, Arlington Heights, IL) auf einem Kodak X-OMAT AR Film. Eine quantitative Auswertung der Banden erfolgte nicht, es wurde lediglich der Nachweis des Vorhandenseins eines Proteins bzw. einer Protein-Protein-Interaktion angestrebt.

## 2.6 Darstellung der Proteinsynthese

Der Northern Blot ist eine molekularbiologische Methode zur Übertragung (Blotten) der in der Gelelektrophorese aufgetrennten RNA auf eine Membran (Nitrocellulose). Auf der Membran ist die spezifische Markierung von RNA-Sequenzen durch die Hybridisierung mit komplementären Sonden möglich. Hierdurch können Veränderungen der Synthese spezifischer Proteine dargestellt werden. Die quantitative *Real Time* Polymerase-Kettenreaktion basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und erlaubt zusätzlich eine Quantifizierung der PCR-Produkte. Beide Methoden erlauben, Veränderungen der Transkriptionsrate eines Proteins darzustellen.

### 2.6.1 Isolation und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Isolierung der zellulären Gesamt-RNA erfolgte bei 80%iger Konfluenz nach Spülung der Zellen mit PBS. Pro Petrischale wurden jeweils 2 ml *TRIzol*<sup>®</sup> Reagenz zugegeben und anschließend wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers verfahren. Nach abschließender Resuspension des RNA-Pellets in 50  $\mu$ l  $H_2O_{DEPC}$  erfolgte die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Spektrophotometer Gene Quant II. Dieses Gerät misst die Absorption der

Nukleinsäurelösung bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) und berechnet die Konzentration unter der Bedingung, dass eine  $OD_{260}$  von 1,0 einer Konzentration von 40  $\mu\text{g}$  RNA oder einzelsträngiger DNA bzw. 50  $\mu\text{g}$  doppelsträngiger DNA je  $\mu\text{l}$  Messlösung entspricht. Zur Qualitätssicherung wurde RNA oder DNA in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Klare Banden unter UV-Licht wiesen auf intakte Nukleinsäuren hin.

### 2.6.2 Reverse Transkription von RNA und Elektrophorese

Die Synthese von cDNA aus RNA erfolgte mit dem *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR*, wobei dem Herstellerprotokoll gefolgt wurde. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Die Auftrennung von RNA erfolgte in einem 1%-igen Agarosegel. Mittels Aufkochen wurde 1 g Agarose in 78,2 ml  $H_2O_{bidest.}$  und 4 ml 25xMOPS (5M MOPS, 12,5M Natrium-Acetat, 0,25M EDTA) gelöst. Nach kurzer Abkühlung wurden 17,8 ml 37 %iges Formaldehyd zugegeben. Nach Polymerisation in einem horizontalen Gelträger bei Zimmertemperatur erfolgte die Überschichtung mit 1xMOPS in einer Gelelektrophoresekammer. Die gewünschte Menge vakuumgetrockneter Gesamt-RNA wurde in RNA-Ladepuffer (57  $\mu\text{l}$   $H_2O_{bidest.}$ , 8  $\mu\text{l}$  25xMOPS, 100  $\mu\text{l}$  Formamid, 35  $\mu\text{l}$  37 %iges Formaldehyd, 1  $\mu\text{l}$  Ethidium-bromid) gelöst, bei  $70^{\circ}\text{C}$  denaturiert (10 min) und auf Eis inkubiert (2 min). Nach abschließender Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  RNA-Auftragepuffer (0,4% Bromphenolblau (w/v), 50% Glycerin (v/v), 10mM Natrium-Phosphat) erfolgte die Auftrennung der Proben bei 90 V. Die Sichtbarmachung der fluoreszierenden Gesamt-RNA erfolgte unter UV-Licht.

Bei geplanter Northern Blot-Analyse erfolgte die Überschichtung mit 24 ml 25xMOPS und 106,8 ml 37 %igem Formaldehyd ad 600 ml  $H_2O_{bidest.}$  Ethidiumbromid wurde ausschließlich dem Ladepuffer des RNA-Größenstandards zugesetzt.

### 2.6.3 Northern Blot

Nach elektrophoretischer RNA-Auftrennung (10-25 µg/ Probe) wurde das Gel mit 20xSSC (3M NaCl, 0,4M Na<sub>3</sub>-Citrat ad Aqua<sub>bideest</sub>) unter leichtem Schütteln äquilibriert; zuvor wurde die Wegstrecke des RNA-Größenstandards unter UV-Licht bestimmt. Der RNA-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte durch Aufwärtsdiffusion von 20xSSC über Nacht. Dabei wurde das Gel auf *Chromatographiepapier* gelagert, die dem Gel aufliegende Nitrozellulosemembran mit weiterem *Chromatographiepapier* und Zellstoff überschichtet und einem Wasserkolben beschwert. Nach Vakuumtrocknung (80 °C, 2 h) erfolgte die Lagerung der Membran bei Raumtemperatur.

Zunächst erfolgte eine Prähybridisierung der Nitrozellulosemembran in *ExpressHyb<sup>TM</sup> Hybridization Solution* in einem Hybridisierungssofen (58 °C, 30 min). Nach Zugabe von radioaktiv markierter, denaturierter DNA-Sonde erfolgte die Hybridisierung bei 58 °C über Nacht. Waschgänge à 30 Minuten schlossen sich an: zweimalig nichtstringent mit 2xSSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur und dreimalig stringent mit 0,1xSSC, 0,1 % SDS bei 55 °C. Die so erhaltenen Membranen wurden in Klarsichtfolie eingewickelt, einem Röntgenfilm (Kodak *BioMax* MS Film) aufliegend in einer Fotokassette bei -80 °C gelagert. Zur Sichtbarmachung der autoradiographischen Signale wurden die Filme nach ausreichender Zeit (Minuten bis Tage) entwickelt. Mittels des simultan aufgetrennten RNA-Längenstandards konnte die Größe der detektierten RNA abgeschätzt werden. Zur Enthybridisierung wurden die Membranen zweimalig in 0,1xSSC/ 0,1 % SDS auf 100 °C in einer Mikrowelle erhitzt. Nach Ausschluss radioaktiver Restspuren mittels eines Szintillations-Messgerätes konnte die Membran einer erneuten Hybridisierung zugeführt werden.

### 2.6.3.1 DNA-Agarosegelelektrophorese und Elution

Für ein 2 %iges Gel wurden 2 g *Agarose* in 100 ml *1xTAE* in einer Mikrowelle aufgekocht. Nach Zugabe von 2,5 µl *Ethidiumbromid* wurde das Gel in einen horizontalen Gelträger gegossen. Nach Abkühlung und Polymerisation wurde das Gel in einer Elektrophoresekammer mit *1xTAE* überschichtet. Pro 3 µl DNA-Probe erfolgte die Zugabe von 1 µl *DNA-Auftragepuffer*. Die Proben wurden in die Geltaschen eingebracht und bei 70 bis 80 V (ca. 90 min) aufgetrennt. Anschließend konnten die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Als Größenstandards wurden DNA-Leitern gleichzeitig aufgetrennt. Die Elution von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit*, wobei nach den Angaben des Herstellers gearbeitet wurde. Abschließend wurde die DNA in 30µl Puffer EB gelöst und bei -20 °C gelagert.

### 2.6.3.2 Die klassische Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde eingesetzt um einen kurzen, genau definierten Teil des DNA-Strangs der bekannten Östrogenrezeptoren und Integrine zu vervielfältigen. Für den Reaktionsansatz wurden ad 25 µl *Aqua<sub>bide</sub>st.*, 2,5 µl *10xPCR Puffer*, 2,5 µl *dNTPs* (10 mM), 1 µl *forward-Primer* (5 pmol/ µl), 1 µl *reverse-Primer* (5 pmol/ µl), 100 ng cDNA-Matrix und 0,2 µl *AmpliTaqGold<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase* (5 U/ µl) zusammengegeben und mit 20 µl Öl überschichtet. Im PCR-Gerät *TRIO-Thermoblock<sup>TM</sup>* schlossen sich Zyklen folgenden Profils an:

1. 94 °C/ 12 min (thermische Aktivierung)
  2. 94 °C/ 90 s (Denaturierung)
  3. T<sub>ann</sub>/ 90 s (Annealing)
  4. 72 °C/ 90 s (Elongation)
  5. 72 °C/ 5 min (Extension).
- | Durchlauf 36-40 Zyklen

Die Reaktionsbedingungen der jeweiligen Primer sind in Tabelle 2.5 wiedergegeben.

Tabelle 2.5 PCR-Bedingungen für die Oligonukleotidprimerpaare; *ESR*: Östrogenrezeptor; *ITG*: Integrinuntereinheit; *Ald*: Aldolase; *bp*: base pair/ Basenpaar; *fw*: forward; *rev*: reverse; \*unter Zusatz von Betain und DMSO. Die gleichen Bedingungen wurden auch bei hormonbehandelten Zellen verwendet.

Gen und Primerkombination	PCR			Länge mRNA-Original-Sequenz
	<i>T<sub>ann</sub></i>	Zyklusanzahl	Amplifikatlänge	
<i>ESR α - fw1/ rev1</i>	54 °C	40*	416 bp	6450 bp
<i>ESR β - fw1/ rev1</i>	62 °C	40*	469 bp	2011 bp
<i>ESR β - fw2/ rev2</i>	54 °C	36	321 bp	
<i>ITG α6 - fw1/ rev1</i>	60 °C	36	440 bp	5611 bp
<i>ITG β1 - fw1/ rev1</i>	54 °C	36	470 bp	3614 bp
<i>ITG β1 - fw2/ rev2</i>	58 °C	36	540 bp	
<i>ITG β4 - fw1/ rev1</i>	54 °C	36	374 bp	5645 bp
<i>ITG β4 - fw2/ rev2</i>	52 °C	36	200 bp	
<i>ITG β4 - fw1/ rev2</i>	54 °C	36*	1792 bp	
<i>ITG β4 - fw3/ rev3</i>	60 °C	40*	760 bp	
<i>PO - fw1/ rev1</i>	54 °C	36	336 bp	1116 bp
<i>Ald - fw1/ rev1</i>	58 °C	36	249 bp	1594 bp

### 2.6.3.3 Klonierung spezifischer PCR-Produkte und Vermehrung von Bakterienklonen

Zur Anwendung kamen das *TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit*, der linearisierte *pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektor* und chemisch kompetente *TOP10 Escherichia coli*-Bakterien. Zuvor wurden LB-Platten (ca. 25 ml in Petrischalen, Ø 10 cm) hergestellt, für welche 1000 ml *LB-Agar* (< 60 °C), 2 ml *Ampicillin* (50 mg/ ml) und 1 ml *X-Gal* (40 mg/ ml) zusammengegeben wurden. Deren Lagerung erfolgte mit Parafilm abgedichtet bei 37 °C. Nach Klonierung gemäß den Angaben des Herstellers wurden etwa 100 µl der Bakteriensuspension ausplattiert und bei 37 °C inkubiert (12 - 24 h). Zur weiteren Vermehrung eines sich weiß darstellenden transformierten Bakterienklons wurde dieser mit einer Pipettenspitze steril aufgenommen und in ca. 50 ml *LB-Medium*, welchem 6 ml *Carbenicillin* (50 µg/ ml) zugesetzt waren, überführt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht und eine abschließende Zentrifugation (4 °C, 3500 rpm, 13 min). Zuvor wurde zur Anlage einer Stocklösung 800 µl Bakterienkultur mit 200 µl *Glycerol* bei -80°C tiefgefroren.



### 2.6.3.4 Präparation von Plasmid-DNA und Sequenzierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien erfolgte bei einer Menge von bis zu 20 µg mit dem *QuiaPrep Spin Plasmid Kit* (MiniPrep); bei einer Menge von bis zu 500 µg mit dem *Quiagen Plasmid Maxi Kit* (MaxiPrep). Es wurde gemäß den Angaben des Herstellers verfahren. Die abschließende Aufnahme der Plasmid-DNA erfolgte in 30 µl Puffer EB (MiniPrep) bzw. in 100 µl TE-Puffer (MaxiPrep). Die Lagerung erfolgte jeweils bei -20 °C.

Die Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte erfolgte durch Herrn Dr. Martin Meixner am Institut für Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin. Es wurden der *ABI-373 DNA Sequenzierungsautomat* und das *ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* verwendet. Für den *pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektor* spezifische Primer kamen *M13-forward* und *-reverse* zum Einsatz. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden auf Homologien zu bekannten Sequenzen untersucht.

### 2.6.3.5 Radioaktive Markierung und enzymatische Restriktion von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP. Dabei wurde das *Megaprime<sup>TM</sup> DNA Labelling System* analog den Herstellerangaben verwendet.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsendonukleasen und deren Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 2.6 dargestellt. Für den Reaktionsansatz wurden jeweils ad 20 µl  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  2 µl *10xReaktionspuffer*, 0,5 µl Plasmid-DNA und 1 µl *Enzym* zusammengegeben.

Tabelle 2.6 Die in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsenzyme; ↓: Schnittstelle

Restriktionsenzym	Schnittsequenz	Reaktionsbedingungen
<i>Bst</i> EII	G↓GTNACC	Puffer React 2/ 60 °C/ 1 h
<i>Eco</i> RI	G↓AATTC	Puffer React 3/ 37 °C/ 1 h
<i>Sty</i> I	C↓C(A,T)(A,T)GG	Puffer H/ 37 °C/ 1 h

## 2.7 Quantitative Real Time PCR

Die quantitative *Real Time* PCR wurde zur Validierung des Northern Blots eingesetzt und erlaubte eine Quantifizierung der gefundenen Veränderungen.

Zur Durchführung der quantitativen *real time* PCR kamen die *LightCycler*-Technologie der Firma Roche und das *FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit* zum Einsatz. Zunächst wurde Plasmid-DNA in EB-Puffer aufgenommen und die Konzentration [g/  $\mu$ l] spektrophotometrisch bestimmt. Die Einheit [g/ $\mu$ l] wurde in [Moleküle/ $\mu$ l] umgerechnet. Anschließend wurde in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> eine Faktor-10-Standardverdünnungsreihe ( $10^8$ - $10^1$  Moleküle/ $\mu$ l) angefertigt.

Anschließend wurden die zu vermessenden Proben unbekannter cDNA-Konzentrationen im Verhältnis 1:5 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verdünnt. Der Oligonukleotidprimermix, bestehend aus *forward*- und *reverse*-Primern, wurde in einer Verdünnung 1:20 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> hergestellt. Analog den Angaben des Herstellers wurden ad 18  $\mu$ l Reaktionsmix 12,4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, 2  $\mu$ l Oligonukleotidprimermix (1:20), 2  $\mu$ l *SYBR Green* und 1,6  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub> für eine 3 mM MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, entsprechend 2,4  $\mu$ l für einen 4 mM und 3,2  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub> für einen 5 mM Reaktionsmix pipettiert und in eine LC-Kapillare überführt. 2  $\mu$ l Proben-cDNA bzw. 2  $\mu$ l der Standardverdünnungsreihe wurden den LC-Kapillaren hinzugefügt und nach Zentrifugation (2000 rpm, 1 min) im *LightCycler* platziert und das Programm gestartet. Die Auswertung der Läufe erfolgte mit der Option *Second Derivative Maximum* der *LightCycler* Software, wobei Läufe mit einem Fehler >0,3 bezogen auf die Standardverdünnungsreihe verworfen wurden. Von drei Läufen einer Probe wurde der Mittelwert der erhaltenen Zahlenwerte ermittelt und anschließend die Quotienten Mittelwert<sub>Probe</sub>/Mittelwert<sub>PO</sub> gebildet.

## 2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten der Proliferationsanalyse erfolgte mit dem Student's *t* Test und der Varianzanalyse ANOVA. Die statistische Evaluation der ermittelten Daten in den Adhäsionsassays und der quantitativen *real time* PCR wurden mittels Student's *t* test durchgeführt. Die Werte waren statistisch signifikant bei  $p < 0,05$  und hoch signifikant bei  $p < 0,001$ . Es wurde die Software SPSS Version 11.0 (SPSS, Chicago, USA) verwandt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von E2, Tam und ICI auf das Wachstumsverhalten

Ein Einfluss der verwendeten Therapeutika war bei der Proliferationsanalyse der Zelllinien zu verzeichnen. Die verwendeten Plattenepithelkarzinomzelllinien UM-SCC-14A, 14B und 14C zeigten eine Inhibition ihres Wachstums unter Einfluss der selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren TAM und ICI.

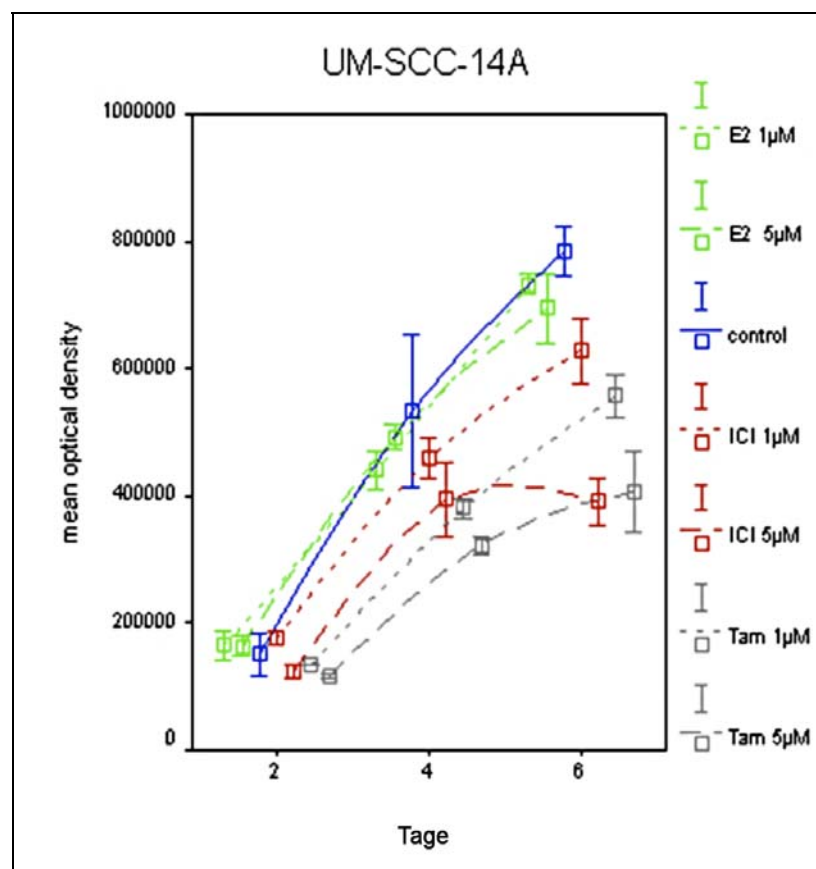


Abb. 3.1 Das Wachstumsverhalten der unbehandelten (control) oder mit 17- $\beta$  Estradiol (E2), Tamoxifen (TAM) und ICI 182,780 (ICI), in den Konzentrationen 1 und 5  $\mu$ M, behandelten PECA-Zelllinie UM-SCC-14A. (Ordinate: mean optische Dichte)

Das Wachstum der Zelllinie UM-SCC-14A wurde durch E2-Gabe nicht beeinflusst (Abb. 3.1). Eine signifikante Auswirkung auf das Wachstum der Zellen der Zelllinie UM-SCC-14A war in höheren Konzentrationen von 5  $\mu$ M ICI ( $p=0,00146$ ) und 5  $\mu$ M TAM ( $p=0,00146$ ) zu verzeichnen. Niedrigere Konzentrationen (1  $\mu$ M) von TAM und ICI konnten die Proliferation der Zellen der Zelllinie UM-SCC-14A mindern, jedoch war diese Minderung nicht statistisch signifikant.

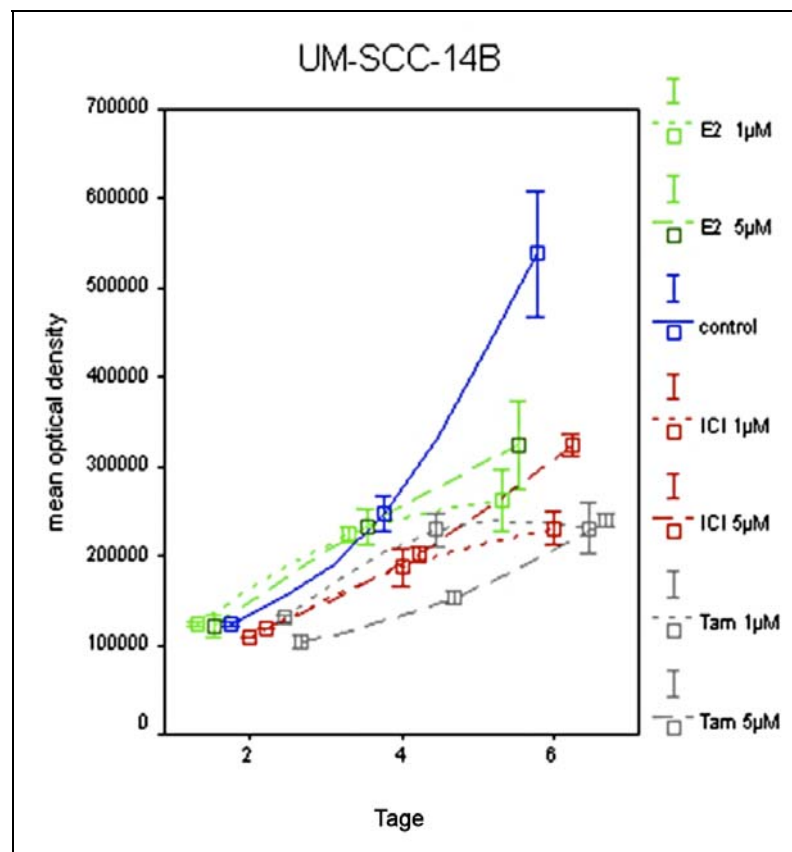


Abb. 3.2 Das Wachstumsverhalten der unbehandelten (control) oder mit 17- $\beta$  Estradiol (E2), Tamoxifen (TAM) und ICI 182,780 (ICI), in den Konzentrationen 1 und 5  $\mu$ M, behandelten PECA-Zelllinie UM-SCC-14B. (Ordinate: mean optische Dichte)

UM-SCC-14B war durch Gabe von 5  $\mu$ M ICI ( $p=0,00015$ ) und 5  $\mu$ M TAM ( $p=0,0000$ ) und nach prolongierter Gabe von 1  $\mu$ M E2 ( $p=0,0186$ ) und 5  $\mu$ M E2 ( $p=0,00270$ ) signifikant im Wachstum gehemmt (Abb. 3.2). E2 zeigte eine anfängliche Wachstumsinduktion in UM-SCC-14B und UM-SCC-14C, die aber nach fortdauernder Administration des Hormons in eine signifikante Inhibition überging.

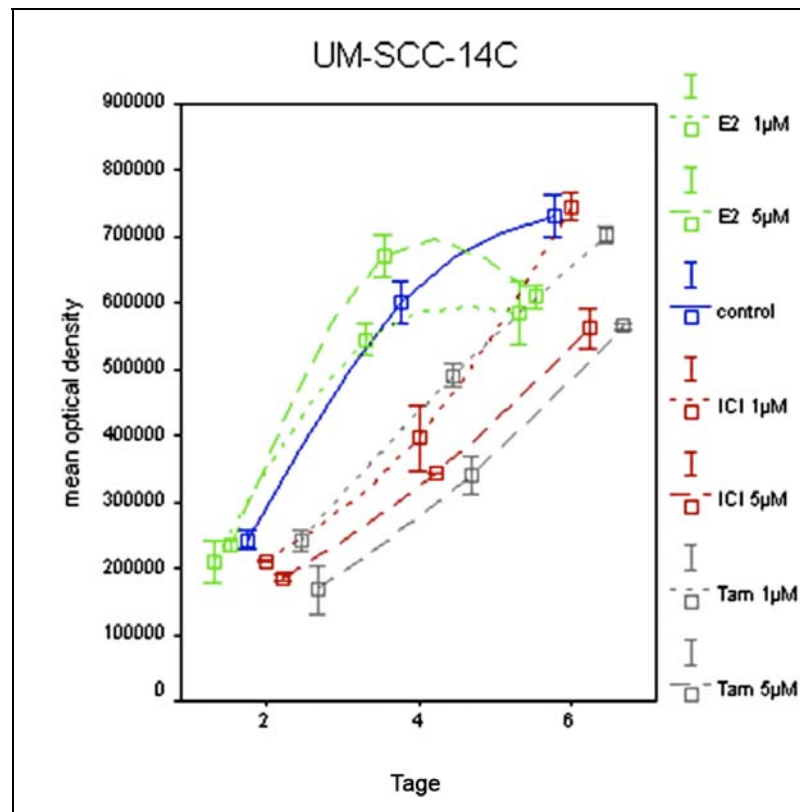


Abb. 3.3 Das Wachstumsverhalten der unbehandelten (control) oder mit 17- $\beta$  Estradiol (E2), Tamoxifen (TAM) und ICI 182,780 (ICI), in den Konzentrationen 1 und 5  $\mu$ M, behandelten PECA-Zelllinie UM-SCC-14C. (Ordinate: mean optische Dichte)

Ebenso zeigte UM-SCC-14C (Abb. 3.3) eine Inhibition ihres Wachstums unter 5  $\mu$ M ICI ( $p=0,0000$ ), 1  $\mu$ M TAM ( $p=0,0027$ ) und 5  $\mu$ M TAM ( $p=0,0000$ ); 1  $\mu$ M E2 ( $p=0,0146$ ) wirkte ebenfalls nach anfänglicher Wachstumssteigerung und prolongierter Gabe, nach 4 Tagen signifikant inhibierend. 5  $\mu$ M E2 führte ebenfalls zu einer anfänglichen Steigerung der Proliferation der Zellen, die nach weiterer Gabe von E2 zu einer deutlichen Minderung des Wachstums führte, diese war jedoch statistisch nicht signifikant.

MCF-7 zeigte als Kontrolle für den Versuchsaufbau ein in der Literatur entsprechend beschriebenes Proliferationsmuster nach Gabe von TAM und E2, sodass eine korrekte Versuchsdurchführung angenommen werden kann (Daten nicht dargestellt).

### 3.2 Fähigkeit zur Zell-Zell-Adhäsion

Die Tendenz der Formation von Zellaggregaten wurde als Quotient aus  $1-N_{30}/N_0$  dargestellt, wobei  $N_0$  die initiale Anzahl der Zellaggregate und  $N_{30}$  die Anzahl der Aggregate nach 30 min. in einem konstanten Volumen zeigte. Unbehandelte Zellen der drei Plattenepithelkarzinomzelllinien zeigten eine geringe Tendenz zur Zell-Zell-Adhäsion, welche sich aber durch Administration von E2, TAM und ICI beeinflussen ließen. In UM-SCC-14A konnte eine hoch signifikante Induktion der Fähigkeit zur Zellaggregation durch die Gabe von 5  $\mu\text{M}$  TAM ( $p=0,0000$ ) gezeigt werden. Eine signifikante Steigerung der zelladhäsiven Fähigkeiten in UM-SCC-14A konnte durch Administration aller Therapeutika in Konzentrationen von 1 und 5  $\mu\text{M}$  gesehen werden. UM-SCC-14B hingegen zeigte eine gesteigerte Zellaggregatbildung nur unter Gabe von 5  $\mu\text{M}$  E2 und durch ICI in den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$ . TAM zeigte mit 5  $\mu\text{M}$  eine Erhöhung der zelladhäsiven Eigenschaften von UM-SCC-14B, diese waren jedoch statistisch nicht signifikant. Die Zelllinie UM-SCC-14C wies in allen Fällen eine signifikante Induktion der Fähigkeit zur Zelladhäsion bei Administration der Agenzien in beiden in diesem Experiment verwandten Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$ ) auf.

Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 diente zur Kontrolle und zeigte entsprechend der bestehenden Kenntnisse vergleichbare Resultate. In Abbildung 3.4 sind die Veränderungen der zelladhäsiven Fähigkeiten der oben beschriebenen Zelllinien zusammengefasst dargestellt.

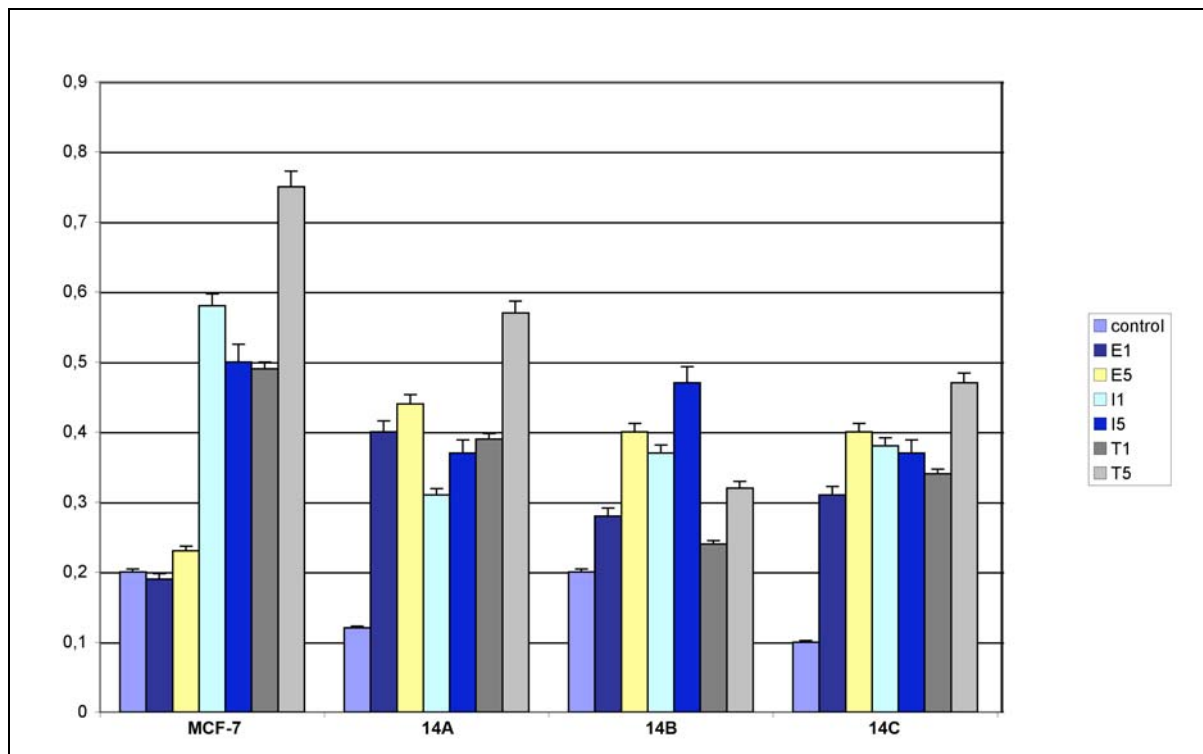


Abb. 3.4 Aggregationsverhalten der unbehandelten (control) Zelllinien MCF-7, UM-SCC-14A (14A), UM-SCC-14B (14B) und UM-SCC-14C (14C) und nach Administration von E2 (E1=1 $\mu$ M, E5=5 $\mu$ M), TAM (T1=1 $\mu$ M, T5=5 $\mu$ M) und ICI (I1=1 $\mu$ M, I5=5 $\mu$ M). Die Abszisse (y-Achse) zeigt die optische Dichte. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus drei Messungen  $\pm$  SEM (System error of mean).

### 3.3 Adhäsionsverhalten der Zellen an das extrazelluläre Matrixprotein Laminin-1

Die Fähigkeit der Plattenepithelkarzinomzellen an Laminin-1 zu adhären war ausgeprägt und durch die Gabe von E2, TAM und ICI beeinflussbar. Mit Progredienz der Entdifferenzierung der Zellen wuchs die Fähigkeit der Adhäsion an Laminin-1, hierbei zeigte UM-SCC-14C die höchste Adhärenz an das extrazelluläre Matrixprotein. Die unbehandelten Zellen der Zelllinie UM-SCC-14B hingegen zeigten die niedrigste Adhäsion an Laminin-1 und bestätigten die bereits bei der Untersuchung der Zellproliferation und Zell-Zell-Adhäsion gefundene geminderte Reaktivität dieser Zelllinie. Die Zellen von UM-SCC-14A zeigten eine signifikante Reduktion ihrer adhäsiven Fähigkeit unter Behandlung mit 1  $\mu$ M ICI ( $p=0,0029$ ) und 5  $\mu$ M ICI ( $p=0,0018$ ). Estradiol und sein selektiver Antagonist TAM zeigten jeweils nur bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M TAM ( $p=0,0443$ ) und 1  $\mu$ M E2 ( $p=0,03$ )

inhibierende Wirkung auf die Laminin-Bindung der untersuchten Zellen von UM-SCC-14A. Die Zelllinie (UM-SCC-14B) mit der niedrigsten Bindungsaffinität zu dem untersuchten Matrix-Protein zeigte auch die geringste Reaktivität auf die Administration der Therapeutika. Eine signifikante Beeinflussung der Zelladhäsion von 14B-Zellen an das Protein Laminin-1 war durch ICI 1  $\mu\text{M}$  ( $p=0,038$ ) und 5  $\mu\text{M}$  ( $p=0,042$ ), ebenso durch 1  $\mu\text{M}$  TAM ( $p=0,038$ ) und 5  $\mu\text{M}$  TAM ( $p=0,042$ ). E2 zeigte bei dieser Zelllinie (UM-SCC-14B) keine Einflussmöglichkeit auf des Zell-ECM Bindungsverhalten an Laminin-1. TAM und ICI mit den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  (TAM:  $p=0.0155$  und ICI:  $p=0.023$ ) und 5  $\mu\text{M}$  (TAM:  $p=0.008$  und ICI:  $p=0.03$ ) bewirkten auch bei UM-SCC-14C einen signifikanten Abfall der Adhäsion. E2 entfaltete eine reduzierende Wirkung bei Administration einer hohen Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  ( $p=0,043$ ) in UM-SCC-14C. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren TAM und ICI bei allen untersuchten PECA-Zelllinien zu einer Minderung der adhäsiven Fähigkeit an das Protein Laminin-1 geführt haben. Estradiol hingegen zeigte nur eine die Adhäsion mindernde Wirkung bei UM-SCC-14A und UM-SCC-14C. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 3.5 zusammengefasst.



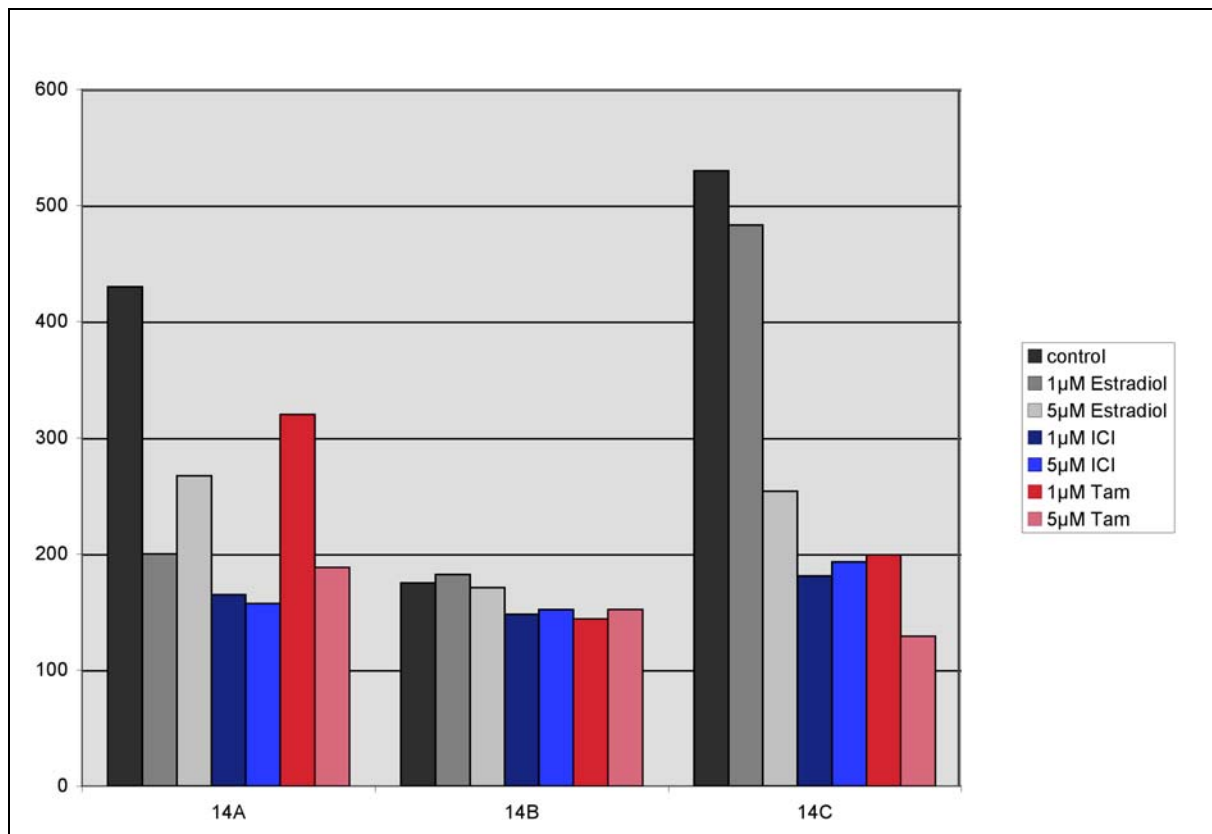


Abb. 3.5 Darstellung der Adhäsionsfähigkeit der unbehandelten und behandelten Zellen an Laminin-1 (14A=UM-SCC-14A, 14B= UM-SCC-14B, 14C= UM-SCC-14C). Die Abszisse (y-Achse) zeigt die optische Dichte. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus drei Messungen  $\pm$  SEM (System error of mean).

### 3.4 Darstellung der Morphologie der Zellen und des Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Eine Quantifizierung der Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle ist nur in geringem Maße durch die Nutzung der Immunfluoreszenz-Technik möglich (Janes, Watt 2006). Dieses methodische Instrument diente eher der beschreibenden Analyse und dem Erfassen der unter Wirkstoffgabe aufgetretenen Veränderungen der Morphologie bzw. der Expressionsmuster der untersuchten Proteine.

Die untersuchten PECA-Zelllinien wiesen ein deutlich unterschiedliches Erscheinungsbild der Zellen auf. UM-SCC-14A zeigt epitheloide, polygonale Zellen, die sich durch eine relativ homogene Anordnung mit einheitlicher Größe und Kern-

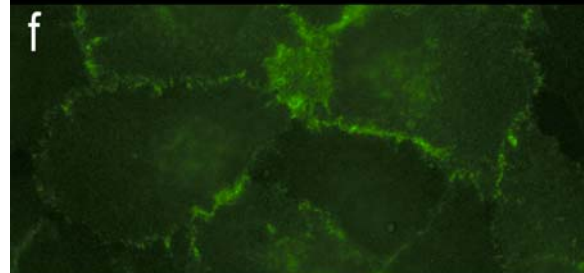
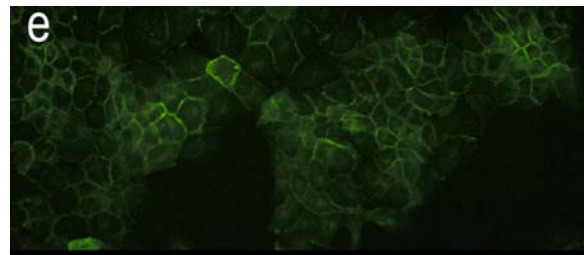
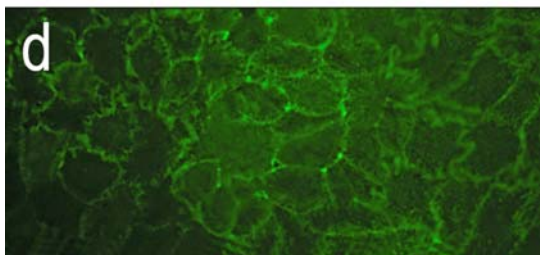
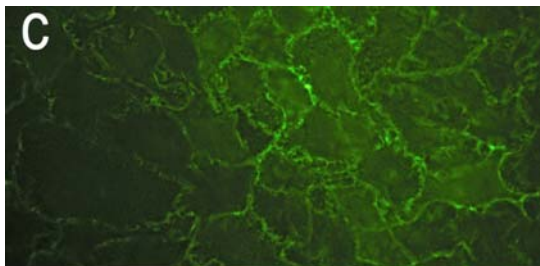
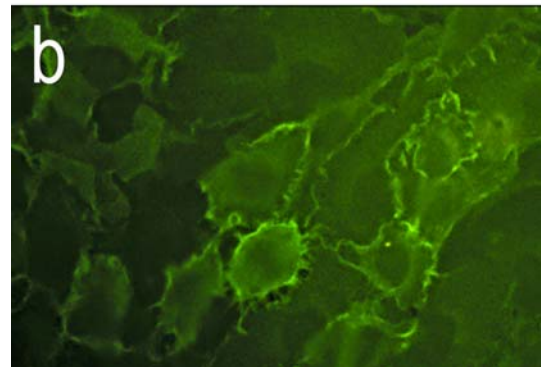
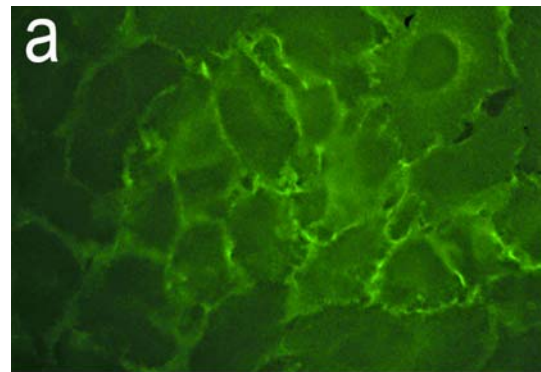
Zytoplasma-Verhältnis auszeichneten. Die Zelllinie UM-SCC-14B wies hingegen schon ein deutlich heterogeneres Erscheinungsbild mit länglichen und fibroblastoiden Zellen auf. Die Zellgröße und Zellformen variierten, und es zeigten sich vermehrt Ausbildungen von sog. Filopodien, langen Zytoplasmafortsätze zwischen den Zellen, wohingegen UM-SCC-14C wiederum eine mehr epitheloidförmige Struktur ausbildete. Allerdings war auch hier eine große Variation der Zellgröße und auch des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses zu sehen. Die hohe Anzahl mitotischer Zellen war in dieser Zelllinie bemerkenswert. Zellausläufer wie bei der vorher beschriebenen Zelllinie waren nur in geringem Maße vorhanden. Eine bildliche Darstellung der beschriebenen Eigenschaften erfolgt in dem folgenden Abschnitt.

### **3.4.1 Darstellung der Expression von E-Cadherin und $\beta$ -Catenin durch immunfluoreszierende Färbungen**

#### **3.4.1.1 E-Cadherin**

Die Expression von E-Cadherin der unbehandelten Zellen zeigte sich in kleinen dünnen, vereinzelt Inseln an der Zellmembran, sie war in keiner der untersuchten PECA-Zelllinie kontinuierlich verteilt. Dieser Umstand stellte sich in UM-SCC-14C deutlich dar (Abb. 3.6 a,c,e). Eine Veränderung des Expressionsmusters der Zellen von UM-SCC-14A, 14B und 14C durch Gabe von E2, TAM und ICI konnte durch die histomorphometrische Analyse nicht erfasst werden; weder war eine veränderte Distribution des Proteins zu sehen noch eine quantitative Alteration zu erfassen. In der folgenden Abbildung ist exemplarisch die Einwirkung von TAM auf die E-Cadherin-Expression der Zelllinien UM-SCC-14A, 14B und 14C dargestellt (Abb. 3.6 b,d,e).

Fig. 3.6 Die Expression von E-Cadherin war gering in den unbehandelten Zellen von UM-SCC-14A (a), UM-SCC-14B (c) (Vergrößerung 40x) und UM-SCC-14C (e) (Vergrößerung 20x). UM-SCC-14A behandelt mit TAM 1 $\mu$ M (b) und UM-SCC-14B (d) zeigten keine Veränderung der in Inseln isolierten Membranfärbung. Die geringe Reduktion der durch TAM 5 $\mu$ M in UM-SCC-14C (f) (Vergrößerung 100x) festgestellten Oberflächenexpression konnte durch die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung nicht quantifiziert werden.



### 3.4.1.2 $\beta$ -Catenin

Das Protein  $\beta$ -Catenin zeigte ebenfalls eine Färbung in isolierten Inseln im Bereich der gesamten Zellmembran der drei unbehandelten PECA-Zelllinien (UM-SCC-14A, 14B und 14C), ebenso war  $\beta$ -Catenin auch im Nukleus und Zytoplasma der Zellen nachweisbar. Eine Änderung des Expressionsmusters von  $\beta$ -Catenin wurde durch die Gabe der Wirkstoffe nicht sichtbar; eine exemplarische Darstellung hierfür ist in Abbildung 3.7 a-f unter der Einwirkung von TAM auf die Zelllinien zu finden. Wie bei der Analyse von E-Cadherin zeigte sich auch bei  $\beta$ -Catenin keine veränderte Distribution des Proteins innerhalb der Zellkompartimente nach Administration der Therapeutika. Auffällig erschien UM-SCC-14C, da hier eine Expression von  $\beta$ -Catenin in der Zellmembran gefunden wurde, es galt jedoch nach Co-Immunopräzipitations-Versuchen als erwiesen (siehe Abb. 3.15), dass dieses keinen intakten Komplex mit E-Cadherin bildete.

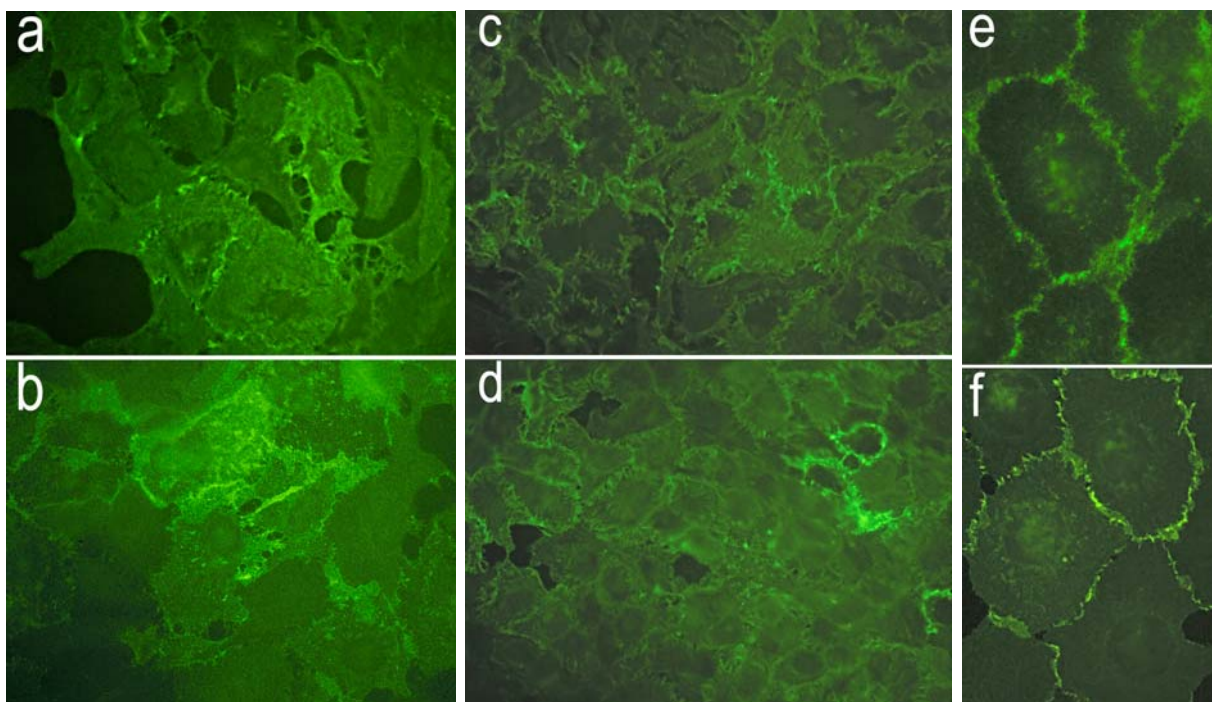


Fig. 3.7 Fluoreszenz-Färbung von  $\beta$ -Catenin in unbehandelten Zellen UM-SCC-14A (a), 14B (c) (Vergrößerung 40x) und 14C (e) (Vergrößerung 100x) zeigte vereinzelte Expression in der Zellmembran, dem Zytoplasma und dem Nukleus, dieses wurde auch durch Gabe von TAM  $1\mu\text{M}$  nicht beeinflusst (UM-SCC-14A=b, UM-SCC-14B=d (Vergrößerung 40x) and UM-SCC-14C=f (Vergrößerung 100x)).

### 3.4.2 Betrachtung der $\alpha 3$ , $\alpha 6$ , $\beta 1$ und $\beta 4$ -Integrinuntereinheit durch immunfluoreszierende Färbungen

#### 3.4.2.1 $\alpha 3$ -Integrin

Die Integrinuntereinheit  $\alpha 3$  zeigte sich streckenweise bandförmig mit unklarer Begrenzung in den Bereichen der Zell-Zell-Kontakte bei den unbehandelten Zelllinien UM-SCC-14A, 14B und 14C. Ebenso konnte eine basale Expression der Integrinuntereinheit bei allen PECA-Zelllinien vermerkt werden, die ebenso für eine Beteiligung von  $\alpha 3$  an der Zell-Matrix-Adhäsion spricht. In der Zelllinie UM-SCC-14A zeigten sich keine Änderungen in der Verteilung des Integrins innerhalb der Zelle, es erfolgte auch keine sichtbare quantitative Veränderung der Menge des Proteins. Bei UM-SCC-14B sah man  $\alpha 3$  auch in den Spitzen der Zellausläufer, welche Zellkontakte zu benachbarten Zellen suchten; die Expression des Proteins erschien insgesamt vermehrt punktförmig und nur vereinzelt bandförmig. Eine deutliche Veränderung des Färbemusters von  $\alpha 3$  war nur bei UM-SCC-14B unter ICI und 5  $\mu\text{M}$  TAM zu finden; die Färbungen der Zellmembran benachbarter Zellen gestalteten sich dann eher bandförmig und es war eine geringere Anfärbung der Pseudopodien sichtbar, deren Ausbildung insgesamt auch deutlich reduziert erschien. Ebenso war ein homogeneres Erscheinungsbild der Zellen sichtbar (Abb. 3.8). UM-SCC-14C wies wie UM-SCC-14A keine erkennbaren Änderungen nach Administration von E2, TAM und ICI auf.

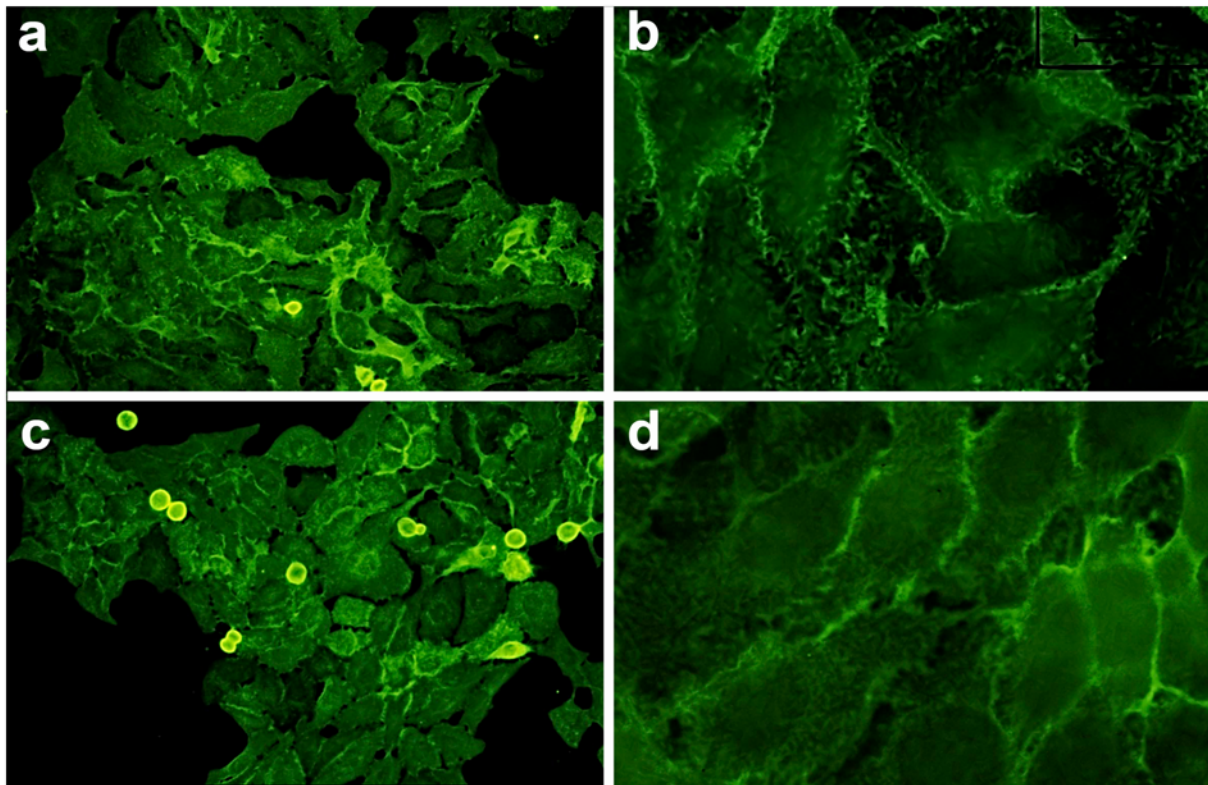


Abb. 3.8 Die unbehandelte Zelllinie UM-SCC-14B (a=20 x Vergrößerung, b=100 x Vergrößerung) zeigte eine deutliche Expression von  $\alpha 3$  an den Pseudopodien und erschien punktförmig an der Zellmembran sowie basal. Unter Gabe von TAM  $5\mu\text{M}$  war eine Reduktion der Zellfortsätze und deren Gehalt an  $\alpha 3$  zu verzeichnen (c=20 x Vergrößerung). Ebenso war eine vermehrt bandförmige Expression der Integrinuntereinheit an den Zell-Zell-Grenzen sichtbar und die basale Expression bestand weiterhin (d=100 x Vergrößerung).

### 3.4.2.2 $\beta 1$ -Integrin

Das Färbemuster von  $\beta 1$  ähnelte dem von  $\alpha 3$ , d.h. man sah eine Expression an den Zell-Zell-Kontakten in bandförmiger Form bei UM-SCC-14A und 14C und vermehrt punktförmig bei UM-SCC-14B. Freie Zellränder waren nicht angefärbt (Abb.3.9). Auch  $\beta 1$  zeigte eine basale Expression, die auf die Beteiligung an der Zell-Matrix-Adhäsion hinweist. In der Zelllinie UM-SCC-14A zeigten sich keine Änderungen in der Verteilung des Integrins innerhalb der Zelle, es erfolgte auch keine sichtbare quantitative Veränderung der Menge des Proteins. UM-SCC-14B exprimiert  $\beta 1$  vermehrt in den Pseudopodien, welches, ähnlich wie bei  $\alpha 3$ , war die Expression von  $\beta 1$  unter ICI ( $1\mu\text{M}$  und  $5\mu\text{M}$ ) und TAM ( $5\mu\text{M}$ ) vermindert. Ebenso erschienen die

Zellstrukturen nach Behandlung mit TAM und ICI geordneter mit vereinzelt bandförmigen Anfärbungen von  $\beta 1$  an den Zell-Zell-Kontakten (Abb. 3.9). Eine deutliche Minderung der Expression bzw. Veränderung des Expressionsmusters von  $\beta 1$  in den Zelllinien UM-SCC-14A und 14C war nach Zusatz der Agenzien nicht erkennbar.

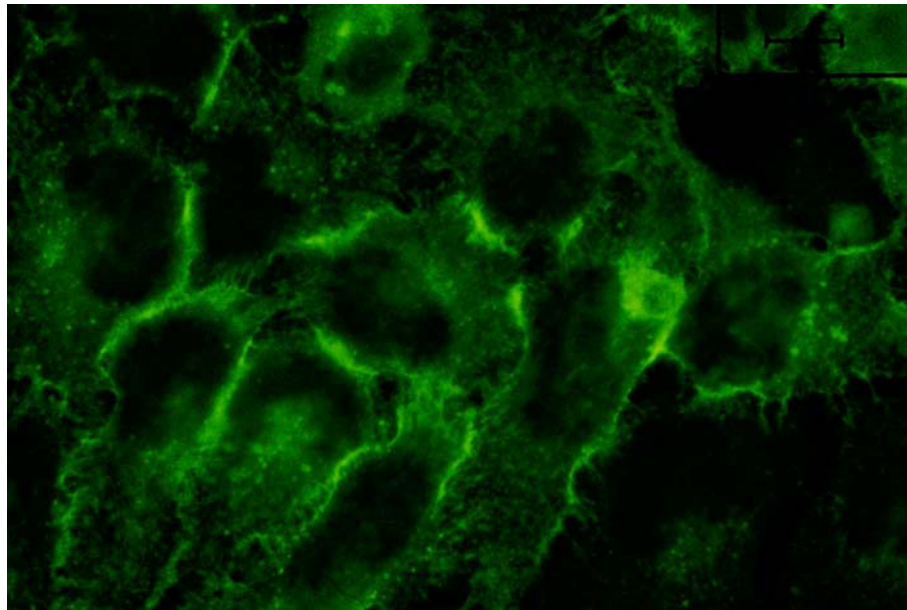


Abb. 3.9 Darstellung des Expressionsmusters von  $\beta 1$ -Integrin nach 5  $\mu\text{M}$  TAM-Behandlung der Zelllinie UM-SCC-14B (Vergrößerung 40x). Eine Beteiligung von  $\beta 1$  an der Bildung von Fokalkontakten und Zell-Zell-Kontakten ist sichtbar. Das Expressionsmuster von  $\beta 1$ -Integrin der unbehandelten Zelllinie UM-SCC-14B entspricht dem des  $\alpha 3$ -Integrins (siehe Abb. 3.8).

### 3.4.2.3 $\alpha 6$ -Integrin

Die Lokalisation der  $\alpha 6$ -Integrinuntereinheit befand sich hauptsächlich an den basalen Flächen der Zellen in allen unbehandelten PECA-Zelllinien, welches auf eine Teilnahme an der Zell-Matrix-Adhäsion hinweist. In UM-SCC14A sah man eine körnige Expression von  $\alpha 6$  an der Unterseite der Zelle, es fanden sich keine Hinweise auf Formationen von geordneten Strukturen. Hingegen auffällig erschien bei UM-SCC-14B die typische Streifung, die für eine Polarisierung und „Clustering“

der hierfür verantwortlichen Proteine der Zellen spricht. Allerdings konnte eine Streifung aller Zellen der benannten Zelllinie nicht festgestellt werden. UM-SCC-14C zeigte das typische Bild eines nicht differenzierten Karzinoms, bei dem eine diffuse und auch periphere Lokalisation der  $\alpha 6$ -Integrinuntereinheit zu finden war, d.h. hier fand, wie in UM-SCC-14A, keine Ausbildung von gerichteten hemidesmosomalen Strukturen statt. In Abbildung 3.10 sind die Expressionsmuster von  $\alpha 6$ -Integrin der unbehandelten Zellen von UM-SCC-14A (a), UM-SCC-14B (b) und UM-SCC-14C (c) dargestellt.

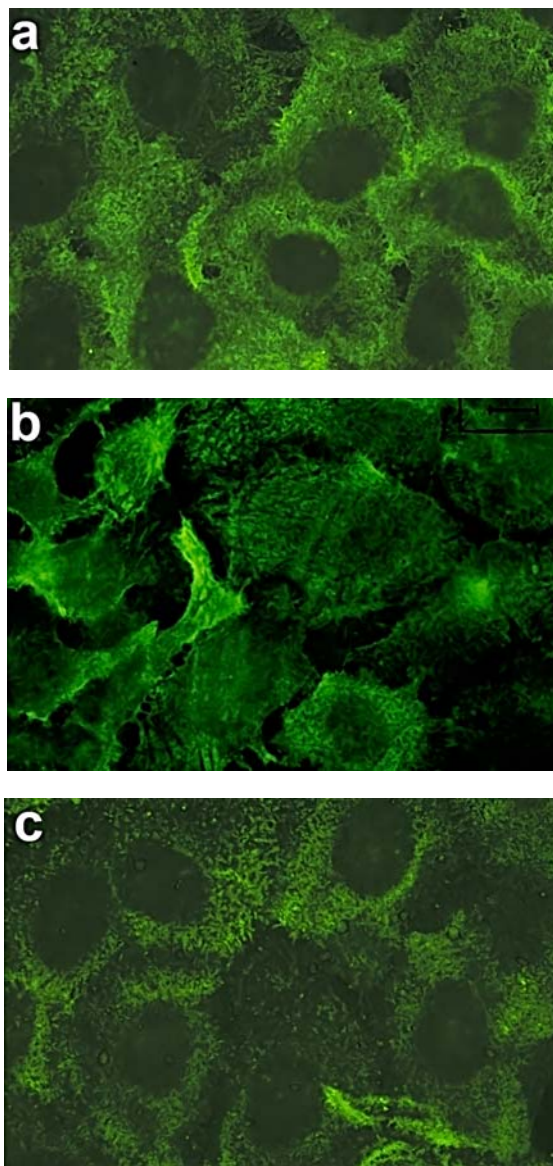


Abb. 3.10 Darstellung des Expressionsmusters von  $\alpha 6$ -Integrin an der basalen Fläche der unbehandelten Zellen von UM-SCC-14A (a), UM-SCC-14B (b) und UM-SCC-14C (c) (Vergrößerung 40x).



In allen untersuchten PECA-Zelllinien sah man eine Anreicherung von  $\alpha 6$  in den Zellausläufern, wohingegen bereits gebildete Interzellularbrücken eine schwache  $\alpha 6$ -Expression zeigten. Das Muster der Expression änderte sich nach Applikation von E2, TAM und ICI (Daten nicht dargestellt) in den Zelllinien UM-SCC-14A und UM-SCC-14B nicht. Jedoch zeigte sich ein veränderte Verteilung von  $\alpha 6$  auf den Zellen von UM-SCC-14C nach Applikation von ICI 5  $\mu\text{M}$ , und in weniger ausgeprägtem Maße auch bei ICI 1  $\mu\text{M}$ . Hierbei fanden sich vereinzelt Ausbildungen von streifigen Strukturen, die auf eine vermehrte Polarisierung der Zellen hindeuteten (Abb. 3.11).

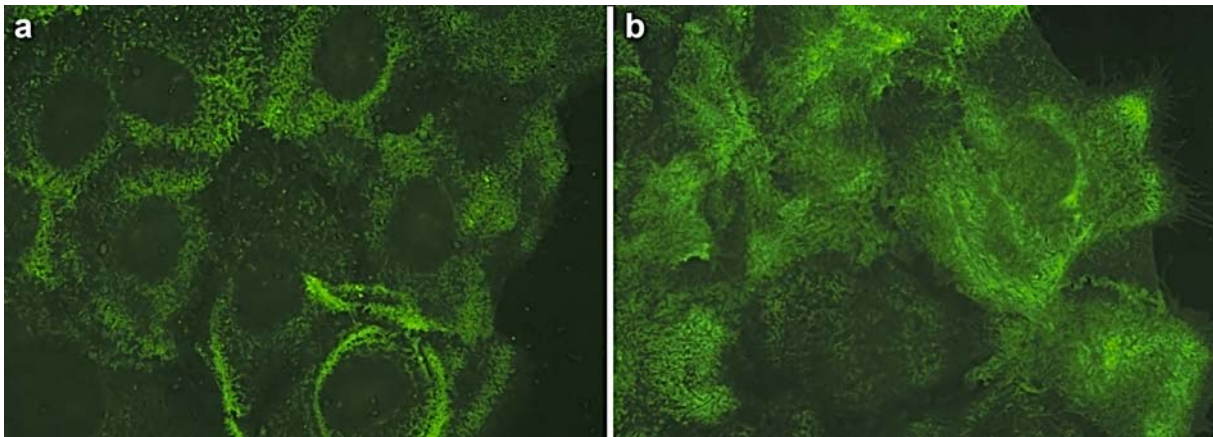


Abb. 3.11 Darstellung des Expressionsmusters von  $\alpha 6$ -Integrin an der basalen Fläche der unbehandelten Zellen von UM-SCC-14C (a) (Vergrößerung 40x). Nach Gabe von 5 $\mu\text{M}$  ICI sah man die Ausbildung von geordneten Strukturen, der sog. Streifung, die für Hemidesmosomen typisch ist (b) (Vergrößerung 40x). Die Anreicherung von  $\alpha 6$  ist in den Lamellipodien jedoch nicht in Filopodien zu sehen.

### 3.4.2.4 $\beta$ 4-Integrin

Die Integrinuntereinheit  $\beta$ 4 zeigte ein dem  $\alpha$ 6 ähnliches Expressionsmuster, d.h in UM-SCC-14A und 14C war ein körnig erscheinendes Muster an den basalen Flächen der Zellen zu verzeichnen. Eine Beteiligung an der Zell-Zell-Adhäsion von  $\beta$ 4 ist auszuschließen, da  $\beta$ 4-Färbungen im Bereich der Zellmembran bei benachbarten Zellen nicht sichtbar waren. Jedoch ist eine typische Beteiligung an der Zell-Matrix-Interaktion aufgrund der basalen Expression des Proteins in allen Zelllinien zu vermuten. UM-SCC-14B wies eine leicht streifige Anordnung auf, wobei diese wiederum nicht auf allen Zellen und dort auch nicht durchgängig vorhanden war. Bei UM-SCC-14B waren Fokalkontakte sichtbar (Abb. 3.12). Eine Änderung des Expressions-musters war bei keiner Wirkstoffapplikation zu verzeichnen (Abb. 3.13).

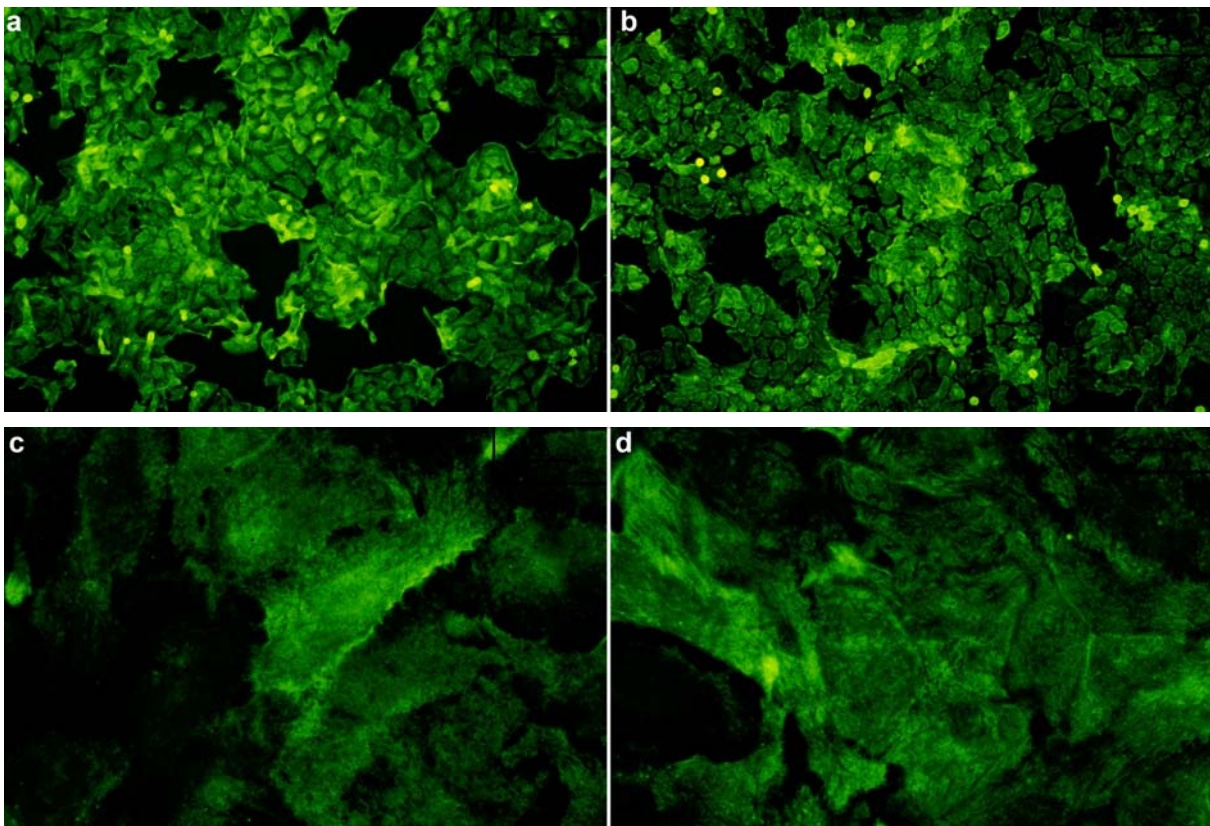


Abb. 3.12 Darstellung des Expressionsmusters von  $\beta$ 4-Integrin an der basalen Fläche der unbehandelten Zellen von UM-SCC-14B (a,c) (Vergrößerung 20x,100x). Auf einigen Zellen ist die Ausbildung von hemidesmosomalen Strukturen sichtbar. Eine Änderung durch Applikation von 5 $\mu$ M TAM zeigte keine Änderung (b,d) (Vergrößerung 20x,100x). Die Anreicherung von  $\alpha$ 6 ist in den Lamellipodien zu sehen.

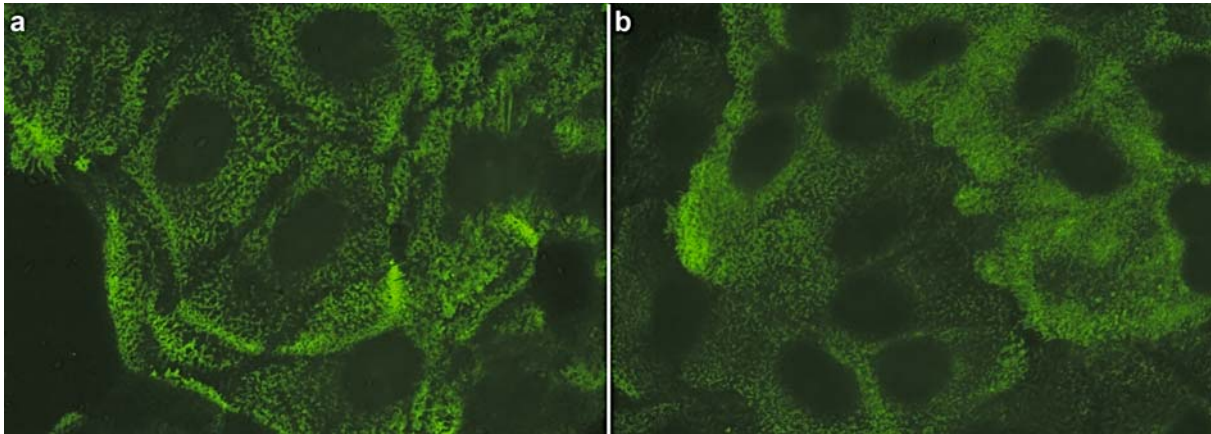


Abb. 3.13 Darstellung des körnigen und ungerichteten Expressionsmusters von  $\beta 4$ -Integrin an der basalen Fläche der unbehandelten Zellen von UM-SCC-14C (a) (Vergrößerung 100x). Eine Veränderung der Expression war durch Applikation von  $5\mu\text{M}$  TAM nicht zu verzeichnen (b) (Vergrößerung 100x). Eine  $\beta 4$  Anreicherung war in den Lamellipodien zu sehen.

Zusammenfassend war festzustellen, dass sich  $\alpha 6$  und  $\beta 4$  nicht an Zell-Zell-Kontakten beteiligten; es war lediglich eine basale Expression der Proteine sichtbar, die für die Zell-Matrix-Adhäsion spricht. Im Gegensatz hierzu wurden  $\alpha 3$  und  $\beta 1$  jedoch in den Kontaktbereichen der Zellen vermehrt exprimiert, sodass eine Beteiligung an interzellulären Kontakten anzunehmen war. Weiterhin waren  $\alpha 3$  und  $\beta 1$  auch an der Zell-Matrix-Interaktion beteiligt, da eine basale Expression der Proteine sichtbar war.  $\alpha 6$  und  $\beta 4$  schienen an der Protrusion der Zellen beteiligt, da sie in den Lamellen und Filopodien zu finden waren, wohingegen die Integrine  $\alpha 3$  und  $\beta 1$  vermehrt in den Pseudopodien zwischen benachbarten Zellen exprimiert wurden.

### 3.5 Darstellung der Veränderungen der Expression der Zelladhäsionsmoleküle mittels Durchflusszytometrie, Immunoblot und molekularbiologischer Methoden

#### 3.5.1 E-Cadherin und $\beta$ -Catenin Proteinexpression

Die Expression der Proteine E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin wurde in allen Zellen der Zelllinien UM-SCC-14A, 14B und 14C durch Darstellung mittels Western Blot bestätigt, ebenso wurden keine Veränderungen der Proteinmenge durch Administration von E2, TAM oder ICI in jeglicher Konzentration festgestellt (Abb. 3.14).

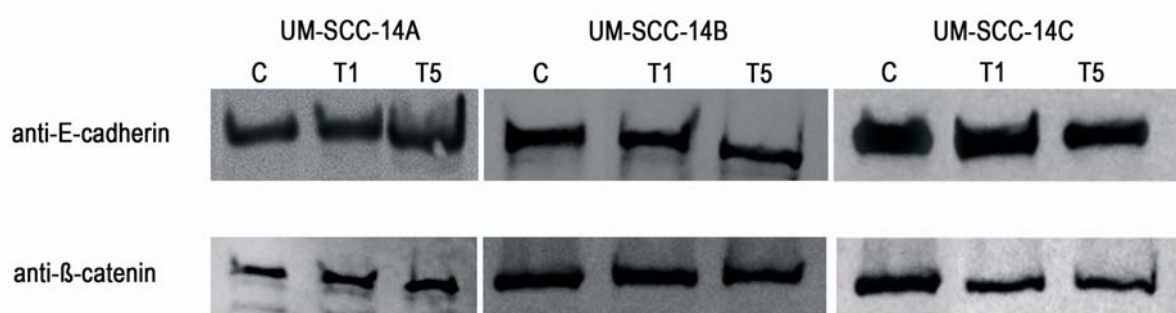


Abb. 3.14 Die Western-Analyse der Zelllysate bestätigte das Vorhandensein von E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin und zeigte keine Beeinflussung durch Administration von Tamoxifen (c=unbehandelt, T1=1  $\mu$ M Tamoxifen, T5=5  $\mu$ M Tamoxifen).

Die flowzytometrische Messung der Expression von E-Cadherin auf der Zelloberfläche verifiziert das Fehlen einer Veränderung bei der Darstellung der Gesamtproteinmenge, allerdings zeigte sich eine leichte Reduktion von E-Cadherin auf der Zellmembran unter 5  $\mu$ M TAM-Administration, welche aber statistisch nicht signifikant war (Tab. 3.1).

Tab. 3.1 Durchflusszytometrische Analyse der E-Cadherin-Oberflächenexpression (mean % der „gegateten“ Zellen aus drei Messungen) (C=Kontrolle, T1=Tamoxifen 1  $\mu$ M, T5=Tamoxifen 5  $\mu$ M).

	IgGControl	C	T1	T5
<b>UM-SCC-14A</b>	0.42	8.82	8.75	8.72
<b>UM-SCC-14B</b>	0.42	6.55	6.42	6.53
<b>UM-SCC-14C</b>	0.42	6.62	6.27	5.59

Die Untersuchung des E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplexes wurde mittels Co-Immuno-  
präzipitation durchgeführt. Diese zeigte eine intakte Formation des Komplexes in  
UM-SCC-14A und 14B; jedoch war in UM-SCC-14C keine Bindung von  $\beta$ -Catenin an  
E-Cadherin nachzuweisen. Eine Reformation des Komplexes durch TAM konnte in  
dieser Zelllinie nicht dargestellt werden (Abb 3.15).

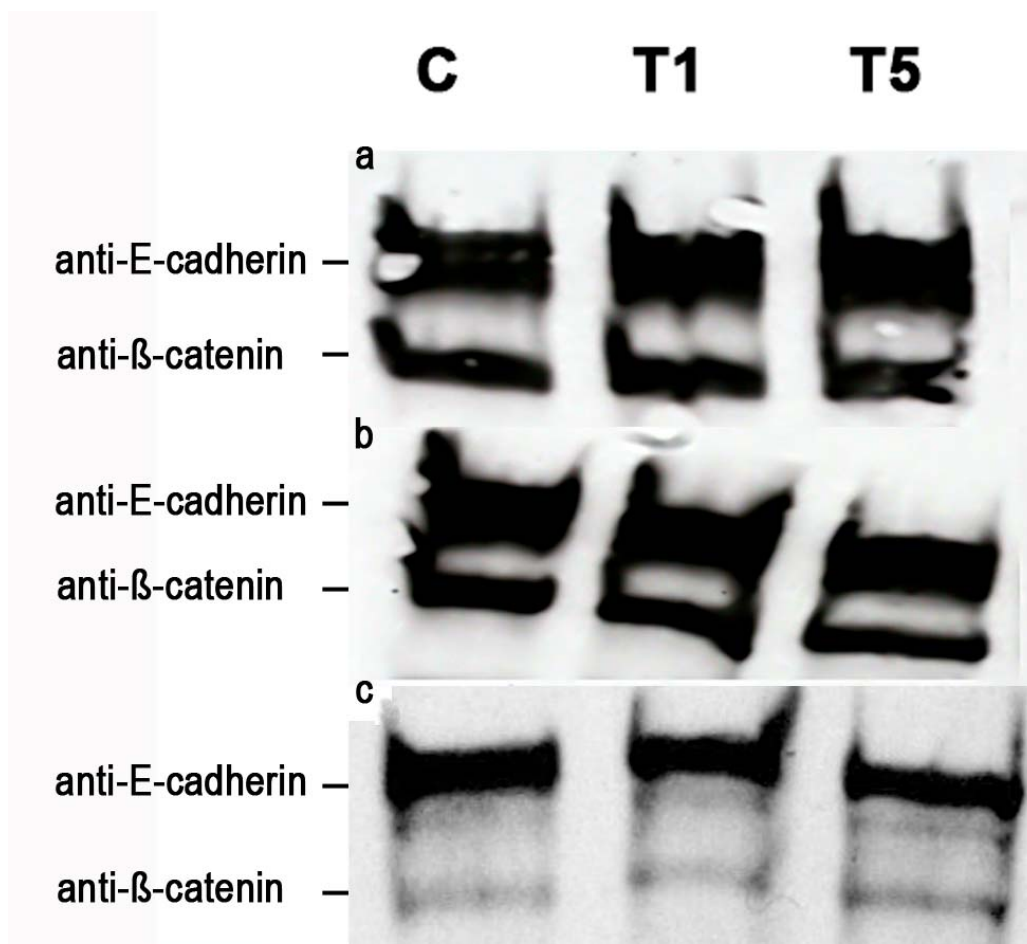


Abb. 3.15 Zelllysate wurden mit anti-E-Cadherin präzipitiert und mit anti- $\beta$ -Catenin  
geblotet. In UM-SCC-14A (a) und UM-SCC-14B (b) sah man die intakte Formation  
des E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplexes. In UM-SCC-14C (c) hingegen sah man  
keine Bindung zwischen E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin.

Somit liegt hier eine Störung der Fähigkeit von  $\beta$ -Catenin an E-Cadherin, und vice  
versa, zu binden vor. Eine Verhinderung dieser Bindungsmöglichkeit kann durch  
Phosphorylierung einer bzw. beider Bindungspartner bedingt sein. Eine  
Phosphorylierung der Proteine E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin konnte in der Co-  
Immunopräzipitation jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).

### 3.5.2 Regulation der Transkription von E-Cadherin

Die in der Durchflusszytometrie beobachtete Reduktion von E-Cadherin in UM-SCC-14C nach Tamoxifen-Gabe basierte nicht auf einer verminderten Transkription von E-Cadherin-mRNA. Die Transkriptionsrate wurde mittels Northern Blot untersucht (Abb. 3.16). Die Analyse des mRNA-Gehalts von E-Cadherin wurde für die anderen PECA-Zelllinien nicht durchgeführt, da in den vorhergehenden Versuchen kein Hinweis auf einen Einfluss der Expression des Proteins bestand.

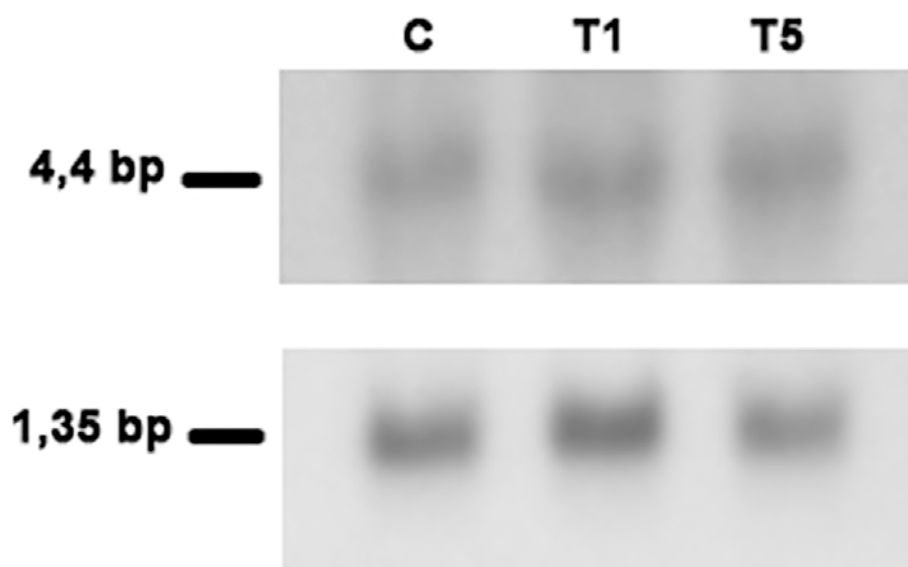


Abb 3.16 Die Reduktion der E-Cadherin Expression UM-SCC-14C ist nicht auf eine Veränderung der Transkriptionsrate zurückzuführen. PO (Phosphoprotein) wurde als Standard benutzt (untere Bande=1,35bp), da es keine Regulation durch TAM oder E2 zeigt. (C=unbehandelte Zellen; T1, T5=Zellen mit 1 oder 5 $\mu$ M Tamoxifen behandelte Zellen)

### 3.5.3 Oberflächenexpression von $\alpha 3$ -, $\alpha 6$ -, $\beta 1$ - und $\beta 4$ -Integrin

Die flowzytometrische Untersuchung zeigte, dass die untersuchten Integrine in allen PECA-Zelllinien exprimiert wurden (Daten nicht dargestellt). In UM-SCC-14A und UM-SCC-14B war keine Änderung der Oberflächenexpression für  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 4$  unter der Behandlung mit E2, TAM und ICI nachweisbar; ebenso in der Zelllinie UM-SCC-14C. Eine statistisch signifikante Minderung der Oberflächenexpression war für  $\alpha 3$  in UM-SCC-14B unter 1 und 5  $\mu\text{M}$  TAM Administration zu verzeichnen (Abb. 3.17)

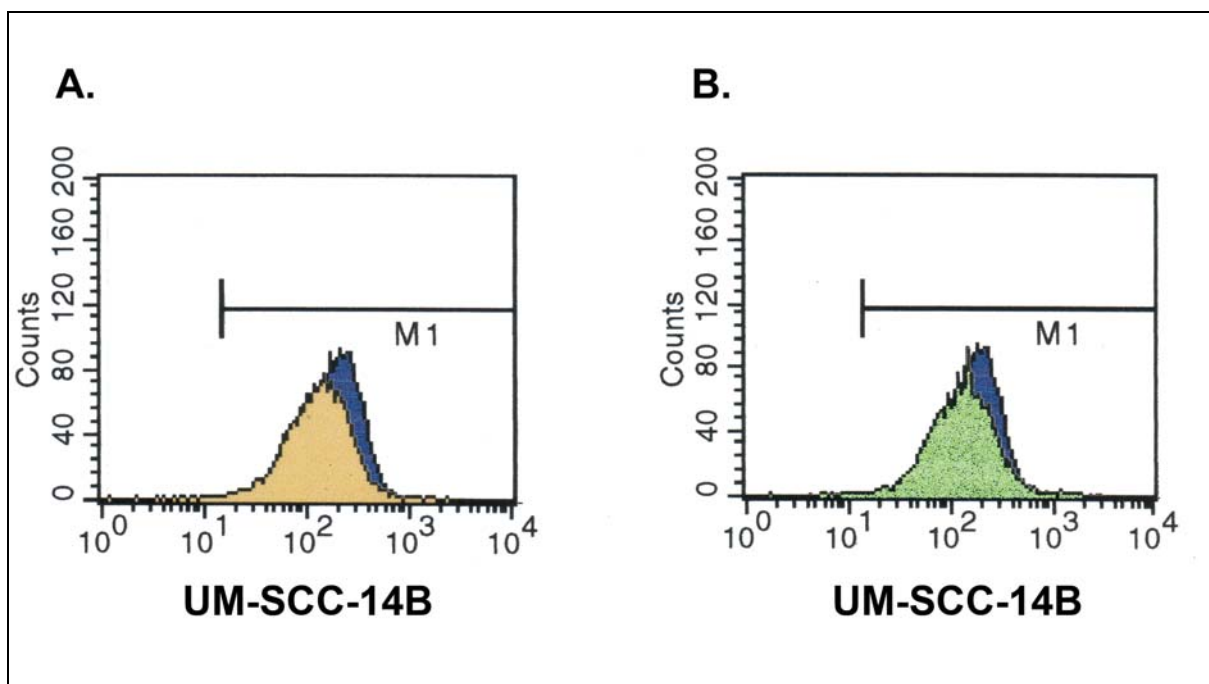


Abb. 3.17 Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine signifikante Reduktion der Oberflächenexpression von  $\alpha 3$  unter TAM A. gelber Graph = Tamoxifen 1  $\mu\text{M}$  und B. grüner Graph = Tamoxifen 5  $\mu\text{M}$  (blauer Graph = unbehandelte Kontrolle). Die x-Achse zeigt die logarithmische Fluoreszenzintensität.

Eine Reduktion des Proteins  $\alpha 3$  auf der Zelloberfläche war durch ICI-Behandlung (1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$ ) bei allen PECA-Zelllinien zu verzeichnen, dieses war jedoch ohne statistische Signifikanz (Tab. 3.2).

Tab. 3.2 FACS-Analyse von  $\alpha$ 3-Integrin-Zelloberflächenexpression ( $\pm$ SEM des Quotient von behandelten Zellen zu unbehandelten Zellen aus drei Messungen) (C=unbehandelte Zellen, ICI1=ICI 182,780 1 $\mu$ M, ICI5=ICI 182,780 5 $\mu$ M; \* $p$ <0.05)

	ICI1	ICI5
<b>UM-SCC-14A</b>	0.78*	0.83
<b>UM-SCC-14B</b>	0.86	0.82
<b>UM-SCC-14C</b>	0.84	0.82

### 3.5.4 Regulation der Transkription von $\alpha$ 3-, $\alpha$ 6-, $\beta$ 1- und $\beta$ 4-Integrin

Die Transkription der Integrinuntereinheiten  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 6 und  $\beta$ 4 war durch Administration von E2, TAM und ICI in keiner der untersuchten PECA-Zelllinien (UM-SCC-14A, 14B und 14C) verändert. Eine Veränderung der Transkriptionsrate war jedoch für die Zelllinie UM-SCC-14B für das Protein  $\beta$ 1 nachweisbar. Die Transkription von  $\beta$ 1-Integrin war nach Administration von 1 und 5  $\mu$ M E2 ( $p=0.00007$ ) und TAM ( $p=0.005$ ;  $p=0.002$ ) in der Zelllinie UM-SCC-14B vermindert. In Abbildung 3.18 sind die untersuchten Zelllinien und deren Transkriptionsraten vollständig dargestellt.



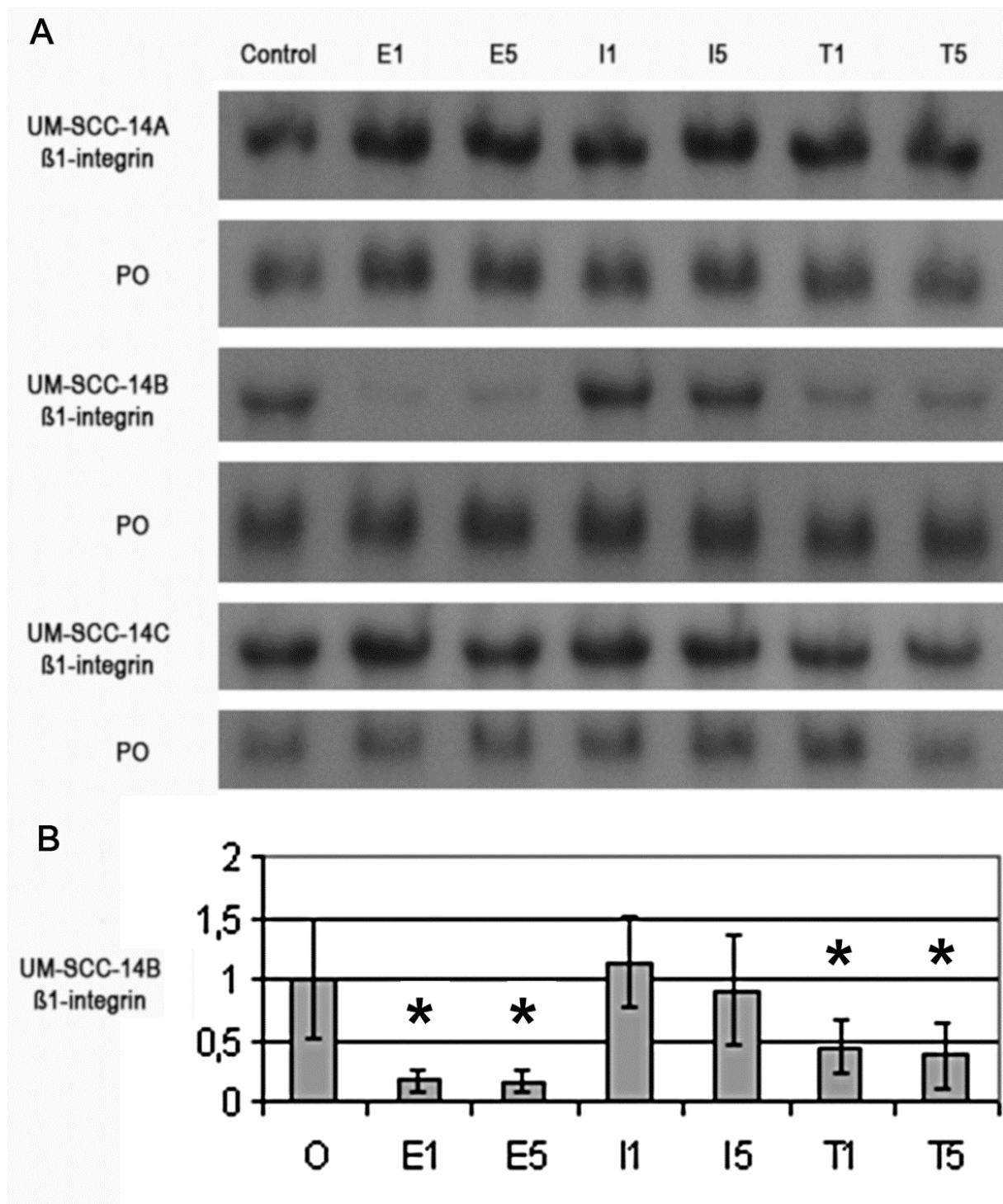


Abb. 3.18 **A**. Die Transkription von β1 war laut Northern Blot in UM-SCC-14B bei Administration von TAM und E2 vermindert. Eine Regulation von UM-SCC14A und 14C war nicht erkennbar. PO (Phosphoprotein) wurde als Standard benutzt. **B**. Die RT-PCR bestätigte die Reduktion der β1-integrin-Transkription (\*=p<0.05). (Control=unbehandelt, E= E2, I=ICI, T=TAM, 1=1μM, 5=5μM)

Die veränderte Transkription spiegelte sich jedoch nicht in einer reduzierten Oberflächenexpression wider. Eine Veränderung der Transkription von  $\alpha 3$  manifestierte sich bei der Gabe von ICI nicht. Ebenso zeigte die veränderte Transkription von  $\beta 1$ -Integrin keine Auswirkung auf dessen Expressionsmuster bzw. -menge.

### 3.6 Östrogenrezeptor-Status von UM-SCC-14A, UM-SCC-14B und UM-SCC-14C

Der bislang unbekannte Gehalt an Östrogenrezeptoren in den in dieser Untersuchung verwendeten PECA-Zelllinien wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt. Hierzu wurde aus den Tumorzellen Gesamt-RNA isoliert, und nach Reaktionsoptimierung erfolgte anschließend die Amplifikation spezifischer Östrogenrezeptor-DNA-Abschnitte.

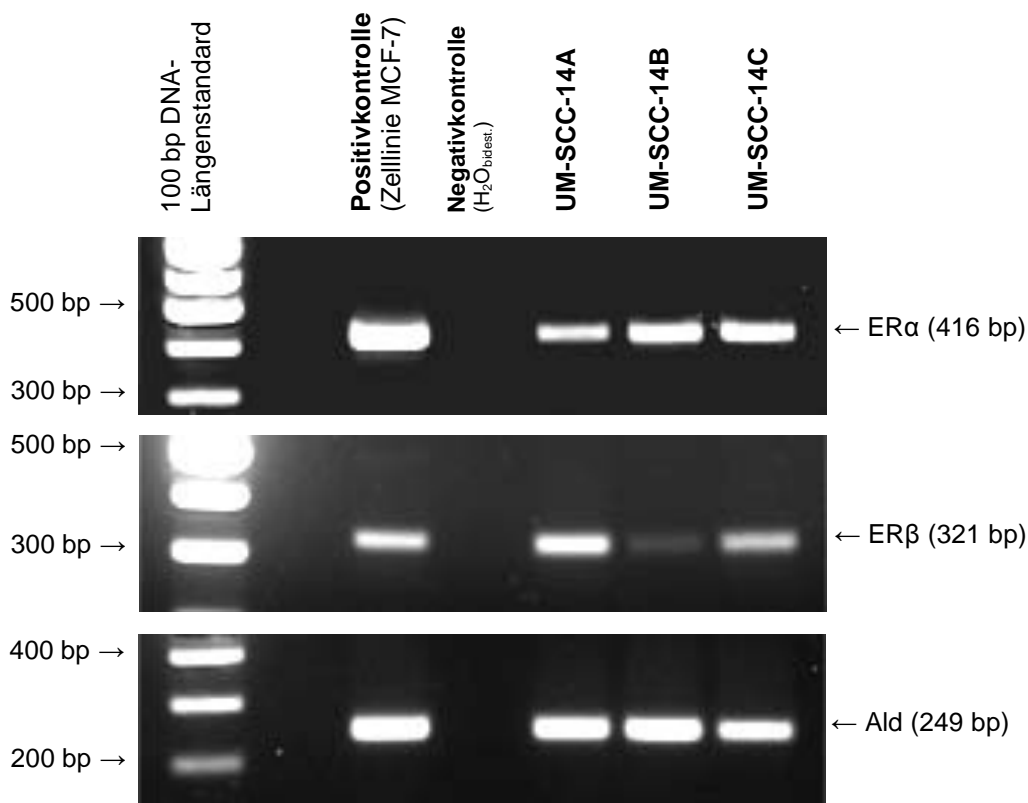


Abb. 3.19 Nachweis der Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  in den unbehandelten Zelllinien UM-SCC 14A, 14B und 14C mittels PCR. Zur endogenen Kontrolle der Reaktionsbedingungen und der aufgetragenen cDNA-Mengen wurde Aldolase verwendet (Ald=*house keeping*-Gen Aldolase).

In Abbildung 3.19 wurden die in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel aufgetragenen PCR-Produkte unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht. Es zeigten sich deutliche Banden in allen untersuchten Zelllinien, weshalb ein positiver Status der Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  in den Zelllinien UM-SCC-14A, 14B und 14C auf RNA-Ebene nachgewiesen wurde. Als Positivkontrolle wurde die für ihren positiven Östrogenrezeptorstatus anerkannte Mammakarzinomzelllinie MCF-7 verwendet. Die Zelllinie UM-SCC-14A zeigt eine deutlich vermehrte Expression von ER $\beta$ , wobei UM-SCC-14B überwiegend ER $\alpha$  exprimiert und zu einem vernachlässigbar geringen Anteil ER $\beta$ . UM-SCC-14C verzeichnete eine größere Anzahl an ER $\alpha$ -positiven Zellen und auch mehr ER $\beta$ -positive Zellen. Somit stellen die untersuchten PECA-Zelllinien eine Diversifikation der Distribution von ER-Expression dar.

## 4. Diskussion

### 4.1 Steroidhormone und Tumorwachstum

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass Östrogene nicht nur das Tumorwachstum, insbesondere des Mamma- und Endometriumkarzinoms, fördern, sondern auch in nicht primär hormonassoziierten Zellen wie z.B. Gliomen einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten aufweisen (Koehler, Helguero et al. 2005; Hecht, Mutter 2006; Tang, Roldan et al. 2006). Der Einsatz selektiv antagonistischer Therapeutika (z.B. Tamoxifen), die das durch Östrogene stimulierte Tumorwachstum beeinflussen, erscheint daher sinnvoll und ist für die Verwendung bei der Therapie von Mammakarzinomen bereits gut dokumentiert. Der Erfolg dieser Therapeutika bei Behandlung des Mammakarzinoms zeigt eine Abhängigkeit vom Status des Östrogenrezeptors, wohingegen sich die Therapie von Gliomen rezeptorunabhängig darstellt (Kim, Lee et al. 2005; Andre, Puztai 2006).

Erste In-vitro-Untersuchungen an Zellen von PECA beschränkten sich auf das Proliferationsverhalten nach Gabe von Tamoxifen (Grenman, Virolainen et al. 1987; Lage 2003; Shapira, Virolainen et al. 1986; Cavallaro, Christofori 2004; Hoffmann, Bojar et al. 2002). Über den Einfluss der Gruppe der selektiven Östrogenrezeptor-modulierenden Agenzien auf die Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsion von Plattenepithelkarzinomzellen und der Alteration der assoziierten Adhäsionsmoleküle existierten bis zu Beginn dieser Arbeit keine Publikationen.

Zur Erfassung möglicher Einflüsse von E2, TAM und ICI wurden aus einem Mundbodontumor etablierte Zelllinien verwendet; die Nutzung dieser von einer weiblichen Person stammenden Karzinomzellen wurde bewusst gewählt. Innerhalb dieser Patientengruppe traten vermehrt Fälle, die keine typischen prädisponierenden Risikofaktoren aufwiesen und häufig mit progressiven und therapieresistenten Karzinomen assoziiert sind, auf (Sturgis, Moore et al. 2005; Chitapanarux, Lorvidhaya et al. 2006; Gilroy, Morris et al. 2005; Verschuur, Irish et al. 1999).

Ebenso sollte auch die Tumorprogression innerhalb der Untersuchungen Berücksichtigung finden, welche sich in den verwendeten Zelllinien, die aus Rezidiven eines zunächst nur chirurgisch behandelten Primärtumors gewonnen wurden, widerspiegelt. Verwendung fanden auch bereits sehr gut charakterisierte Zelllinien, deren Verhalten unter Hormoneinfluss erforscht ist, um so die korrekte

Verwendung von Östrogen und dessen selektiven Antagonisten zu verifizieren. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die verwendeten PECA-Zelllinien Östrogen- und auch SERM-sensitiv sind. Zur möglichen Klärung der Wirkweisen der administrierten Wirkstoffe erfolgte die Erfassung der exprimierten Östrogenrezeptoren der verwendeten Zelllinien, welche ein unterschiedliches Expressionsmuster der Rezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  aufzeigten. Im weiteren Verlauf der Diskussion wird dieser Umstand in Zusammenhang mit den gefundenen Effekten diskutiert.

Die ersten Untersuchungen über den möglichen Einfluss von Tamoxifen auf Zellen des Plattenepithelkarzinoms wurden von Shapira et al. im Jahre 1986 durchgeführt und zeigten einen inhibierenden Einfluss des Therapeutikums auf das Wachstumsverhalten, u. a. auch auf eine der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (UM-SCC-14C). Nachfolgende Untersuchungen zu diesem Thema zeigten eine dosisabhängige Beeinflussung des Wachstums unter Tamoxifentherapie. Tavassoli (Tavassoli, Soltaninia et al. 2002) und Hoffmann (Hoffmann, Bojar et al. 2002) zeigten eine signifikante Inhibition des Wachstums von Zellen des Plattenepithelkarzinoms nur unter Hochdosis-Therapie mit Tamoxifen, d.h. mit Konzentrationen über 1 $\mu$ M. Die Behandlung der Zellkulturen mit Konzentrationen unter 1 $\mu$ M zeigte keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten (Lage 2003; Shapira, Virolainen et al. 1986; Cavallaro, Christofori 2004; Hoffmann, Bojar et al. 2002). Ein Erreichen von hohen Serum- und Gewebekonzentrationen (5-10 $\mu$ M) von Tamoxifen ist physiologisch durchaus möglich und wird auch bei der Therapie von malignen Gliomen eingesetzt (Kim, Lee et al. 2005). Untersuchungen zum Einfluss von Estradiol und ICI auf das Wachstum von Zellen des Plattenepithels liegen bislang nicht vor. Die Wirkung von Östrogenen auf das Proliferationsverhalten von Fibroblasten des Parodontiums zeigt eine Abhängigkeit der Sensitivität der Zellen gegenüber Estradiol, d.h. man findet nicht bei jeder fibroblastischen Zelle eine synergistische Reaktion auf die Hormongabe (Guncu, Tozum et al. 2005; Mariotti 2005). In der bereits angeführten Studie lagen keine Untersuchungen zum ER-Status vor, sodass dies als möglicher Faktor für Östrogensensitivität gelten könnte. Estradiol induziert das Wachstum von Keratinozyten *in vitro* durch vermehrte Expression des Zellzyklus-regulierenden Proteins cyclin D2 durch Aktivierung eines durch den membrangebundenen Östrogenrezeptor GPR30 vermittelten Signals. (Urano, Sakabe et al. 1995; Kanda, Watanabe 2004). In den in dieser Arbeit

untersuchten Zellkulturen von PECA zeigte 17- $\beta$  Estradiol zunächst eine Proliferation der Zellen, welche jedoch bei zwei Zelllinien (UM-SCC-14B und 14C) nach anhaltender Gabe (mehr als 4-tägige Gabe) stagnierte. Eine Erklärung für dieses Phänomen kann eine in Gehirnzellen (Prange-Kiel, Rune 2006) und Zellen der reproduktiven Organe (Murata, Narita et al. 2003) vorkommende, ermittelte Herunterregulierung des ER $\alpha$ -Rezeptors darstellen. Die negativ regulierten Zelllinien zeigten eine vermehrte Expression des ER $\alpha$ -Rezeptors; insbesondere UM-SCC-14B exprimierte ausschließlich diesen Rezeptor und zeigte auch die deutlichste Reduktion der Zellproliferation nach mehrtägiger hoch dosierter Gabe von 17 $\beta$ -Estradiol. ICI 182,780 hingegen wies eine dem Tamoxifen äquivalente Wirkung auf, welche eine Wachstumsinhibition in allen Zelllinien darstellte. Das seit 1991 verwendete ICI 182,780 war bislang als reines Antiöstrogen bekannt, welches seine Wirkung ausschließlich über die Hemmung der Östrogenrezeptoren durch deren Degradation entfaltet (Osborne, Wakeling et al. 2004; Wakeling, Bowler 1992; Wakeling, Dukes et al. 1991). Dies lässt eine Östrogenrezeptor-abhängige Regulation vermuten. Jedoch zeigten Studien in jüngster Zeit, dass ICI auch eine nicht-klassische Regulation des Östrogenrezeptors sowie eine ER-unabhängige Wirkung über Membranrezeptoren (GPR30) auslösen kann (Wang, Traystman et al. 2004; Filardo, Quinn et al. 2002; Filardo, Thomas 2005). Im weiteren Verlauf der Diskussion wird die mögliche Wirkweise von E2, TAM und ICI in Relation zu der Modulation der Zell-Matrix-Adhäsion näher diskutiert.

Durch welche Mechanismen die in Gliomen und PECAs gefundene Wachstumsregulierung erfolgt, ist bislang ungeklärt. Es ist bekannt, dass das Wachstum maligner Zellen multiplen Regulationsmechanismen unterliegt, die in mannigfaltiger Weise beeinflussbar sind (Janes, Watt 2006; Naim, Chang et al. 2006). Die *transforming growth factors*- $\beta$  sind Wachstumsfaktoren, welche in Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung und Zelladhäsion eingebunden sind. Innerhalb maligne transformierter Zellen ist ein früher Verlust dieser Wachstumskontrolle zu verzeichnen (Prime, Davies et al. 2004; Teicher 2001; Han, Lu et al. 2005). Eine Induktion der TGF- $\beta$ 1-Produktion ist bei PECA- Zellen *in vitro* durch TAM induzierbar. Dies scheint in Abhängigkeit zum ER-Status zu stehen; die genauen Mechanismen sind bis dato nicht vollständig geklärt (Kim, Lee et al. 2007; Tavassoli 2002). Jedoch kann dieses Phänomen nicht den alleinigen

Regulationsmechanismus darstellen, da ICI eine TGF- $\beta$ 1-Modulierung abmildert bzw. verhindert (Dhandapani, Wade et al. 2005).

#### **4.2 Einfluss von Estradiol, Tamoxifen und ICI182,780 auf die Zell-Zell-Adhäsion**

Intakte Zell-Zell-Verbindungen korrelieren mit antiinvasiven Eigenschaften, d.h. die reduzierte Fähigkeit der Bindung der Zellen miteinander setzt bereits in der frühen Karzinogenese ein (Syrigos, Karayiannakis 2006; Mareel, Berx et al. 1996). Zellaggregationsassays ermöglichen die Untersuchung der Fähigkeit der Komplexbildung in neoplastischen epitheloiden Zellen. Sie finden auch Anwendung bei der Unterscheidung von invasiven und nicht-invasiven Zelltypen. Die im Rahmen dieser Arbeit benutzte Assay-Form erlaubt die Quantifizierung der gefundenen Zell-Zell-Verbindungen und wird häufig zur Erfassung der Wirkung therapeutischer Agenzien verwendet (Bracke, Van Larebeke et al. 1991; Bracke, Vyncke et al. 1993; Bracke, Charlier et al. 1994; Charlier, Bruyneel et al. 1996; Boterberg, Bracke et al. 2001). Die Anwendung dieses Assays für Zellen von Mamma- und Kolonkarzinomen ist dokumentiert (Vermeulen, Bruyneel et al. 1995; Vermeulen, Nollet et al. 1997). In dieser Arbeit war eine signifikante Wachstumsinhibition unter TAM-Behandlung mit einer Steigerung der Fähigkeit zur Bildung von Zellaggregaten durch erhöhte Zell-Zell-Adhäsion in den ER- $\beta$ -positiven PECA-Zelllinien assoziiert. Estradiol und ICI induzierten in allen PECA-Zelllinien eine Verbesserung der adhäsiven Eigenschaften. Veränderungen der Zell-Zell-Interaktion werden auf Alterationen von E-Cadherin und dessen assoziierten Proteinen zurückgeführt, diese wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht und werden in Abschnitt 4.4 und 4.5 diskutiert.

#### **4.3 Veränderung der Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion an Laminin-1**

Lokomotion von Tumorzellen bedingt ein Wechselspiel der adhäsiven Fähigkeiten dieser mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Huttenlocher, Sandborg et al. 1995; Matsumoto, Ziober et al. 1995). Hierbei handelt es sich um einen dynamischen Prozess, bei welchem spezifische Proteine „an- und ausgeschaltet“ werden, dieser

Aspekt konnte in dem hier verwendeten Adhäsionsassay nicht untersucht werden. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Assay zur Erfassung der adhäsiven Fähigkeiten der PECA-Zellen erlaubt die Quantifizierung der Interaktion der Zellen mit dem Protein Laminin-1. Die Interaktion von epitheloiden Zellen mit Laminin-1 ist nicht vorhanden, was jedoch mit zunehmender Transformation der Zellen verloren geht. So ist eine rein quantifizierende Momentaufnahme dieser veränderten Bindungseigenschaften bereits ein Indikator für das veränderte Zell-ECM-Verhalten. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PECA-Zellen zeigten die Fähigkeit der Adhäsion an LN-1; eine deutliche Zunahme der Adhäsion konnte mit Steigerung der Entdifferenzierung der Zellen verzeichnet werden. ICI und TAM verminderten die Adhäsionsfähigkeit der Zellen an LN-1 in allen Zelllinien, wohingegen E2 nur in ER $\beta$ -positiven Zelllinien einflussnehmend wirkte.

#### **4.4 Morphologische Alterationen der Expressionsmuster der Zelladhäsionsmoleküle in der histomorphometrischen Analyse**

Die Immunfluoreszenz umfasst die Markierung eines Proteins mit einem fluoreszierenden Antikörper und ist eine häufig angewandte Technik, um einzelne Proteine in fixierten Zellen zu identifizieren. Hiermit wird in der Regel die Lokalisation des untersuchten Proteins untersucht, eine relative Quantifikation kann unter bestimmten Bedingungen durchgeführt werden, jedoch ist dies nur bei erheblichen Veränderungen möglich (Janes, Watt 2006). Eine Quantifizierung der Expressionsveränderungen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelladhäsionsmoleküle war aufgrund der geringen Änderung nicht durchführbar. Die Methode diente der Lokalisation von E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin und der Integrine sowie der Darstellung ihrer Beteiligung an Zell-Zell- bzw. der Zell-ECM-Interaktion. Diese bereits seit mehr als fünfzig Jahren angewandte Methode zeigt eine hohe Spezifität, jedoch ist eine wiederholte Auswertung aufgrund von „photobleaching“ nicht möglich (Coons, Creech et al. 1942; Giloh, Sedat 1982; Johnson, Davidson et al. 1982). Später auftauchende Fragestellungen können nur anhand der aufgenommenen Fotos beantwortet werden.

Durch Verwendung der Immunfärbung können in subzellulären Regionen lokalisierte Proteine, nach geeigneter Permeabilisation der Zellen, untersucht werden. Ebenso



erlaubt die Methode die Darstellung einer Umordnung der untersuchten Proteine nach Stimulation (Giloh, Sedat 1982; Coons, Creech et al. 1942; Johnson, Davidson et al. 1982). Durch die Permeabilisation konnte das Vorhandensein von üblicherweise membranständigen Proteinen, wie beispielsweise  $\beta$ -Catenin, im Nukleus und im Zytoplasma der PECA-Zellen erfolgen. Dieses Phänomen ist bereits in histologisch untersuchten Plattenepithelkarzinomen *in vivo* beschrieben und eine Korrelation dieser atypischen Expression ist mit einer verminderten Überlebenszeit der Patienten bzw. einem frühen lokalen Rezidiv korreliert (de Aguiar, Kowalski et al. 2006).

Durch Translokation von  $\beta$ -Catenin aus dem E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplex und durch Störung der Degradation kommt es zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und Nukleus (Iwai, Katagiri et al. 2005; Zhang, Zhou et al. 2005). Die Bindung von  $\beta$ -Catenin an E-Cadherin ist essentiell für deren Beteiligung an der Zell-Zell-Adhäsion, die durch Störung dieses Komplexes unmöglich wird. In weiteren Versuchen wurde das Vorhandensein eines intakten E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplexes untersucht (s. S. 60). Es zeigte sich keine Veränderung des Expressionsmusters von E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin nach Administration der Agenzien Estradiol, Tamoxifen und ICI trotz der Induktion der Zell-Zell-Adhäsion. Die Expression der Integrine zeigte keine quantitative Veränderung.

Die in der vorliegenden Arbeit verwandten Zelllinien unterscheiden sich deutlich im Phänotyp und erlauben somit eine Differenzierung von Zellen in unterschiedlichen Stadien. Eine der Zelllinien (UM-SCC-14B und ER $\alpha$ -positiv) zeigt eine deutliche Ausprägung von Filopodien und die Beteiligung von  $\alpha$ 3- und  $\beta$ 1-Integrin an der Bildung selbiger. Dieses Phänomen wird in Plattenepithelkarzinomen *in vivo* beschrieben und ist mit Invasion und Metastasierung assoziiert (Giannelli, Milillo et al. 2001; Kawano, Kantak et al. 2001). Die Verminderung der Filopodien und Verringerung der Expression der hieran beteiligten Integrine wurde durch Administration von ICI und Tamoxifen ausgelöst und lässt eine Reduktion der Invasivität vermuten. Ebenso zeigte  $\alpha$ 3 und  $\beta$ 1 eine Beteiligung an den Zell-Zell-Kontakten (Eriksen, Steiniche et al. 2004). Das Fehlen hemidesmosomaler Strukturen war in den Zelllinien UM-SCC-14A und -14B ausgeprägt, welches sich durch eine ungerichtete basale Expression der Integrine  $\alpha$ 6 und  $\beta$ 4 darstellte. Unter ICI-Behandlung deutete sich eine Redistribution dieser Proteine zu polarisierten geordneten Strukturen, ähnlich hemidesmosomaler Verbindungen, in der

entdifferenzierten ER $\alpha$ - und ER $\beta$ -positiven Zelllinie, an (Eriksen, Steiniche et al. 2004; Herold-Mende, Kartenbeck et al. 2001; Baker, Hopkinson et al. 1996). Diese Redistribution ist mit einer Verminderung der metastasierenden Eigenschaften verbunden, der zugrunde liegende Mechanismus dieser Assemblierung ist bislang ungeklärt (Litjens, de Pereda et al. 2006).

#### **4.5 Veränderungen der Expression und Translation der Proteine E-Cadherin, $\beta$ -Catenin und der Integrine**

##### **4.5.1 E-Cadherin und $\beta$ -Catenin**

E-Cadherin gilt als Tumorsuppressor, der durch Modulation der Zell-Zell-Adhäsion eine Regulation des Zellwachstums ausüben kann. Diese Fähigkeit steht in Abhängigkeit zu funktionellem Status und Expressionsmuster des Zelladhäsionsmoleküls. Der Verlust von E-Cadherin ist mit einer Entdifferenzierung und erhöhter Invasivität von humanen Karzinomzellen *in vitro* assoziiert (Cavallaro, Christofori 2004). Eine inverse Korrelation der E-Cadherin-Expression und der Entdifferenzierung von Zellen des Plattenepithelkarzinoms ist bekannt (Diniz-Freitas, Garcia-Caballero et al. 2006); dies zeigt sich bei schlecht differenzierten PECA, die nur wenig bis kein E-Cadherin exprimieren. In dieser Arbeit war unter TAM-Behandlung eine signifikante Steigerung der Fähigkeit zur Bildung von Zellaggregaten durch erhöhte Zell-Zell-Adhäsion sichtbar, welche eine Modulation von E-Cadherin vermuten ließ. Wenig ist bislang über Mechanismen, die die E-Cadherin-Expression oder -Funktion wiederherstellen oder beeinflussen können, bekannt. Ebenso wenige Erkenntnisse existieren über intrinsische Faktoren, welche eine Modulation der adhäsiven Eigenschaften bewirken. Diskutiert werden Mutationen des E-Cadherin-kodierenden Gens, welche aber in Zellen von Plattenepithelkarzinomen bislang nicht aufgefunden werden konnten (Kudo, Kitajima et al. 2004). Epigenetische Mechanismen für die Inaktivierung von E-Cadherin beinhalten eine veränderte Expression von regulierenden Faktoren der Gentranskription oder die Hypermethylierung der Promoterregion (Fearon 2003; Chen, Lipkina et al. 2004; Auerkari 2006; Graff 1995). Es ist bekannt, dass in Mammakarzinomen die Regulierung des „zinc finger transcription factor“ Snail, einem

Repressor der E-Cadherin-Transkription, durch Östrogenrezeptor-abhängige Modulation inhibierbar ist (Tamura, Sakaki et al. 2003). Eine Veränderung der Transkription von E-Cadherin unter dem Einfluss von TAM konnte nicht nachgewiesen werden, daher erscheint die Beeinflussung durch Regulation auf genetischer Ebene eher unwahrscheinlich.

Die gesteigerte Fähigkeit vermehrt Zellaggregate zu bilden, impliziert eine mögliche Reexpression von E-Cadherin auf der Zellmembran. Das Expressionsmuster von E-Cadherin bestätigt nicht die Richtigkeit dieser Implikation. Die unbehandelten Zellen der drei verwendeten PECA-Zelllinien zeigten, entsprechend ihres Differenzierungsgrads, eine verminderte Expression des Proteins auf der Zellmembran, welche durch TAM-Administration keine Veränderung erfuhr. Konstant blieb ebenso die Gesamtproteinmenge der Zellen. Die bereits bestehende extrem verminderte Expression von E-Cadherin in der schlecht differenzierten Zelllinie UM-SCC-14C zeigte sogar eine weitere Verminderung der Expression des Zelladhäsionsmoleküls auf der Zelloberfläche trotz Steigerung der Zell-Zell-Adhäsion. Die adäquate homophile Interaktion zweier auf benachbarten Zellen exprimierten E-Cadherin-Moleküle bedingt einen funktionierenden E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplex (Brembeck, Rosario et al. 2006; Wheelock, Johnson 2003). Die Unfähigkeit der Bildung des Komplexes sowie der Expression desselben in der Zellmembran oder seiner Möglichkeit der Bindung an das Zytoskelett trotz der Anwesenheit von  $\beta$ -Catenin zeigte sich in UM-SCC-14C. Diskutiert werden biochemische Modifikationen der Proteine durch Phosphorylierung, die eine regelrechte Bindung verhindern (Wijnhoven, Dinjens et al. 2000; Tamura, Sakaki et al. 2003; Lilien, Balsamo 2005) und somit keine funktionstüchtige Interaktion von E-Cadherin mit  $\beta$ -Catenin erlauben. Die bereits beschriebene und in Zellen des PECA gefundene Tyrosin-Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin konnte in der untersuchten Zelllinie nicht nachgewiesen werden, was auf andere Defekte seines Degradationsmechanismus hinweist. Mutationen von  $\beta$ -Catenin, wie für einige Karzinomarten beschrieben, wurden in Zellen des Plattenepithels bislang nicht gefunden (Hajra, Fearon 2002; Hirohashi, Kanai 2003). Es ist bekannt, dass ungebundenes  $\beta$ -Catenin, sofern es nicht sofort degradiert wird, an Signaltransduktionswegen zur Aktivierung von Zielgenen teilnimmt (Conacci-Sorrell, Zhurinsky et al. 2002). Hierbei handelt es sich um Gene, die an der Zellproliferation, der Inhibition, der Apoptose und der Migration teilnehmen (Behrens 2000;

Wijnhoven, Dinjens et al. 2000; Tamura, Sakaki et al. 2003; Scully, Bagan et al. 2005). Kantak und Kramer zeigen eine Verstärkung der interzellulären Adhäsion durch E-Cadherin in „Anchorage independent“ PECA-Zellen, welche allerdings mit einer Suppression der Apoptose und Anregung des Wachstums korreliert (Kantak, Kramer 1998). Resultate diverser Studien, die die Manipulation von E-Cadherin beinhalten, deuten auf die Komplexität und Diversität der Funktion dieser Moleküle bei der Regulation des Zellwachstums hin.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten eine vermehrte Zell-Zell-Adhäsion und eine signifikante Wachstumsinhibition nach hochdosierter Administration von Tamoxifen. Diese ging jedoch nicht mit einer veränderten E-Cadherin-Expression auf der Zelloberfläche einher. Eine Alteration der Menge an Gesamtprotein von E-Cadherin und dessen Transkription war nicht vorzufinden. Die progressive, schlecht differenzierte Zelllinie UM-SCC-14C zeigte einen völligen Verlust des klassischen E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplexes, was auf andere Zelladhäsionsmechanismen hindeutet. Hier könnten nicht-epitheliale Cadherine, wie z.B. N-Cadherin oder R-Cadherin, welche bevorzugt in hoch aggressiven metastatischen epithelialen Tumoren auftreten, und deren Teilnahme an der Herunterregulierung von E-Cadherin und interzellulären Adhäsion diskutiert wird, verantwortlich sein (Maeda, Johnson et al. 2006).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Wachstumsinhibition von Zellen des Plattenepithelkarzinoms in Kultur durch hochdosierte Tamoxifengabe resultiert, ebenso wird die Zell-Zelladhäsion verstärkt; jedoch ohne Beteiligung des klassischen Zelladhäsionskomplex E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin. Somit kann eine Beteiligung des Tumorsuppressors E-Cadherin an der Regulation der in diesen Zelllinien gefundenen Zellproliferation ausgeschlossen werden. Zur Klärung der Mechanismen der Zellwachstumsregulation und der Verbesserung der interzellulären adhäsiven Fähigkeiten in Plattenepithelkarzinomen *in vitro* durch Tamoxifen sollte der Fokus auf andere als die klassischen E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Moleküle gesetzt werden.

#### 4.5.2 Integrine

Die Funktion von Integrinen auf z.B. die Proliferation von Zellen ist sehr differenziert und abhängig vom Zell- und Gewebetyp; ebenso unterliegen transformationsbedingte Veränderungen des Integrinmusters diesen Abhängigkeiten (Zutter, Santoro 1990; Santala, Larjava et al. 1994). Normale epitheliale Zellen ligieren über Integrinrezeptoren mit spezifischen extrazellulären Matrixproteinen. Erwiesen ist, dass die Fähigkeit der Bindung an extrazelluläre Matrixproteine bei maligne transformierten Epithelzellen alteriert oder verloren wird (Evans, Jones et al. 2004). Veränderungen der Interaktion mit dem Stroma können zur epithelialen Transformation beitragen (Park, Bissell et al. 2000; Liotta, Kohn 2001).

In epithelialen Geweben interagiert das Integrin  $\alpha 3\beta 1$  bevorzugt mit Laminin-5, wohingegen in typischer Weise Plattenepithelkarzinomzellen ebenfalls eine Interaktion mit LN-1 zeigen und hierdurch eine deutliche Permission zur Proliferation erfahren (Zhang, Kim et al. 1996; Andriani, Garfield et al. 2004). PECA-Zellen können LN-1, LN-5 und LN-10 synthetisieren und über die Integrinheterodimere  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 4$  binden, dies korreliert mit der Induktion von Zellproliferation und reduzierter Apoptose (Kim, Lee et al. 1999; Patarroyo, Tryggvason et al. 2002; Givant-Horwitz, Davidson et al. 2005; Morini, Mottolese et al. 2000). Dieser Aspekt kann, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, mit der Fähigkeit der verwendeten PECA-Zellen zur Adhäsion an LN-1 verbunden sein; eine deutliche Zunahme der Adhäsion konnte mit Steigerung der Entdifferenzierung der Zellen verzeichnet werden. ICI und TAM verminderten die Adhäsionsfähigkeit der Zellen an LN-1 in allen Zelllinien, wohingegen E2 nur in ER $\beta$ -positiven Zelllinien einflussnehmend wirkte. Die Verminderung der adhäsiven Kapazität der Zellen war mit einer Verminderung der Oberflächenexpression von  $\alpha 3$  in den ER $\alpha$ -positiven Zelllinien assoziiert. Die durch FACS gezeigte Verminderung der Expression von  $\alpha 3$  konnte in Zuge der histomorphometrischen Untersuchung nicht bestätigt werden. Dies ist aber nicht ungewöhnlich, da die Sensitivität und Aussagekraft bei einer quantitativen Veränderung der Integrinexpression um das 2-3fache mit immunhistochemischen Methoden nur unzureichend zu detektieren ist (Zhu, Haase et al. 1999). Jedoch zeigte die immunhistologische Fluoreszenzfärbung eine gegenüber nicht-maligne transformierten Zellen veränderte Expression der Integrine. Diese entsprach jedoch der bereits beschriebenen typischen Verteilung der Rezeptoren in malignen PECA-

Zellen *in vitro* (Bagutti, Speight et al. 1998; Litjens, de Pereda et al. 2006). Eine Beteiligung von  $\alpha3\beta1$  an Zell-Zell-Kontakten wird vermutet und konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden, da eine Expression in den Kontaktbereichen benachbarter Zellen vorzufinden war (Chattopadhyay, Wang et al. 2003; Zhang, Tom et al. 2003; Pakkala, Virtanen et al. 2002; Zhang, Alt-Holland et al. 2006). Es ist bekannt, dass eine interdependente Regulation der Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Matrix-Interaktion existiert, da nachgewiesen werden konnte, dass eine Verminderung von E-Cadherin und somit ein Verlust an Zell-Zell-Adhäsion mit einer Elevation der Oberflächenexpression von  $\alpha2$ ,  $\alpha3$  und  $\beta1$  verbunden ist (Zhang, Tom et al. 2003; Zhang, Alt-Holland et al. 2006). In der vorliegenden Untersuchung konnte eine Veränderung der interzellulären adhäsiven Eigenschaften ohne Veränderung der Expression von E-Cadherin gezeigt werden, was die Vermutung zulässt, dass die Regulation der Zell-Zell-Verbindung durch Integrine erfolgt. Ebenso ist  $\alpha3\beta1$  an der Invasion bzw. Migration beteiligt, da es in den Filopodien der isolierten Zellen exprimiert wurde (Ghosh, Johnson et al. 2006). Die Anzahl der Filopodien und auch die Expression von  $\alpha3$ -Integrin in den Zellausläufern war in der ER- $\alpha$  positiven Zelllinie deutlich verringert, sodass eine verminderte Migrations- und Proliferationsfähigkeit vermutet werden kann. Das Expressionsmuster von  $\beta1$  in der histomorphometrischen Analyse ähnelt dem von  $\alpha3$  und zeigt eine entsprechende Veränderung in der Distribution auf der Zelloberfläche unter Behandlung mit TAM und ICI. Dieser Effekt legt die Vermutung einer Abhängigkeit der beiden Bindungspartner nahe. Diese wird bei der Herunterregulierung der Transkription von  $\beta1$  unter Gabe von TAM und E2 in UM-SCC-14B umso deutlicher. In vulvalen Karzinomen resultiert eine verminderte Expression von  $\alpha3$  aus einer Herunterregulation von  $\beta1$  (Brockbank, Bridges et al. 2005). Es wird vermutet, dass das ungebundene  $\alpha3$ -Integrin zu instabil ist, um eine Bindung mit der  $\beta$ -Untereinheit einzugehen, falls in nicht ausreichender Menge Bindungspartner zur Verfügung stehen. Der genaue Mechanismus dieser Abhängigkeit ist unbekannt, jedoch ist eine Vermehrung der Expression von  $\alpha3$  durch Reexpression von  $\beta1$  möglich (Brakebusch, Wennerberg et al. 1999).

Die Integrine  $\alpha6$  und  $\beta4$  zeigten unter Hormongabe keine Veränderung ihrer Expression oder Transkription. Eine Beteiligung an den Veränderungen der Zell-Matrix-Adhäsion der Zellen an LN-1 kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da

histomorphometrische Untersuchungen Veränderungen im Expressionsmuster der einzelnen beteiligten Integrine aufzeigten. In unveränderten epithelialen Zellen sieht man eine streifige und somit strukturierte Anordnung der Moleküle zur Formation von Hemidesmosomen; diese war bei den untersuchten unbehandelten Zelllinien nur vereinzelt sichtbar oder fehlte völlig. In der ER- $\alpha$ -positiven Zelllinie sah man die Ausbildung von Hemidesmosomen auf vereinzelt Zellen. Die Adhäsion dieser Zelllinie an Laminin-1 war deutlich geringer als in den Zelllinien UM-SCC-14A und UM-SCC-14C, die ein völliges Fehlen der gerichteten Zell-Matrix-Verbindungen in Form von Hemidesmosomen aufzeigten.  $\alpha 6\beta 4$  wies eine hohe Bindungsspezifität an Laminin-332 (LN-5) auf. Dies gilt jedoch nicht für Laminin-1, da diese Spezifität auch nach maligner Transformation der Zelle konstant blieb (Nishiuchi, Takagi et al. 2006; Dogic, Rousselle et al. 1998; Gilcrease 2006; Aumailley, Bruckner-Tuderman et al. 2005). Diese Beobachtung bestätigt Vermutungen, dass das Vorhandensein hemidesmosomaler Strukturen eine verminderte Laminin-1-Bindung bedingt, und ein Verlust der Polarität der exprimierten Integrine mit einem veränderten Bindungsverhalten einhergeht. Ebenso können Integrine wie z.B.  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin, die vorwiegend suprabasal exprimiert werden und an der Zell-Zell Adhäsion beteiligt sind, bei erhöhter Migrationsfähigkeit respektive Karzinogenese eine basale Expression mit höherer Bindungsaffinität zu Laminin-1 zeigen (Dogic, Rousselle et al. 1998; Kawano, Katak et al. 2001; Garzino-Demo, Carrozzo et al. 1998; Herold-Mende, Kartenbeck et al. 2001; Nishiuchi, Murayama et al. 2003; Givant-Horwitz, Davidson et al. 2005).

Nach Administration von ICI konnte eine Tendenz zur Reformation hemidesmosomaler Strukturen in der undifferenzierten Zelllinie und eine Verminderung der adhäsiven Fähigkeit an Laminin-1 ausgemacht werden. Die Ausbildung von Hemidesmosomen und einer gerichteten Struktur kann zur Inhibition der Proliferation beitragen, hierzu werden verschiedene Mechanismen diskutiert (Litjens, de Pereda et al. 2006). Eine direkte Beteiligung an der Zell-Zell-Adhäsion ist auszuschließen, da zu keinem Zeitpunkt eine Anreicherung von  $\alpha 6$  und  $\beta 4$  in den Zell-Zell-Kontaktbereichen zu finden war. Jedoch waren beide Integrine an der Protrusion der Zellen in den hier untersuchten Zelllinien beteiligt, da eine Anreicherung der Proteine in den Lammelli- und in den Filopodien zu finden war (Geuijen, Sonnenberg 2002; Santoro 2003). Diesbezüglich sei noch einmal

erwähnt, dass ein möglicher „cross-talk“ zwischen  $\alpha6\beta4$  und  $\alpha3\beta1$  zu veränderten interzellulären adhäsiven Fähigkeiten führen kann (Litjens, de Pereda et al. 2006).

Die Zell-Matrix-Interaktion kann nicht nur durch quantitative Veränderungen der dafür verantwortlichen Rezeptoren beeinflusst werden, ebenso kann eine Konformationsänderung des Integrinkomplexes ein alteriertes Zell- und Signalverhalten induzieren (Luo, Springer 2006; Mould, Humphries 2004).

Die Konzentrationen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Therapeutika waren höher als physiologische Plasmaspiegel und auch höher als die Menge, die es zur Sättigung des nukleären Rezeptors bedarf (Dahlman-Wright, Cavailles et al. 2006; Brooks, Skafar 2004; Berger, Borchard et al. 1997). Daher ist ein rein pharmakologischer Nebeneffekt nicht auszuschließen; dieser kann durch Aktivierung von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren oder Protein-Lipid-Kinase-Signalwege ohne Veränderung der Transkription stattfinden (Warner, Gustafsson 2006; Purves-Tyson, Keast 2004; Acconcia, Manavathi et al. 2006). Durch Aktivierung von Kinase-Signalwegen kann die Konformation oder Funktion des Integrinkomplexes beeinflusst oder verändert werden (Ginsberg, Partridge et al. 2005), z.B. durch Beeinflussung von ILK (Integrin-linked Kinase), welche an die zytoplasmatische Domäne von  $\beta1$  binden und durch Aktivierung wiederum andere Proteine wie z.B. Akt und GSK3 $\beta$  phosphorylieren kann (Sakai, Li et al. 2003; Nho, Xia et al. 2005). Ebenso ist die Regulation von an Integrin gebundene Src-Kinasen bekannt, welche ein „downstream signaling“ von Zellmembranrezeptoren auslösen und eine Rolle bei der Proliferation und Invasion von Tumorzellen spielen (Playford, Schaller 2004; Klinghoffer, Sachsenmaier et al. 1999). Die zuvor beschriebene Aktivierung von Signalwegen könnte eine veränderte Zell-Matrix Interaktion bewirken, welche eine Wachstumsinhibition auslöst. Der Vorgang der Wachstumsinhibition kann allerdings auch unabhängig von der Zell-Matrix Interaktion erfolgen (Janes, Watt 2006). Eine Inhibition des Wachstums von PECA-Zellen durch Reduktion der  $\alpha3\beta1$ -Expression bei TAM-Administration ist bekannt, jedoch sind die Mechanismen der Regulation bislang noch völlig ungeklärt (Giannelli, Astigiano et al. 2002; Janes, Watt 2006). Eine alleinige Beteiligung des Integrins  $\alpha3\beta1$  an den Veränderungen des Wachstumsverhaltens und der Zell-Matrix-Adhäsion ist jedoch auszuschließen, da in den ER- $\beta$ -positiven Zelllinien eine Regulierung ohne veränderte Transkription oder Expression der Integrine zu sehen war.



#### 4.6 Rolle des Östrogenrezeptors (Wirkweise der Hormone)

Das Wachstum der untersuchten Plattenepithelkarzinomzellen zeigt eine Regulation durch Administration der Wirksubstanzen Estradiol, Tamoxifen und ICI182,780; wobei die verwendeten Zelllinien einen differierenden Östrogenrezeptorstatus aufwiesen (Nelson, Helmstaedter et al. 2006). Eine Zelllinie exprimiert nur ER $\alpha$  (UM-SCC-14B) und zwei Zelllinien wiesen ein unterschiedliches Expressionsmuster von ER $\alpha$  und ER $\beta$  auf; hiervon zeigte UM-SCC-14A vornehmlich ER $\beta$ -Expression und UM-SCC-14C ER $\alpha$ -Expression. Estradiol induzierte das Wachstum der drei PECA-Zelllinien anfänglich, darauffolgend war nach prolongierter Gabe (4 Tage) von Estradiol eine deutliche Inhibition zu verzeichnen. Dieses Phänomen ist für Zellen der reproduktiven Gewebe (Murata, Narita et al. 2003) bekannt und auch in Gehirnzellen nachgewiesen (Prange-Kiel, Rune 2006). Tamoxifen und ICI inhibieren das Wachstum in synergistischer Weise und implizieren einen ER-abhängigen Signalweg, in dem ICI seinen Effekt via ER ausübt. ICI wirkt als kompletter Östrogen-Antagonist, mit keiner agonistischen Eigenschaft, via Hemmung von AF-1 und AF-2 in ER $\alpha$  und ER $\beta$  (Osborne, Wakeling et al. 2004). Regulatorische Effekte von ICI können durch Aktivierung der AP-1 Domäne eines Rezeptors ohne Vorhandensein der AF-1 Bindungsstelle generieren. Ist ER $\beta$  vorhanden, so moduliert dieser Rezeptor die Aktivität von ER $\alpha$ ; wobei Estradiol die ER $\beta$ -abhängige Transkription durch AP-1 hemmt. Aufgrund dieses Mechanismus wird die Wirkung der Herunterregulation von ER $\alpha$ , nach prolongierter Administration von Estradiol, verstärkt. Tamoxifen und ICI stimulieren die Gentranskription in ER $\beta$  via AP-1 (Bjornstrom 2005; Paech, Webb et al. 1997). Die Stimulation von AP-1 durch ICI resultiert in der Aktivierung von Wachstumsfaktoren und Kinasen (Papadimitrakopoulou 2006; Wang, Traystman et al. 2004); eine Stimulation von TGF- $\beta$ 1 durch Tamoxifen wird für die Wachstumsinhibition diskutiert (Kim, Lee et al. 2007; Tavassoli, Soltaninia et al. 2002). Diese Stimulation ist vermutlich ER-abhängig, jedoch wurde der exakte Wirkmechanismus bislang noch nicht geklärt (Kim, Lee et al. 2007). ICI hingegen zeigt eine Attenuierung des Effektes auf die TGF- $\beta$ -Aktivierung, welche auf eine von TGF- $\beta$  unabhängige Wachstumsmodulation hindeutet, die jedoch ER-abhängig zu sein scheint (Dhandapani, Wade et al. 2005). Estradiol mediert seinen Einfluss auf die adhäsiven Fähigkeiten der PECA-Zellen via

Östrogenrezeptor ER $\beta$  oder einen nicht-klassischen Signalweg; in der ER $\alpha$ -positiven Zelllinie (UM-SCC-14B) war keine Alteration der adhäsiven Eigenschaften an Laminin-1 zu verzeichnen. Regulatorische Estradiol-agonistische Effekte von ICI182,780, wie in den ER $\alpha$ - und ER $\beta$ -positiven Zelllinien, kann nur durch die Aktivierung der AP-1-Domäne via ER $\alpha$  erfolgen und wird durch ER $\beta$  negativ moduliert (Bjornstrom 2005). Die ER $\alpha$ -positive Zelllinie erfuhr jedoch keine Modulation der adhäsiven Fähigkeiten durch Estradiol, dies lässt auf einen nicht-klassischen Signalweg schließen (Papadimitrakopoulou 2006 ; Wang, Traystman et al. 2004). Der entsprechende Wirkmechanismus scheint ER-unabhängig zu sein und beinhaltet vermutlich die Aktivierung des Membranrezeptors GPR30, welcher eine agonistische Reaktion von TAM und ICI in den Zielzellen erlaubt (Brockbank, Bridges et al. 2005).

## 5. Zusammenfassung

Störungen der Expression oder der Funktion von Adhäsionsmolekülen können eine Voraussetzung für das invasive und metastasierende Wachstum von Karzinomen darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen bestimmter Zelladhäsionsmoleküle und die hiermit assoziierten funktionellen Änderungen an drei Plattenepithelkarzinomzelllinien erfasst. Adhäsionsmoleküle hormonabhängiger Karzinome unterliegen dem Einfluss von Steroidhormonen, insbesondere Estradiol, und scheinen einer Therapie mit selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (Tamoxifen, ICI182,780) zugänglich. In jüngster Zeit wurden verstärkt hormonelle Einflüsse auf nicht primär hormonsensitive Organe bzw. Gewebe untersucht. Hierbei zeigen selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERM) einen therapeutischen Nutzen bei der adjuvanten Therapie von Gliomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen.

Der Einfluss von Hormonen und SERM auf Zellen oraler Plattenepithelkarzinome ist bislang nur unzureichend oder gar nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Einflüsse einer Estradiol- und Antiöstrogenbehandlung auf das Wachstum und die Adhäsionsmoleküle sowie deren assoziierte Funktionen in PECA-Zellen an Hand von drei Zelllinien, mit unterschiedlichem Östrogenrezeptorgehalt, untersucht.

Es konnte unter Nutzung von Proliferationsassays gezeigt werden, dass die Proliferation von oralen Plattenepithelkarzinomzellen *in vitro* nach Administration von Tamoxifen und ICI182,780 (ICI) inhibiert wurde. Dieser Einfluss scheint östrogenrezeptorabhängig mediiert zu werden. Die proliferationshemmende Wirkung ist mit einer gesteigerten Fähigkeit der Zell-Zell-Adhäsion assoziiert. Beide Vorgänge gehen jedoch nicht mit einer vermehrten Expression des Tumorsuppressors und Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin einher. Hierbei wurde die Expression von E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie bestimmt, zur Erfassung der Gesamtproteinmenge und der Translationsrate von E-Cadherin wurden Western- und Northern-Blot durchgeführt.

E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin zeigten eine verminderte und lückenhafte Expression an der Zellmembran,  $\beta$ -Catenin war ebenso im Zytoplasma und Nukleus der Zellen aufzufinden. Obwohl  $\beta$ -Catenin in der Zellmembran exprimiert wurde, war die Funktionalität des, unter Verwendung der Immunopräzipitation, gefundenen defekten

E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplexes gestört. Diese konnte auch durch Administration der genannten Agenzien nicht wieder hergestellt werden, sodass hier vermutet werden kann, dass andere Proteine die Zell-Zell-Adhäsion in den Zellen mit defektem E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin-Komplex und den E-Cadherin-defizienten Zellen vermitteln.

Es ist bekannt, dass das Proliferations- und Invasionsverhalten von epithelialen Tumorzellen ebenfalls von dem Bindungsvermögen der Zellen an Proteine der extrazellulären Matrix abhängig ist. Die Eigenschaft an das ECM-Protein Laminin-1 zu binden steigt mit der malignen Transformation epithelialer Zellen, begleitet von einer veränderten bzw. vermehrten Expression der Integrine  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha6\beta1$  und  $\alpha6\beta4$ . Adhäsionsassays bestätigten diese Vermutung: In allen drei Zelllinien konnte eine deutlich erhöhte Fähigkeit der Adhärenz der Zellen an Laminin-1 gezeigt werden. Die selektiven Östrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen und ICI bewirkten in allen Zelllinien eine Minderung der Lamininadhäsion unabhängig vom Östrogenrezeptorstatus. Estradiol hingegen zeigte nur in den ER $\beta$ -positiven Zelllinien eine adhäsionsmindernde Wirkung. Ein verändertes Adhäsionsverhalten ist häufig mit einem veränderten Expressionsmuster der assoziierten Integrine verbunden, dies kann sich quantitativ oder qualitativ darstellen. Flowzytometrische Messungen und die Erfassung der Translationsrate mittels Northern-Blot und RT-PCR zeigten keine mit der Adhäsionsreduktion adäquat korrelierte quantitative Veränderung der Integrine. Die Integrine  $\alpha6$  und  $\beta4$  zeigten in keiner Zelllinie quantitative Veränderungen. Das Integrin  $\alpha3$  zeigte eine statistische signifikante Reduktion der Oberflächenexpression unter Tamoxifen 1 und 5  $\mu$ M-Behandlung in der ER $\beta$ -negativen Zelllinie und eine statistisch nicht signifikante Reduktion bei Administration von 1 und 5  $\mu$ M ICI in allen drei PECA-Zelllinien. Die Transkription von  $\alpha3$  war nicht verändert, wohingegen vermindert mRNA von  $\beta1$  in der ER $\beta$ -negativen Zelllinie unter 1 und 5  $\mu$ M Tamoxifen und ICI darstellbar war, diese jedoch nicht zu einer geringeren Oberflächenexpression von  $\beta1$  führte. Die Darstellung der morphologischen Veränderung der Expression der Integrine erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Die Beteiligung von  $\alpha3\beta1$  an der Zell-Zell-Adhäsion und an der Zellprotrusion war darstellbar. Eine verminderte Expression von  $\alpha3$  und  $\beta1$  in den Filopodien war nach Administration von Tamoxifen und ICI sichtbar.  $\alpha6$  und  $\beta4$  waren nur an der Zell-Matrix-Interaktion beteiligt und zeigten eine diffuse, nicht geordnete Expression in den Zelllinien, was für ein Fehlen hemidesmosomaler Strukturen spricht. Eine minimale Änderung dieser „Unordnung“ war bei Administration von ICI 5  $\mu$ M in UM-

SCC-14C, durch vereinzelt auftretende Streifen an der basalen Fläche der Zellen, sichtbar. Die Modulation der adhäsiven Fähigkeit der Zellen an Laminin-1 erfolgte durch Aktivierung nicht klassischer Signalwege über ER-unabhängige Rezeptoren wie z.B. GPR30, die eine agonistische Wirkung von E2 und ICI erlauben. Durch Verwendung von Zelllinien mit variablem Östrogenrezeptorstatus konnte ein möglicher Einfluss desselben auf das Ansprechen einer antiproliferativen Therapie durch Tamoxifen und ICI dargestellt werden. Die Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion an Matrixproteine und die Modulation der hiermit assoziierten Integrine wird vermutlich durch östrogenrezeptorunabhängige Signalwege induziert.

Die Aufklärung der Wirkmechanismen von Estradiol, Tamoxifen und ICI sollte Gegenstand weiterer grundlegender Untersuchungen *in vitro* sein. Ebenso sollte die Kombination mit zytostatisch wirksamen Substanzen und deren Verbesserung der Wirkweise bei multiresistenten Tumoren bzw. Zelllinien intensiv erforscht werden. Um den therapeutischen Nutzen der in dieser Arbeit gefundenen In-vitro-Wirksamkeit bei gleichzeitig bekannten geringen Nebenwirkungen beurteilen zu können, sollten Tamoxifen und ICI als adjuvante Therapeutika in Phase-I-Studien klinische Anwendung finden.

## 6. Summary

Alterations in expression or function of adhesion molecules could be the prerequisite for the invasive and metastasizing behavior of carcinomas. In this study the change of cell adhesion molecules and associated functional changes of three oral squamous cell carcinoma cell lines were investigated. Adhesion molecules of hormone sensitive carcinomas are regulated by steroid hormones, especially estradiol, and seem to be influenced by selective estrogen receptor modulators (Tamoxifen, ICI182,780). In recent years the influence of hormones on not primary sensitive organs and tissue has revealed a therapeutic advantage in the therapy of gliomas and small cell lung carcinomas.

To date the influence of hormones and estrogen receptor modulators on cells of oral squamous cell carcinomas (OSCC) has been insufficiently investigated; first results show an affect of high-dose treatment with Tamoxifen (1-5  $\mu\text{M}$ ) on the proliferation of OSCC *in vitro*. In this study the regulation of growth and adhesion molecules of OSCC was evaluated using three OSCC cell lines with a differing estrogen receptor status. Proliferation assays revealed a synergistic growth inhibiting function for Tamoxifen and ICI 182,780, independent of the estrogen receptor status, on all oral squamous carcinoma cells. This inhibition is associated with an increase in cell-cell-adhesion without a change in expression and function of the tumor suppressor E-Cadherin. The expression of E-Cadherin and the associated protein  $\beta$ -Catenin were evaluated using immunofluorescence and FACS analysis as well as Western- and Northern-Blot for the amount of protein or its translational changes. E-Cadherin and  $\beta$ -Catenin were expressed in a decreased and patchy manner throughout the cell membrane and  $\beta$ -Catenin staining was found in the nucleus and cytoplasm. Even though  $\beta$ -Catenin was found in the membrane immunoprecipitates showed a missing association with E-Cadherin prior and after substance administration, this complex formation is essential for the function of E-Cadherin for cell adhesion. As cell-cell adhesion is enhanced under the influence of Tamoxifen and ICI182,780 mechanisms other than the classical homophilic E-Cadherin binding must have been activated.

It is well known that the binding of the cells to proteins of the extracellular matrix is decisive for the proliferative and invasive behavior of epithelial cancer cells. The ability to bind to Laminin-1 increases with the transformation of the epithelial cells and is associated with a higher expression of the cell-extracellular matrix binding proteins  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 4$ . Adhesion assays performed within this study

confirmed this observation and also revealed a decrease of this adhesion capacity after administration of Tamoxifen and ICI182,780 in all used cell lines. Estradiol was only effective in the ER $\beta$ -positive cell line. This altered adhesion behavior is often associated with a change in expression of  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 6,  $\beta$ 1 and/or  $\beta$ 4 Integrin. Quantifying methods like flowcytometric analysis, Northern-Blot and RT-PCR showed no adequate to the adhesion decrease correlating change of expression. The Integrin  $\alpha$ 3 showed a significant reduction in cell surface expression with 1 and 5  $\mu$ M Tamoxifen in the ER $\beta$ -negative cell line and a minor but not significant reduction after treatment with 1 und 5  $\mu$ M ICI182,780 in all cell lines, without a change of the transcription rate of the protein. The transcription but not cell surface expression of  $\beta$ 1 was altered with Tamoxifen and ICI182,780 in the ER $\beta$ -negative cell line. Using immunofluorescence, morphological characteristics like the expression of  $\alpha$ 3 and  $\beta$ 1-Integrin in filopodia and its participation in cell-cell adhesion were demonstrated. The Integrin  $\alpha$ 6 and  $\beta$ 4 was only engaged in binding to proteins of the extracellular matrix and showed no regular expression in hemi-desmosomes; this irregularity was diminished after ICI182,780 administration in the ER $\alpha/\beta$ -positive cell line. The distribution of  $\alpha$ 3 and  $\beta$ 1 in the filopodia was decreased after treatment with Tamoxifen and ICI182,780. The modulation of the adhesive properties of the OSCC to Laminin-1 is activated by non-classical signaling pathways using ER independent receptors, i.e. GPR30, allowing agonistic effects of Estradiol and ICI182,780. Further elucidation of the basic mechanisms of action of Estradiol, Tamoxifen and ICI182,780 on cells of the oral mucosa and the squamous cell carcinoma should be the matter of future *in vitro* investigations, as well as the efficiency of the drugs in combination with cytostatic agents in multi resistant tumors. To show a possible adjuvant therapeutic benefit of Tamoxifen and ICI182,780, in the treatment of OSCC patients, as demonstrated in the *in vitro* experiments of this study, clinical Phase-I studies should be performed.

## 7. Literaturverzeichnis

Acconcia, F., B. Manavathi, et al. (2006). "An inherent role of integrin-linked kinase-estrogen receptor alpha interaction in cell migration." Cancer Res **66**(22): 11030-8.

Adachi, M., T. Taki, et al. (1998). "Novel staging protocol for non-small-cell lung cancers according to MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 gene expression." J Clin Oncol **16**(4): 1397-406.

Akiyama, S. K. (1996). "Integrins in cell adhesion and signaling." Hum Cell **9**(3): 181-6.

Akiyama, S. K., K. Olden, et al. (1995). "Fibronectin and integrins in invasion and metastasis." Cancer Metastasis Rev **14**(3): 173-89.

Andre, F. and L. Pusztai (2006). "Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy." Nat Clin Pract Oncol **3**(11): 621-32.

Andriani, F., J. Garfield, et al. (2004). "Basement membrane proteins promote progression of intraepithelial neoplasia in 3-dimensional models of human stratified epithelium." Int J Cancer **108**(3): 348-57.

Atallah, E. and L. Flaherty (2005). "Treatment of metastatic malignant melanoma." Curr Treat Options Oncol **6**(3): 185-93.

Auerkari, E. I. (2006). "Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-Cadherin in carcinogenesis." Oral Oncol **42**(1): 5-13.

Aumailley, M., L. Bruckner-Tuderman, et al. (2005). "A simplified laminin nomenclature." Matrix Biol **24**(5): 326-32.

Bagutti, C., P. M. Speight, et al. (1998). "Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity." J Pathol **186**(1): 8-16.

Baker, S. E., S. B. Hopkinson, et al. (1996). "Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly." J Cell Sci **109** (Pt 10): 2509-20.

Barker, N., H. Clevers H. (2000). "Catenins, Wnt signaling and cancer". Bioessays **22**(11):961-5.

Becker, N. (1999). "Zeitlicher Trend der Fallzahlen und standardisierte Mortalitätsraten (ICD 140-149)." [http://www.dkfz-heidelberg.de/epi/Home\\_d/Programm/AG/Praevent/Krebshom/main/deutsch/frame5.htm](http://www.dkfz-heidelberg.de/epi/Home_d/Programm/AG/Praevent/Krebshom/main/deutsch/frame5.htm).

Behrens, J. (1994). "Cell contacts, differentiation, and invasiveness of epithelial cells." Invasion Metastasis **14**(1-6): 61-70.



- Behrens, J. (1999). " Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression." Cancer Metastasis Rev **18**(1): 15-30.
- Behrens, J. (2000). "Control of beta-Catenin signaling in tumor development." Ann N Y Acad Sci **910**: 21-33; discussion 33-5.
- Berger, F., U. Borchard, et al. (1997). "Effects of 17beta-estradiol on action potentials and ionic currents in male rat ventricular myocytes." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **356**(6): 788-96.
- Bier, J. (1991). Tumoren im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich. Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie II, Praxis der Zahnheilkunde 10/II. H. Horch. München, Urban & Schwarzenberg. **2**: 267-359.
- Bjornstrom L., M. Sjoberg (2005). "Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes." Mol Endocrinol **19**(4): 833-42.
- Bonaccorsi, L., V. Carloni, et al. (2000). "Androgen receptor expression in prostate carcinoma cells suppresses alpha6beta4 integrin-mediated invasive phenotype." Endocrinology **141**(9): 3172-82.
- Boterberg, T., M. E. Bracke, et al. (2001). Cell Aggregation Assays. Totawa, New Jersey, Humana Press S.31-44.
- Bracke, M. E., C. Charlier, et al. (1994). "Tamoxifen restores the E-Cadherin function in human breast cancer MCF-7/6 cells and suppresses their invasive phenotype." Cancer Res **54**(17): 4607-9.
- Bracke, M. E., N. A. Van Larebeke, et al. (1991). "Retinoic acid modulates both invasion and plasma membrane ruffling of MCF-7 human mammary carcinoma cells in vitro." Br J Cancer **63**(6): 867-72.
- Bracke, M. E., B. M. Vyncke, et al. (1993). "Insulin-like growth factor I activates the invasion suppressor function of E-Cadherin in MCF-7 human mammary carcinoma cells in vitro." Br J Cancer **68**(2): 282-9.
- Brakebusch, C., K. Wennerberg, et al. (1999). "Beta1 integrin promotes but is not essential for metastasis of ras-myc transformed fibroblasts." Oncogene **18**(26): 3852-61.
- Brembeck, F. H., M. Rosario, et al. (2006). "Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-Catenin." Curr Opin Genet Dev **16**(1): 51-9.
- Brockbank, E. C., J. Bridges, et al. (2005). "Integrin beta1 is required for the invasive behaviour but not proliferation of squamous cell carcinoma cells in vivo." Br J Cancer **92**(1): 102-12.
- Brooks, S. C. and D. F. Skafar (2004). "From ligand structure to biological activity: modified estratrienes and their estrogenic and antiestrogenic effects in MCF-7 cells." Steroids **69**(6): 401-18.

Bundesministerium für Gesundheit (1993). Internationale Klassifikation der Krankheiten, Verletzungen und Todesursachen (ICD), Köln, Kohlhammer.

Cavallaro, U. and G. Christofori (2004). "Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer." Nat Rev Cancer **4**(2): 118-32.

Chang, J. and C. K. Osborne (2002). SERMs and Breast Cancer Prevention. Totowa, New Jersey, Humana Press.

Charlier, C., E. Bruyneel, et al. (1996). "Enhancement of tamoxifen-induced E-Cadherin function by Ca<sup>2+</sup> channel antagonists in human breast cancer MCF7/6 cells." Eur J Pharmacol **317**(2-3): 413-6.

Chattopadhyay, N., Z. Wang, et al. (2003). "alpha3beta1 integrin-CD151, a component of the cadherin-Catenin complex, regulates PTPmu expression and cell-cell adhesion." J Cell Biol **163**(6): 1351-62.

Chen, Q., G. Lipkina, et al. (2004). "Promoter methylation regulates cadherin switching in squamous cell carcinoma." Biochem Biophys Res Commun **315**(4): 850-6.

Chitapanarux, I., V. Lorvidhaya, et al. (2006). "Oral cavity cancers at a young age: analysis of patient, tumor and treatment characteristics in Chiang Mai University Hospital." Oral Oncol **42**(1): 83-8.

Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky, et al. (2002). "The cadherin-Catenin adhesion system in signaling and cancer." J Clin Invest **109**(8): 987-91.

Coons, A. H., H. J. Creech, et al. (1942). "The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody." J Immunol **45**: 159-170.

Dahlman-Wright, K., V. Cavailles, et al. (2006). "International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors." Pharmacol Rev **58**(4): 773-81.

Davis, M. A., R. C. Ireton, et al. (2003). "A core function for p120-Catenin in cadherin turnover." J Cell Biol **163**(3): 525-34.

de Aguiar, F. C. J., L. P. Kowalski, et al. (2006). "Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence." Oral Oncol.

Dhandapani, K. M., F. M. Wade, et al. (2005). "Astrocyte-derived transforming growth factor- $\beta$  mediates the neuroprotective effects of 17 $\beta$ -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways." Endocrinology **146**(6): 2749-59.

Diniz-Freitas, M., T. Garcia-Caballero, et al. (2006). "Reduced E-Cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma." Oral Oncol **42**(2): 190-200.

- Dogic, D., P. Rousselle, et al. (1998). "Cell adhesion to laminin 1 or 5 induces isoform-specific clustering of integrins and other focal adhesion components." J Cell Sci **111 (Pt 6)**: 793-802.
- Dowling, J., Q. C. Yu, et al. (1996). "Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival." J Cell Biol **134(2)**: 559-72.
- El Khissiin, A., A. Cleeren, et al. (1997). "Protein synthesis is not implicated in the ligand-dependent activation of the estrogen receptor in MCF-7 cells." J Steroid Biochem Mol Biol **62(4)**: 269-76.
- Eriksen, J. G., T. Steiniche, et al. (2004). "Expression of integrins and E-Cadherin in squamous cell carcinomas of the head and neck." Apmis **112(9)**: 560-8.
- Evans, R. D., J. Jones, et al. (2004). "Sequence variation in the I-like domain of the beta1 integrin subunit in human oral squamous cell carcinomas." Cancer Lett **213(2)**: 189-94.
- Fearon, E. R. (2003). "Connecting estrogen receptor function, transcriptional repression, and E-Cadherin expression in breast cancer." Cancer Cell **3(4)**: 307-10.
- Felgentreff, K., G. Ittrich, et al. (1980). "[On the reactivation of atrophic oral mucosa through topical application of 17 beta-estradiol (author's transl)]." Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl **68(2)**: 135-9.
- Filardo, E. J., J. A. Quinn, et al. (2002). "Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis." Mol Endocrinol **16(1)**: 70-84.
- Filardo, E. J. and P. Thomas (2005). "GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release." Trends Endocrinol Metab **16(8)**: 362-7.
- Forabosco, A., M. Criscuolo, et al. (1992). "Efficacy of hormone replacement therapy in postmenopausal women with oral discomfort." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **73(5)**: 570-4.
- Friedrichs, K., P. Ruiz, et al. (1995). "High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival." Cancer Res **55(4)**: 901-6.
- Fröhlich, M. (1991). "Epidemiologie der Lippen- und Mundschleimhautkarzinome." Med aktuell **17**: 180-1.
- Fukushima, Y., T. Ohnishi, et al. (1998). "Integrin alpha3beta1-mediated interaction with laminin-5 stimulates adhesion, migration and invasion of malignant glioma cells." Int J Cancer **76(1)**: 63-72.
- Garzino-Demo, P., M. Carrozzo, et al. (1998). "Altered expression of alpha 6 integrin subunit in oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant lesions." Oral Oncol **34(3)**: 204-10.

Geuijen, C. A. and A. Sonnenberg (2002). "Dynamics of the alpha6beta4 integrin in keratinocytes." Mol Biol Cell **13**(11): 3845-58.

Ghosh, S., J. J. Johnson, et al. (2006). "Functional relevance of urinary-type plasminogen activator receptor-alpha3beta1 integrin association in proteinase regulatory pathways." J Biol Chem **281**(19): 13021-9.

Giannelli, G., S. Astigiano, et al. (2002). "Role of the alpha3beta1 and alpha6beta4 integrins in tumor invasion." Clin Exp Metastasis **19**(3): 217-23.

Giannelli, G., L. Milillo, et al. (2001). "Altered expression of integrins and basement membrane proteins in malignant and pre-malignant lesions of oral mucosa." J Biol Regul Homeost Agents **15**(4): 375-80.

Giguere, V., N. Yang, et al. (1988). "Identification of a new class of steroid hormone receptors." Nature **331**(6151): 91-4.

Gilcrease, M. Z. (2006). "Integrin signaling in epithelial cells." Cancer Lett.

Giloh, H. and J. W. Sedat (1982). "Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate." Science **217**(4566): 1252-5.

Gilroy, J. S., C. G. Morris, et al. (2005). "Impact of young age on prognosis for head and neck cancer: a matched-pair analysis." Head Neck **27**(4): 269-73.

Ginsberg, M. H., A. Partridge, et al. (2005). "Integrin regulation." Curr Opin Cell Biol **17**(5): 509-16.

Givant-Horwitz, V., B. Davidson, et al. (2005). "Laminin-induced signaling in tumor cells." Cancer Lett **223**(1): 1-10.

Graff J. R., J. G. Herman, R. G. Lapidus, et al. (1995). "E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas." Cancer Res **55**(22): 5195-9.

Greene, G. L., P. Gilna, et al. (1986). "Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA." Science **231**(4742): 1150-4.

Grenman, R., E. Virolainen, et al. (1987). "In vitro effects of tamoxifen on UM-SCC head and neck cancer cell lines: correlation with the estrogen and progesterone receptor content." Int J Cancer **39**(1): 77-81.

Gronemeyer, H., J. A. Gustafsson, et al. (2004). "Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily." Nat Rev Drug Discov **3**(11): 950-64.

Guncu, G. N., T. F. Tozum, et al. (2005). "Effects of endogenous sex hormones on the periodontium--review of literature." Aust Dent J **50**(3): 138-45.

- Hajra, K. M. and E. R. Fearon (2002). "Cadherin and catenin alterations in human cancer." Genes Chromosomes Cancer **34**(3): 255-68.
- Han, G., S. L. Lu, et al. (2005). "Distinct mechanisms of TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis." J Clin Invest **115**(7): 1714-23.
- Harrington, W. R., S. Sheng, et al. (2003). "Activities of estrogen receptor alpha- and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression." Mol Cell Endocrinol **206**(1-2): 13-22.
- Hatzfeld, M. (2005). "The p120 family of cell adhesion molecules." Eur J Cell Biol **84**(2-3): 205-14.
- Hecht, J. L. and G. L. Mutter (2006). "Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis." J Clin Oncol **24**(29): 4783-91.
- Herold-Mende, C., J. Kartenbeck, et al. (2001). "Metastatic growth of squamous cell carcinomas is correlated with upregulation and redistribution of hemidesmosomal components." Cell Tissue Res **306**(3): 399-408.
- Hirohashi, S. and Y. Kanai (2003). "Cell adhesion system and human cancer morphogenesis." Cancer Sci **94**(7): 575-81.
- Hoffmann, T. K., H. Bojar, et al. (2002). "Effects of tamoxifen on human squamous cell carcinoma lines of the head and neck." Anticancer Drugs **13**(5): 521-31.
- Hopert, A. C., A. Beyer, et al. (1997). "Estrogen-dependent and cell-specific regulation of gene expression in RUCa-I endometrial adenocarcinoma cells." J Steroid Biochem Mol Biol **62**(5-6): 431-8.
- Horwitz, A. R. and J. T. Parsons (1999). "Cell migration--movin' on." Science **286**(5442): 1102-3.
- Howell, A. (2006). "Pure oestrogen antagonists for the treatment of advanced breast cancer." Endocr Relat Cancer **13**(3): 689-706.
- Hui, A. M., W. Zhang, et al. (2004). "Agents with selective estrogen receptor (ER) modulator activity induce apoptosis *in vitro* and *in vivo* in ER-negative glioma cells." Cancer Res **64**(24): 9115-23.
- Huttenlocher, A., R. R. Sandborg, et al. (1995). "Adhesion in cell migration." Curr Opin Cell Biol **7**(5): 697-706.
- Iwai, S., W. Katagiri, et al. (2005). "Mutations of the APC, beta-Catenin, and axin 1 genes and cytoplasmic accumulation of beta-Catenin in oral squamous cell carcinoma." J Cancer Res Clin Oncol **131**(12): 773-82.
- Jakse, R., T. Auberger, et al. (2003). "Kopf Hals Malignome." (Accessed January 23, 2004, at <http://www.aco.at/manuallkopfals>).

- Janes, S. M. and F. M. Watt (2006). "New roles for integrins in squamous-cell carcinoma." Nat Rev Cancer **6**(3): 175-83.
- Jin, H. and J. Varner (2004). "Integrins: roles in cancer development and as treatment targets." Br J Cancer **90**(3): 561-5.
- Johnson, G. D., R. S. Davidson, et al. (1982). "Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy." J Immunol Methods **55**(2): 231-42.
- Johnson, T. M., D. E. Rowe, et al. (1992). "Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa)." J Am Acad Dermatol **26**(3 Pt 2): 467-84.
- Kanda, N. and S. Watanabe (2004). "17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression." J Invest Dermatol **123**(2): 319-28.
- Kantak, S. S. and R. H. Kramer (1998). "E-Cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells." J Biol Chem **273**(27): 16953-61.
- Katzenellenbogen, B. S. and J. Frasor (2004). "Therapeutic targeting in the estrogen receptor hormonal pathway." Semin Oncol **31**(1 Suppl 3): 28-38.
- Katzenellenbogen, B. S. and J. A. Katzenellenbogen (2002). "Biomedicine. Defining the "S" in SERMs." Science **295**(5564): 2380-1.
- Kawano, K., S. S. Kantak, et al. (2001). "Integrin alpha3beta1 engagement disrupts intercellular adhesion." Exp Cell Res **262**(2): 180-96.
- Kim, M. J., J. H. Lee, et al. (2007). "The role of tamoxifen in combination with cisplatin on oral squamous cell carcinoma cell lines." Cancer Lett **245**(1-2): 284-92.
- Kim, W. H., B. L. Lee, et al. (1999). "Laminin-1-adherent cancer cells show increased proliferation and decreased apoptosis *in vivo*." Anticancer Res **19**(4B): 3067-71.
- Kim, Y. J., C. J. Lee, et al. (2005). "Tamoxifen-induced cell death and expression of neurotrophic factors in cultured C6 glioma cells." J Neurooncol **71**(2): 121-5.
- Kimelman, D. and W. Xu (2006). "beta-Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective." Oncogene **25**(57): 7482-91.
- Kimmel, K. A. and T. E. Carey (1986). "Altered expression in squamous carcinoma cells of an orientation restricted epithelial antigen detected by monoclonal antibody A9." Cancer Res **46**(7): 3614-23.
- Klinghoffer, R. A., C. Sachsenmaier, et al. (1999). "Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction." Embo J **18**(9): 2459-71.  
receptors.

- Koehler, K. F., L. A. Helguero, et al. (2005). "Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta." Endocr Rev **26**(3): 465-78.
- Kohn, E. C. and L. A. Liotta (1995). "Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention." Cancer Res **55**(9): 1856-62.
- Kramer, R. H., X. Shen, et al. (2005). "Tumor cell invasion and survival in head and neck cancer." Cancer Metastasis Rev **24**(1): 35-45.
- Kudo, Y., S. Kitajima, et al. (2004). "Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-Cadherin and/or degradation of membranous beta-Catenin." Clin Cancer Res **10**(16): 5455-63.
- Lage, H. (2003). "Molecular analysis of therapy resistance in gastric cancer." Dig Dis **21**(4): 326-38.
- Larsson, C. (2006). "Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton." Cell Signal **18**(3): 276-84.
- Leimola-Virtanen, R., T. Salo, et al. (2000). "Expression of estrogen receptor (ER) in oral mucosa and salivary glands." Maturitas **36**(2): 131-7.
- Lewis J. S., V. C. Jordan (2005). "Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance." Mutat Res **591**(1-2):247-63.
- Lilien, J. and J. Balsamo (2005). "The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-Catenin." Curr Opin Cell Biol **17**(5): 459-65.
- Liotta, L. A. and E. C. Kohn (2001). "The microenvironment of the tumour-host interface." Nature **411**(6835): 375-9.
- Lipscomb, E. A., A. S. Dugan, et al. (2003). "Use of RNA interference to inhibit integrin (alpha6beta4)-mediated invasion and migration of breast carcinoma cells." Clin Exp Metastasis **20**(6): 569-76.
- Lipscomb, E. A. and A. M. Mercurio (2005). "Mobilization and activation of a signaling competent alpha6beta4integrin underlies its contribution to carcinoma progression." Cancer Metastasis Rev **24**(3): 413-23.
- Litjens, S. H., J. M. de Pereda, et al. (2006). "Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes." Trends Cell Biol **16**(7): 376-83.
- Llewellyn, C. D., N. W. Johnson, et al. (2001). "Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review." Oral Oncol **37**(5): 401-18.
- Losel, R. and M. Wehling (2003). "Nongenomic actions of steroid hormones." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(1): 46-56.

- Luo, B. H. and T. A. Springer (2006). "Integrin structures and conformational signaling." Curr Opin Cell Biol **18**(5): 579-86.
- MacCalman, C. D., P. Brodt, et al. (1994). "The loss of E-Cadherin mRNA transcripts in rat prostatic tumors is accompanied by increased expression of mRNA transcripts encoding fibronectin and its receptor." Clin Exp Metastasis **12**(2): 101-7.
- MacCalman, C. D., R. Farookhi, et al. (1994). "Estradiol regulates E-Cadherin mRNA levels in the surface epithelium of the mouse ovary." Clin Exp Metastasis **12**(4): 276-82.
- Maeda, M., E. Johnson, et al. (2006). "Expression of inappropriate cadherins by epithelial tumor cells promotes endocytosis and degradation of E-Cadherin via competition for p120(ctn)." Oncogene **25**(33): 4595-604.
- Mareel, M., G. Berx, et al. (1996). "Cadherin/catenin complex: a target for antiinvasive therapy?" J Cell Biochem **61**(4): 524-30.
- Mariotti, A. J. (2005). "Estrogen and extracellular matrix influence human gingival fibroblast proliferation and protein production." J Periodontol **76**(8): 1391-7.
- Maschler S., G. Wirl, H. Spring, et al. (2005). "Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization." Oncogene **24**(12): 2032-41.
- Matsumoto, K., B. L. Ziober, et al. (1995). "Growth factor regulation of integrin-mediated cell motility." Cancer Metastasis Rev **14**(3): 205-17.
- Matthews, J. and J. A. Gustafsson (2003). "Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta." Mol Interv **3**(5): 281-92.
- Melchiori, A., R. Mortarini, et al. (1995). "The alpha 3 beta 1 integrin is involved in melanoma cell migration and invasion." Exp Cell Res **219**(1): 233-42.
- Mercurio, A. M., I. Rabinovitz, et al. (2001). "The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 541-5.
- Mizejewski, G. J. (1999). "Role of integrins in cancer: survey of expression patterns." Proc Soc Exp Biol Med **222**(2): 124-38.
- Morini, M., M. Mottolese, et al. (2000). "The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity." Int J Cancer **87**(3): 336-42.
- Mould, A. P. and M. J. Humphries (2004). "Regulation of integrin function through conformational complexity: not simply a knee-jerk reaction?" Curr Opin Cell Biol **16**(5): 544-51.
- Mueller, S. C., G. Gherzi, et al. (1999). "A novel protease-docking function of integrin at invadopodia." J Biol Chem **274**(35): 24947-52.



- Murata, T., K. Narita, et al. (2003). "Changes of receptor mRNAs for oxytocin and estrogen during the estrous cycle in rat uterus." J Vet Med Sci **65**(6): 707-12.
- Naim, R., R. C. Chang, et al. (2006). "Chemopreventive alteration of the cell-cell adhesion in head and neck squamous cell cancer." Oncol Rep **16**(2): 273-7.
- Nelson, K., V. Helmstaedter, et al. (2006). "The influence of tamoxifen on growth behavior and cell-cell adhesion in OSCC *in vitro*." Oral Oncol.
- Nelson, L. R. and S. E. Bulun (2001). "Estrogen production and action." J Am Acad Dermatol **45**(3 Suppl): S116-24.
- Nelson, W. J. and R. Nusse (2004). "Convergence of Wnt, beta-Catenin, and cadherin pathways." Science **303**(5663): 1483-7.
- Neumann, F. and B. Schenck (1990). Endokrinopharmakologie: Pharmakotherapie mit Hormonen. Mannheim, Wien, Zürich, Bibliographisches Institut & Brockhaus AG.
- Nho, R. S., H. Xia, et al. (2005). "Role of integrin-linked kinase in regulating phosphorylation of Akt and fibroblast survival in type I collagen matrices through a beta1 integrin viability signaling pathway." J Biol Chem **280**(28): 26630-9.
- Nishiuchi, R., O. Murayama, et al. (2003). "Characterization of the ligand-binding specificities of integrin alpha3beta1 and alpha6beta1 using a panel of purified laminin isoforms containing distinct alpha chains." J Biochem (Tokyo) **134**(4): 497-504.
- Nishiuchi, R., J. Takagi, et al. (2006). "Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins." Matrix Biol **25**(3): 189-97.
- O'Connor K. L., A. M. Mercurio (2001). "Protein kinase A regulates Rac and is required for the growth factor-stimulated migration of carcinoma cells." J Biol Chem **276**(51): 47895-900.
- Ohmichi, M., K. Tasaka, et al. (2005). "Molecular mechanism of action of selective estrogen receptor modulator in target tissues." Endocr J **52**(2): 161-7.
- Osborne, C. K., A. Wakeling, et al. (2004). "Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action." Br J Cancer **90** Suppl 1: S2-6.
- Osborne, C. K., H. Zhao, et al. (2000). "Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use." J Clin Oncol **18**(17): 3172-86.
- Owens, D. M. and F. M. Watt (2001). "Influence of beta1 integrins on epidermal squamous cell carcinoma formation in a transgenic mouse model: alpha3beta1, but not alpha2beta1, suppresses malignant conversion." Cancer Res **61**(13): 5248-54.
- Paech, K., P. Webb, et al. (1997). "Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites." Science **277**(5331): 1508-10.

- Pakkala, T., I. Virtanen, et al. (2002). "Function of laminins and laminin-binding integrins in gingival epithelial cell adhesion." J Periodontol **73**(7): 709-19.
- Papadimitrakopoulou V., A. A. Adjei (2006). "The Akt/mTOR and mitogen-activated protein kinase pathways in lung cancer therapy." J Thorac Oncol **1**(7): 749-51.
- Park, C. C., M. J. Bissell, et al. (2000). "The influence of the microenvironment on the malignant phenotype." Mol Med Today **6**(8): 324-9.
- Patarroyo, M., K. Tryggvason, et al. (2002). "Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis." Semin Cancer Biol **12**(3): 197-207.
- Perey, L., R. Paridaens, et al. (2006). "Clinical benefit of fulvestrant in postmenopausal women with advanced breast cancer and primary or acquired resistance to aromatase inhibitors: final results of phase II Swiss Group for Clinical Cancer Research Trial (SAKK 21/00)." Ann Oncol.
- Playford, M. P. and M. D. Schaller (2004). "The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology." Oncogene **23**(48): 7928-46.
- Plopper, G. E., S. Z. Domanico, et al. (1998). "Migration of breast epithelial cells on Laminin-5: differential role of integrins in normal and transformed cell types." Breast Cancer Res Treat **51**(1): 57-69.
- Prange-Kiel, J. and G. M. Rune (2006). "Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus." Neuroscience **138**(3): 765-72.
- Prime, S. S., M. Davies, et al. (2004). "The role of TGF-beta in epithelial malignancy and its relevance to the pathogenesis of oral cancer (part II)." Crit Rev Oral Biol Med **15**(6): 337-47.
- Purves-Tyson, T. D. and J. R. Keast (2004). "Rapid actions of estradiol on cyclic amp response-element binding protein phosphorylation in dorsal root ganglion neurons." Neuroscience **129**(3): 629-37.
- Rabinovitz, I. and A. M. Mercurio (1997). "The integrin alpha6beta4 functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures." J Cell Biol **139**(7): 1873-84.
- Rabinovitz, I., I. K. Gipson, A. M. Mercurio (2001). "Traction forces mediated by alpha6beta4 integrin: implications for basement membrane organization and tumor invasion." Mol Biol Cell **12**(12): 4030-43.
- Reynolds, M. A., G. W. Aberdeen, et al. (2004). "Estrogen suppression induces papillary gingival overgrowth in pregnant baboons." J Periodontol **75**(5): 693-701.
- Robert Koch-Institut (1999). "Geschätzte Zahl jährlich neu an Krebs Erkrankter, Deutschland 1997." <http://www.rki.de/GBE/KREBS/KREBS.HTM>.

- Robertson, J. F., V. Semiglazov, et al. (2006). "Effects of fulvestrant 250mg in premenopausal women with oestrogen receptor-positive primary breast cancer." Eur J Cancer.
- Russell, A. J., E. F. Fincher, et al. (2003). "Alpha 6 beta 4 integrin regulates keratinocyte chemotaxis through differential GTPase activation and antagonism of alpha 3 beta 1 integrin." J Cell Sci **116**(Pt 17): 3543-56.
- Russo, J., M. Hasan Lareef, et al. (2003). "Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells." J Steroid Biochem Mol Biol **87**(1): 1-25.
- Ryan, M. C., A. M. Christiano, et al. (1996). "The functions of laminins: lessons from in vivo studies." Matrix Biol **15**(6): 369-81.
- Saintier, D., M. A. Burde, et al. (2004). "17beta-estradiol downregulates beta3-integrin expression in differentiating and mature human osteoclasts." J Cell Physiol **198**(2): 269-76.
- Sakai, T., S. Li, et al. (2003). "Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation." Genes Dev **17**(7): 926-40.
- Santala, P., H. Larjava, et al. (1994). "Suppressed collagen gene expression and induction of alpha 2 beta 1 integrin-type collagen receptor in tumorigenic derivatives of human osteogenic sarcoma (HOS) cell line." J Biol Chem **269**(2): 1276-83.
- Santoro M. M., G. Gaudino, P. C. Marchisio (2003). "The MSP receptor regulates alpha6beta4 and alpha3beta1 integrins via 14-3-3 proteins in keratinocyte migration." Dev Cell **5**(2): 257-71.
- Scully, C., J. V. Bagan, et al. (2005). "Epithelial biology." Oral Dis **11**(2): 58-71.
- Shapira, A., E. Virolainen, et al. (1986). "Growth inhibition of laryngeal UM-SCC cell lines by tamoxifen. Comparison with effects on the MCF-7 breast cancer cell line." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **112**(11): 1151-8.
- Shapiro, L., A. M. Fannon, et al. (1995). "Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins." Nature **374**(6520): 327-37.
- Shimoyama, Y. and S. Hirohashi (1991). "Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas." Cancer Res **51**(8): 2185-92.
- Shiozaki, H., H. Oka, et al. (1996). "E-Cadherin mediated adhesion system in cancer cells." Cancer **77**(8 Suppl): 1605-13.
- Stallmach, A., B. von Lampe, et al. (1992). "Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during the benign to malign tumour transformation." Gut **33**(3): 342-6.

- Sturgis, E. M., B. A. Moore, et al. (2005). "Neoadjuvant chemotherapy for squamous cell carcinoma of the oral tongue in young adults: a case series." Head Neck **27**(9): 748-56.
- Syrigos, K. N. and A. J. Karayiannakis (2006). "Adhesion molecules as targets for the treatment of neoplastic diseases." Curr Pharm Des **12**(22): 2849-61.
- Takeichi, M. (1991). "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator." Science **251**(5000): 1451-5.
- Tamura, I., T. Sakaki, et al. (2003). "Correlation of P-cadherin and beta-Catenin expression and phosphorylation with carcinogenesis in rat tongue cancer induced with 4-nitroquinoline 1-oxide." Oral Oncol **39**(5): 506-14.
- Tang, P., G. Roldan, et al. (2006). "A phase II study of carboplatin and chronic high-dose tamoxifen in patients with recurrent malignant glioma." J Neurooncol **78**(3): 311-6.
- Tavassoli, M., J. Soltaninia, et al. (2002). "Tamoxifen inhibits the growth of head and neck cancer cells and sensitizes these cells to cisplatin induced-apoptosis: role of TGF-beta1." Carcinogenesis **23**(10): 1569-75.
- Teicher, B. A. (2001). "Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta." Cancer Metastasis Rev **20**(1-2): 133-43.
- Tonetti, D. A. and V. C. Jordan (1997). "The role of estrogen receptor mutations in tamoxifen-stimulated breast cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **62**(2-3): 119-28.
- Trent, J. M., R. Wiltshire, et al. (1995). "The gene for the APC-binding protein beta-Catenin (CTNNB1) maps to chromosome 3p22, a region frequently altered in human malignancies." Cytogenet Cell Genet **71**(4): 343-4.
- Ueda, G., H. Sunakawa, et al. (2006). "Aberrant expression of beta- and gamma-Catenin is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma." Int J Oral Maxillofac Surg **35**(4): 356-61.
- Urano, R., K. Sakabe, et al. (1995). "Female sex hormone stimulates cultured human keratinocyte proliferation and its RNA- and protein-synthetic activities." J Dermatol Sci **9**(3): 176-84.
- Valimaa, H., S. Savolainen, et al. (2004). "Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands." J Endocrinol **180**(1): 55-62.
- Vermeulen, S., V. Van Marck, et al. (1996). "Regulation of the invasion suppressor function of the cadherin/catenin complex." Pathol Res Pract **192**(7): 694-707.
- Vermeulen, S. J., E. A. Bruyneel, et al. (1995). "Activation of the E-Cadherin/catenin complex in human MCF-7 breast cancer cells by all-trans-retinoic acid." Br J Cancer **72**(6): 1447-53.

- Vermeulen, S. J., F. Nollet, et al. (1997). "Mutation of alpha-Catenin results in invasiveness of human HCT-8 colon cancer cells." Ann N Y Acad Sci **833**: 186-9.
- Verschuur, H. P., J. C. Irish, et al. (1999). "A matched control study of treatment outcome in young patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." Laryngoscope **109**(2 Pt 1): 249-58.
- Vidal, F., D. Aberdam, et al. (1995). "Integrin beta 4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia." Nat Genet **10**(2): 229-34.
- Wakeling, A. E. and J. Bowler (1992). "ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential." J Steroid Biochem Mol Biol **43**(1-3): 173-7.
- Wakeling, A. E., M. Dukes, et al. (1991). "A potent specific pure antiestrogen with clinical potential." Cancer Res **51**(15): 3867-73.
- Wang, M. M., R. J. Traystman, et al. (2004). "Non-classical regulation of estrogen receptor-alpha by ICI182,780." J Steroid Biochem Mol Biol **92**(1-2): 51-62.
- Warner, M. and J. A. Gustafsson (2006). "Nongenomic effects of estrogen: why all the uncertainty?" Steroids **71**(2): 91-5.
- Webb, P., G. N. Lopez, et al. (1995). "Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens." Mol Endocrinol **9**(4): 443-56.
- Wehling, M., A. Schultz, et al. (2006). "Nongenomic actions of estrogens: exciting opportunities for pharmacology." Maturitas **54**(4): 321-6.
- Wheelock, M. J. and K. R. Johnson (2003). "Cadherins as modulators of cellular phenotype." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 207-35.
- Wijnhoven, B. P., W. N. Dinjens, et al. (2000). "E-Cadherin-Catenin cell-cell adhesion complex and human cancer." Br J Surg **87**(8): 992-1005.
- Wong, D. T., R. Todd, et al. (1996). "Molecular biology of human oral cancer." Crit Rev Oral Biol Med **7**(4): 319-28.
- Woodhouse, E. C., R. F. Chuaqui, et al. (1997). "General mechanisms of metastasis." Cancer **80**(8 Suppl): 1529-37.
- World Health Organization (1990). International classification of diseases for oncology. v. H. V. Percy C, Muir C. Geneva. **2nd edition**.
- Wu, W. S. (2006). "The signaling mechanism of ROS in tumor progression." Cancer Metastasis Rev.
- Yanagisawa, M. and P. Z. Anastasiadis (2006). "p120 catenin is essential for mesenchymal cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness." J Cell Biol **174**(7): 1087-96.

Yang, C. H., A. L. Cheng, et al. (1999). "High dose tamoxifen plus cisplatin and etoposide in the treatment of patients with advanced, inoperable nonsmall cell lung carcinoma." Cancer **86**(3): 415-20.

Zhang, F., C. C. Tom, et al. (2003). "Distinct ligand binding sites in integrin alpha3beta1 regulate matrix adhesion and cell-cell contact." J Cell Biol **163**(1): 177-88.

Zhang, G., X. Zhou, et al. (2005). "Accumulation of cytoplasmic beta-Catenin correlates with reduced expression of E-Cadherin, but not with phosphorylated Akt in esophageal squamous cell carcinoma: immunohistochemical study." Pathol Int **55**(6): 310-7.

Zhang, K., J. P. Kim, et al. (1996). "Restricted expression and function of laminin 1-binding integrins in normal and malignant oral mucosal keratinocytes." Cell Adhes Commun **4**(3): 159-74.

Zhang, W., A. Alt-Holland, et al. (2006). "E-Cadherin loss promotes the initiation of squamous cell carcinoma invasion through modulation of integrin-mediated adhesion." J Cell Sci **119**(Pt 2): 283-91.

Zhu, A. J., I. Haase, et al. (1999). "Signaling via beta1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate *in vitro*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6728-33.

Zutter, M. M. and S. A. Santoro (1990). "Widespread histologic distribution of the alpha 2 beta 1 integrin cell-surface collagen receptor." Am J Pathol **137**(1): 113-20.

## Danksagung

Herrn Univ. Prof. Dr. mult. h.c. J. Bier (Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Klinik für Navigation und Robotik, Charité) danke ich für die Unterstützung und Förderung.

Frau Prof. Dr. A. Langford (Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Klinik für Navigation und Robotik, Charité) danke ich für die Inspiration zur wissenschaftlichen Arbeit. Ihre Ideen haben die Grundlage für meine wissenschaftliche Neugier gebildet.

Herrn Prof. Dr. H. Lage (Institut für Pathologie, Charité) möchte ich für die erfolgreiche wissenschaftliche Zusammenarbeit und Unterstützung danken.

Herrn Prof. T. E. Carey (Michigan University) danke ich für die Überlassung der Zelllinien und die fruchtbare Diskussion.

Herrn Prof. Dr. Dr. B. Hell (Direktor der Abteilung für MKG-Chirurgie, Jung-Stilling Krankenhaus, Siegen) möchte ich für die gewährte Möglichkeit danken, eine fundierte chirurgische Ausbildung erlebt haben zu können.

Frau U. Kruse-Boitschenko (MTA, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Klinik für Navigation und Robotik, Charité) gilt mein besonderer Dank für ihre unermüdliche Unterstützung und Hilfe zu jeder Zeit und ebenso für ihr außergewöhnliches Organisationstalent, das erheblich zum Gelingen der Versuche beigetragen hat. Ebenfalls möchte ich den Doktoranden danken, die mit ihrer tatkräftigen Unterstützung die geschilderten Ergebnisse möglich gemacht haben (Herrn Dr. V. Helmstädter, Frau cand. med. C. Moreau), und deren Germanistik-Kenntnisse (Frau cand. med. dent. W. Semper) ich zu schätzen weiß.

Für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre statistischen Fähigkeiten, danke ich Fr. Dipl. Math. G. Siebert, die ein trockenes Thema spannend gemacht hat.

Mein herzlicher und aufrichtiger Dank gilt meiner Kollegin Frau Dr. S. Heberer und Frau N. Kaczmarek für ihre Unterstützung, die wesentlich zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen hat.

J. und M. Mehrhof gehört mein innigster Dank für die Freundschaft und das Verständnis auch in schwierigen Zeiten.

Last but not least, I would like to thank my sister and uncle for their support and understanding throughout my life.

## ERKLÄRUNG

### § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
27.08.2007

.....  
Dr. Katja Nelson