

3 ERGEBNISSE

In dieser Arbeit sollte der Einfluss des Östrogens 17- β -Estradiol, des selektiven Östrogenrezeptormodulatorens Tamoxifen und des Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182,780 (Faslodex) auf die Transkription der Integrinuntereinheiten α_6 , β_1 und β_4 in oralen Plattenepithelkarzinomen untersucht werden. Als *in vitro*-Modell eines progressiven Tumorleidens kamen die Zelllinien UM-SCC 14A, 14B und 14C zum Einsatz, welche unterschiedlichen Stadien eines rezidivierenden Mundbodenkarzinoms entsprechen.

3.1 Die Östrogenrezeptoren α und β in den Zelllinien UM-SCC 14A, 14B und 14C

Hauptangriffspunkte von 17- β -Estradiol, Tamoxifen und ICI 182,780 (Faslodex) sind die nukleär lokalisierten Östrogenrezeptoren α und β . Deren zelluläre Expression kann mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden. Dazu wurde aus den unbehandelten Tumorzellen Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Nach Reaktionsoptimierung und unter Einsatz von zuvor konstruierten Oligonukleotidprimern konnten anschließend spezifische Östrogenrezeptor-DNA-Abschnitte amplifiziert werden.

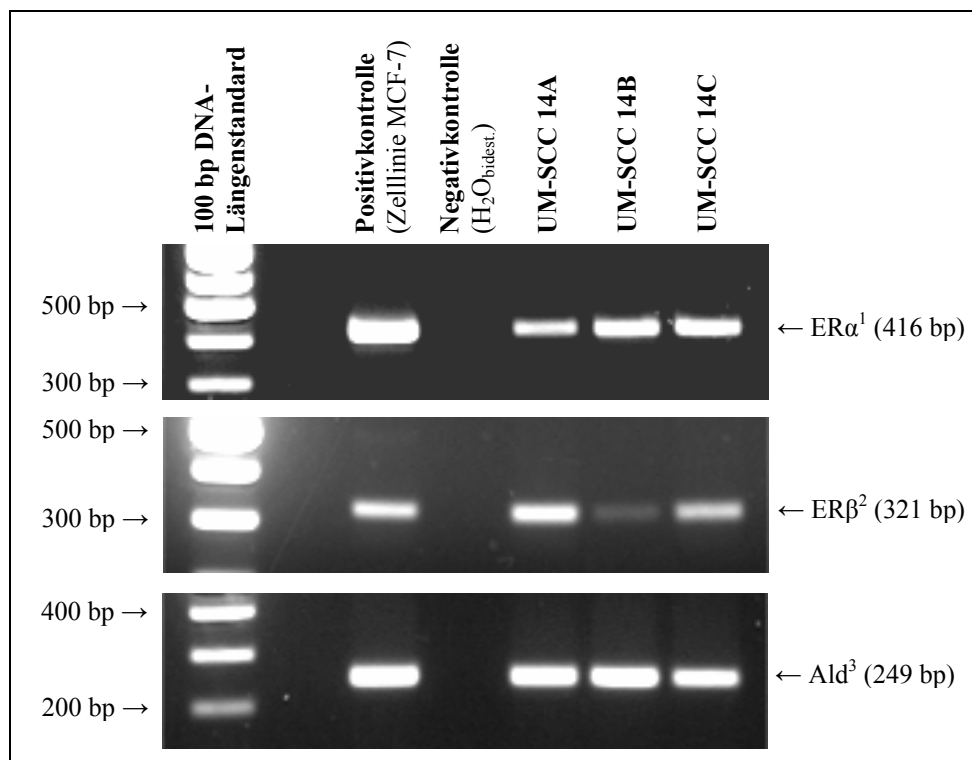


Abbildung 3.1: Nachweis der Östrogenrezeptoren α und β in den unbehandelten Zelllinien UM-SCC 14A, 14B und 14C mittels PCR

¹ Östrogenrezeptor α , ² Östrogenrezeptor β , ³ house keeping-Gen Aldolase als endogene Kontrolle der Reaktionsbedingungen und der aufgetragenen cDNA-Mengen

In Abbildung 3.1 sind die in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel aufgetragenen PCR-Produkte unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht. Es zeigen sich deutliche Banden in allen untersuchten Zelllinien, weshalb ein positiver Status der Östrogenrezeptoren α und β in den Zelllinien UM-SCC 14A, 14B und 14C auf RNA-Ebene nachgewiesen ist. Als Positivkontrolle wurde die für ihren positiven Östrogenrezeptorstatus anerkannte Mammakarzinomzelllinie MCF-7 verwendet.

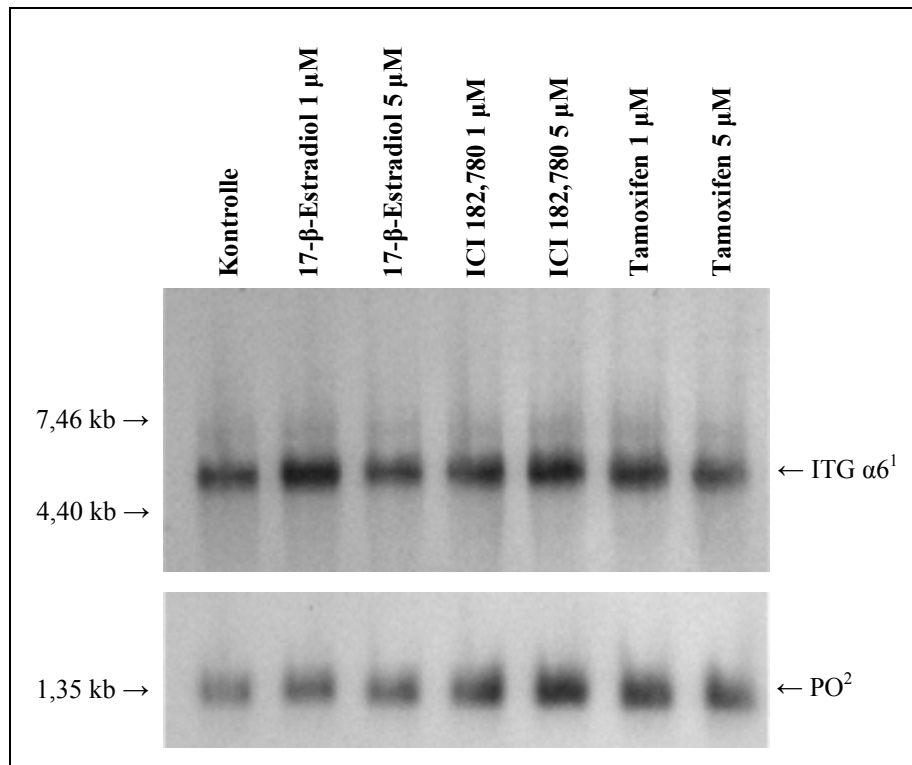
3.2 mRNA-Expressionsanalyse der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$

Zur Darstellung regulatorischer Effekte von 17- β -Estradiol, Tamoxifen und ICI 182,780 (Faslodex) auf die Genexpression der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ wurden die Northern Blot-Analyse und die *LightCycler*-Technologie der Firma Roche gewählt. Letztere ermöglicht als quantitative *real time* PCR einen relativen Expressionsvergleich eines Gens zwischen verschiedenen Proben. Die Northern Blot-Analyse stellt spezifische mRNA in Bandenform dar und ermöglicht qualitative und semiquantitative Expressionsaussagen aufgrund der autoradiographischen Signalintensitäten. RNA-Beladungsunterschiede wurden durch zusätzliche Hybridisierung der Membranen mit dem sauren ribosomalen Phosphoprotein PO, welches einer Hormonregulation nicht unterliegt (Laborda, 1991), ausgeschlossen. Für jede Integrinuntereinheit wurden jeweils zwei Analysen durchgeführt, wobei unabhängig voneinander kultivierte Zellen zum Einsatz kamen.

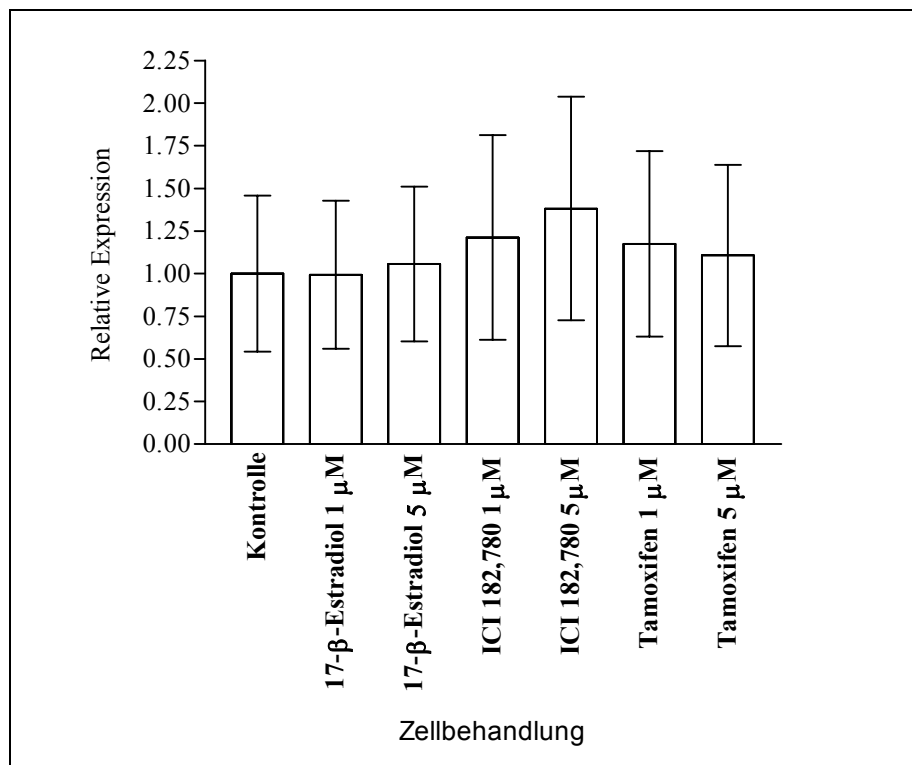
3.2.1 Die Integrinexpression in der Zelllinie UM-SCC 14A

In den Abbildungen 3.2 bis 3.4 sind die mRNA-Expressionsanalysen der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ in der Zelllinie UM-SCC 14A unter dem Einfluss von 17- β -Estradiol, Tamoxifen und ICI 182,780 (Faslodex) dargestellt.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigen sich gleiche Bandenstärken sowohl bei der spezifisch detektierten $\alpha 6$ - und $\beta 1$ -mRNA, als auch bei den Kontrollhybridisierungen mit dem sauren ribosomalen Phosphoprotein PO (Abb. 3.2a und 3.3a). Das weist nach, dass 17- β -Estradiol, Tamoxifen und ICI 182,780 (Faslodex) weder in der Konzentration von 1 μ M noch in der von 5 μ M Einfluss auf die Transkription der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 1$ in der Zelllinie UM-SCC 14A nehmen.

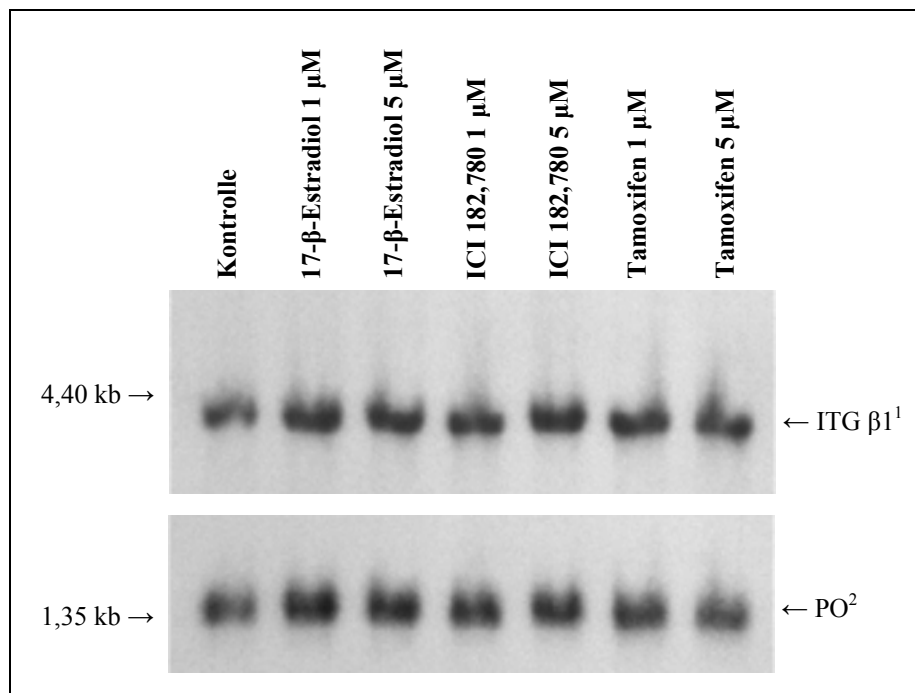


(a)

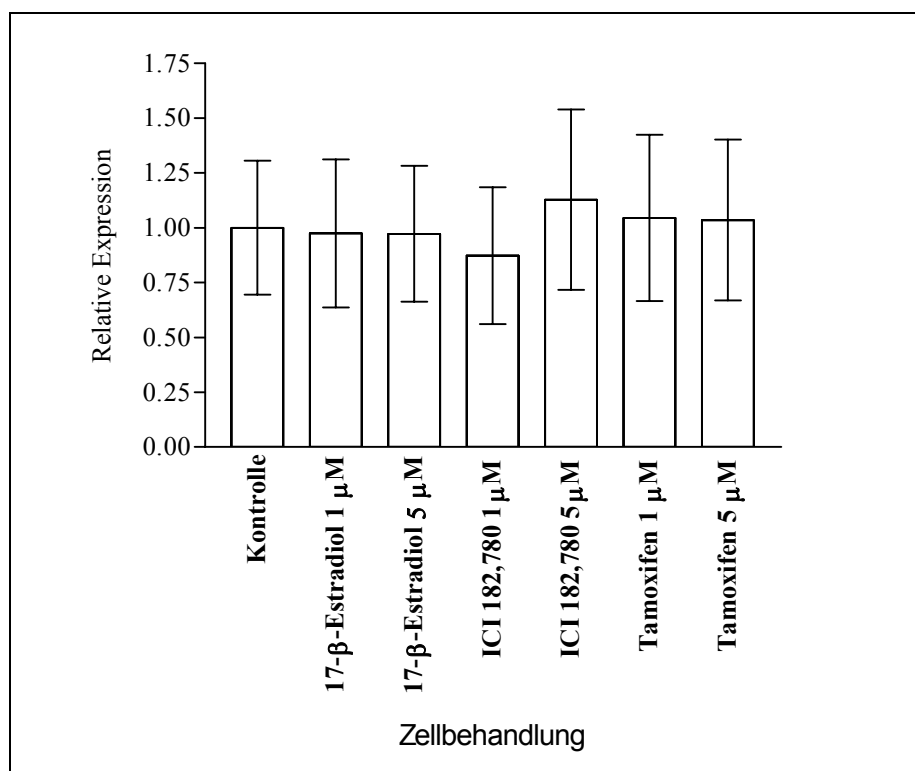


(b)

Abbildung 3.2: Die *Integrinuntereinheit $\alpha 6$* in der Zelllinie *UM-SCC 14A* - Expressionsanalyse mittels Northern Blot (a) und quantitativer *real time PCR* (b) bei Behandlung mit 17- β -Estradiol, ICI 182,780 (Faslodex) und Tamoxifen; ¹ *Integrinuntereinheit $\alpha 6$* , ² *saures ribosomales Phosphoprotein PO* als endogene Kontrolle; Fehlerbalken in (b) zeigen die Standardabweichung

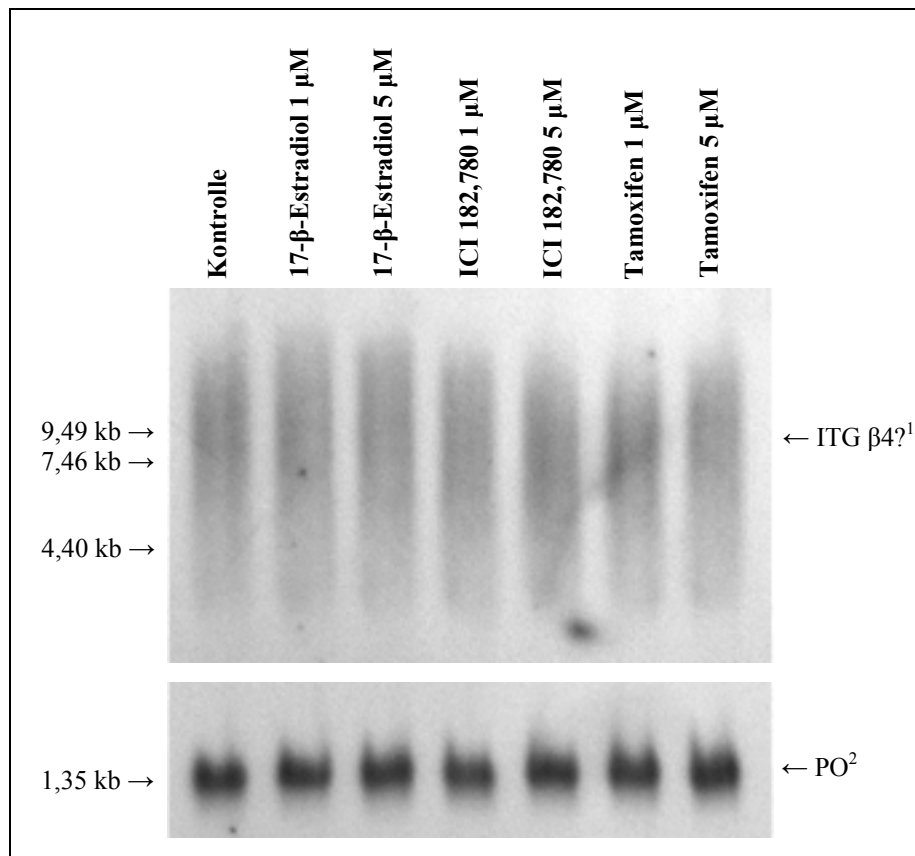


(a)

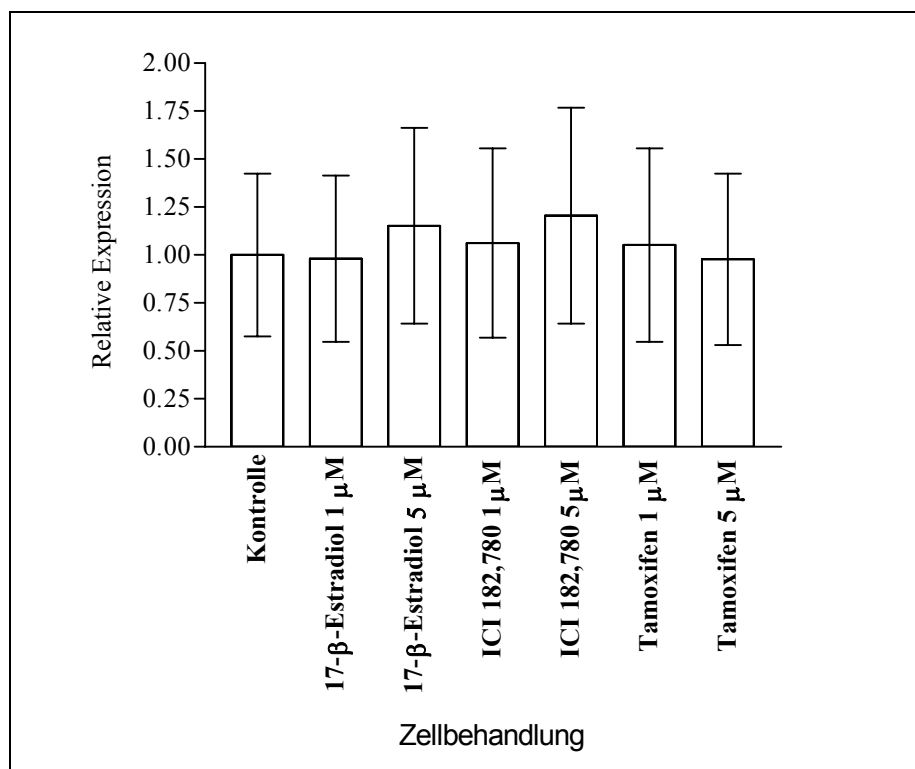


(b)

Abbildung 3.3: Die *Integrinuntereinheit $\beta 1$* in der Zelllinie *UM-SCC 14A* - Expressionsanalyse mittels Northern Blot (a) und quantitativer *real time PCR* (b) bei Behandlung mit 17- β -Estradiol, ICI 182,780 (Faslodex) und Tamoxifen; ¹ Integrinuntereinheit $\beta 1$, ² saures ribosomales Phosphoprotein PO als endogene Kontrolle; Fehlerbalken in (b) zeigen die Standardabweichung



(a)



(b)

Abbildung 3.4: Die *Integrinuntereinheit $\beta 4$* in der Zelllinie *UM-SCC 14A* - Expressionsanalyse mittels Northern Blot (a) und quantitativer *real time PCR* (b) bei Behandlung mit 17- β -Estradiol, ICI 182,780 (Faslodex) und Tamoxifen; ¹ Integrinuntereinheit $\beta 4$, ² saures ribosomales Phosphoprotein *PO* als endogene Kontrolle; Fehlerbalken in (b) zeigen die Standardabweichung

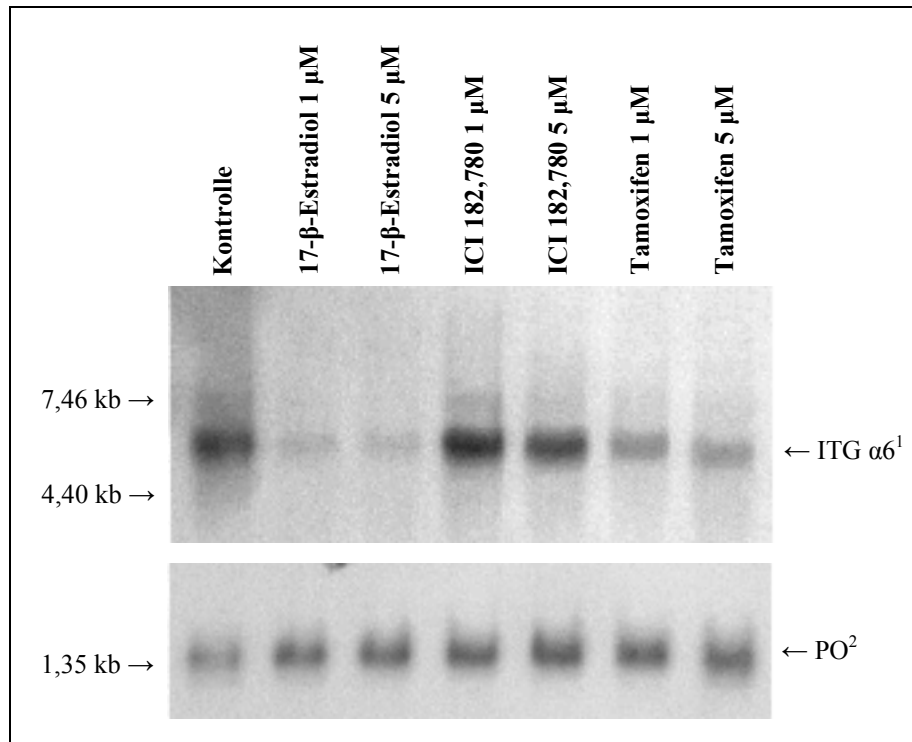
Die Northern Blot-Analyse für die Integrinuntereinheit $\beta 4$ stellte sich in allen drei Zelllinien problematisch dar, da sich autoradiographische Signale unspezifischer Hybridisierung auf dem Film abbildeten (Abb. 3.4a, 3.7a, 3.10a). Die Kontrollhybridisierungen wiesen auf die Intaktheit der Northern Blots hin, da sich zumindest die kleinere PO-mRNA (1116 Basen) regelrecht darstellte.

Hingegen waren Expressionsmuster für die Integrinuntereinheit $\beta 4$ in der quantitativen *real time* PCR eindeutig zu detektieren (Abb. 3.4b). Die auf 1 normierten relativen Expressionen lagen für $\beta 4$ zwischen dem 0,97- und dem 1,15-fachen der unbehandelten Kontrolle. Die statistische Auswertung mit dem t-Test ergab, dass keine signifikante Transkriptionsänderung für diese Untereinheit unter dem Einfluss von 17- β -Estradiol, Tamoxifen und ICI 182,780 (Faslodex) vorliegt. Für die Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 1$ ergaben sich in der quantitativen *real time* PCR ebenfalls keine signifikanten Änderungen auf Transkriptionsebene, wodurch sich die Aussagen der Northern Blot-Analyse bestätigten (Abb. 3.2b, 3.3b). Die normierten Werte lagen für die $\alpha 6$ -Untereinheit zwischen dem 0,98- und 1,36-fachen und für die $\beta 1$ -Untereinheit zwischen dem 0,85- und 1,52-fachen der unbehandelten Kontrolle.

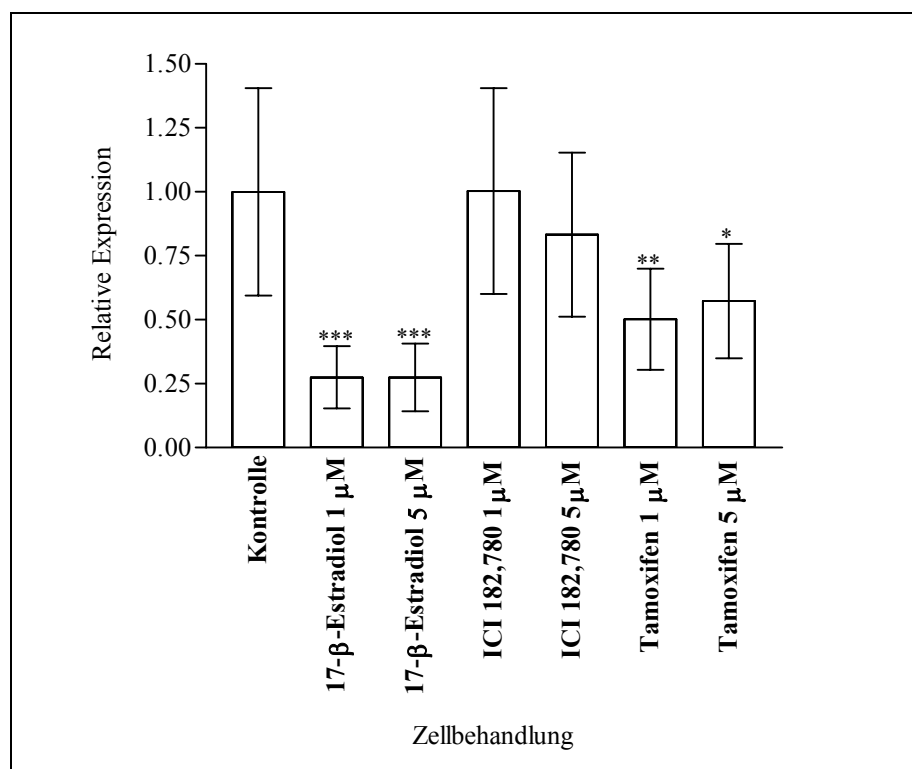
3.2.2 Die Integrinexpression in der Zelllinie UM-SCC 14B

In den Abbildungen 3.5 bis 3.7 sind die mRNA-Expressionsanalysen der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ in der Zelllinie UM-SCC 14B unter dem Einfluss von 17- β -Estradiol, Tamoxifen und ICI 182,780 (Faslodex) dargestellt.

Für die Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 1$ stellt sich eine deutliche Abnahme des autoradiographischen Signals unter dem Einfluss von 17- β -Estradiol und Tamoxifen in der Northern Blot-Analyse dar (Abb. 3.5a, 3.6a). Die Transkriptionsminderung erfolgt jeweils auf das gleiche Niveau, so dass die Höhe der Konzentrationen – 1 μ M oder 5 μ M – keinen Einfluss auf das Ausmaß hat. Sowohl bei $\alpha 6$ als auch bei $\beta 1$ ist das östrogenbedingte autoradiographische Signal schwächer ausgeprägt als das tamoxifenbedingte. Folglich nimmt 17- β -Estradiol einen stärkeren Einfluss auf die Integrinregulation. Die Bandenstärken der mit ICI 182,780 (Faslodex) behandelten Proben sind im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unverändert. Somit liegt keine Regulation durch diesen Östrogenrezeptorantagonisten vor. Die Northern Blot-Analyse für die Integrinuntereinheit $\beta 4$ gestaltete sich, wie bereits in Kapitel 3.2.1 erläutert, in dieser Zelllinie problematisch (Abb. 3.7a).

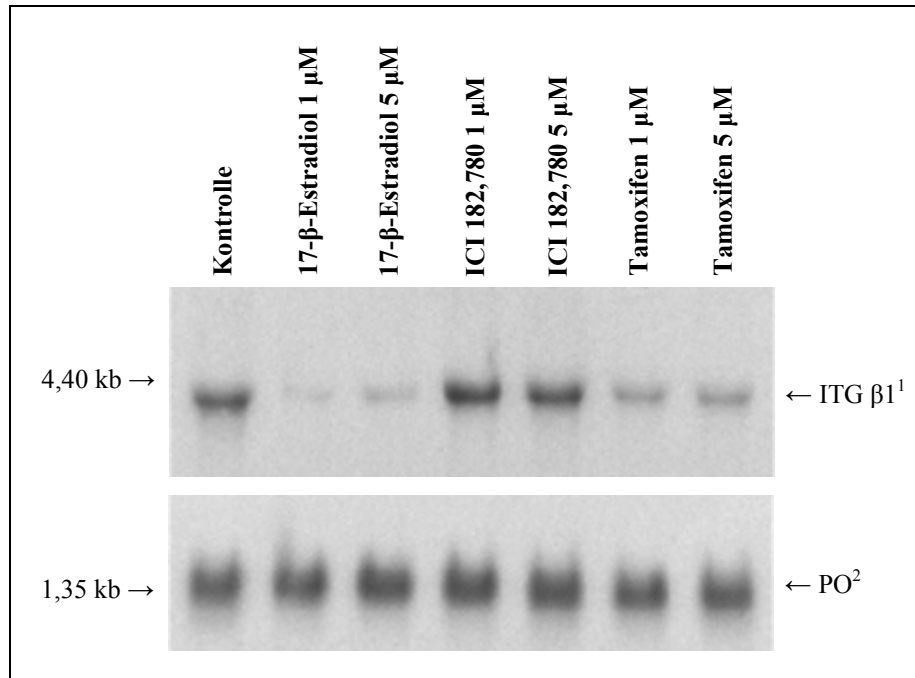


(a)

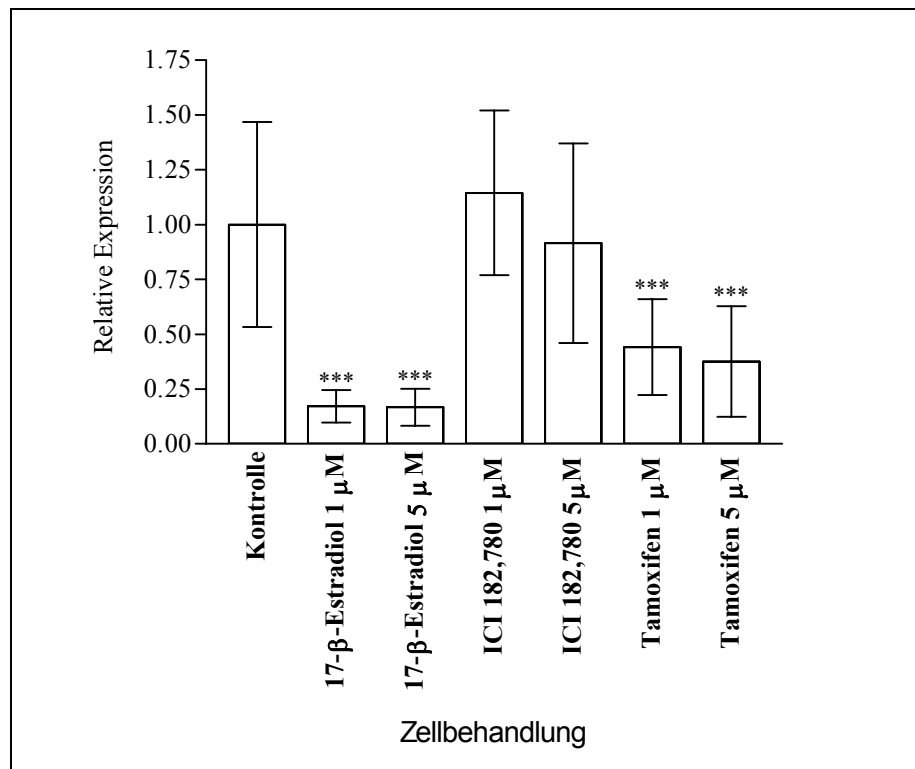


(b)

Abbildung 3.5: Die *Integrinuntereinheit $\alpha 6$* in der Zelllinie *UM-SCC 14B* - Expressionsanalyse mittels Northern Blot (a) und quantitativer *real time PCR* (b) bei Behandlung mit 17- β -Estradiol, ICI 182,780 (Faslodex) und Tamoxifen; 1 Integrinuntereinheit $\alpha 6$, 2 saures ribosomales Phosphoprotein PO als endogene Kontrolle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Fehlerbalken in (b) zeigen die Standardabweichung

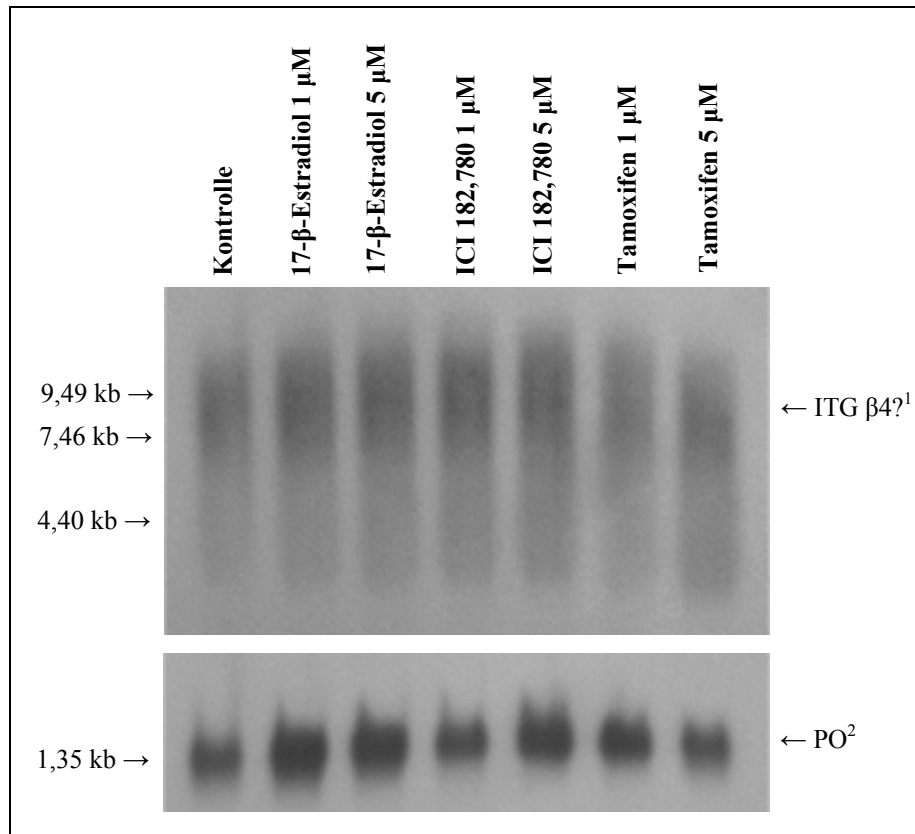


(a)

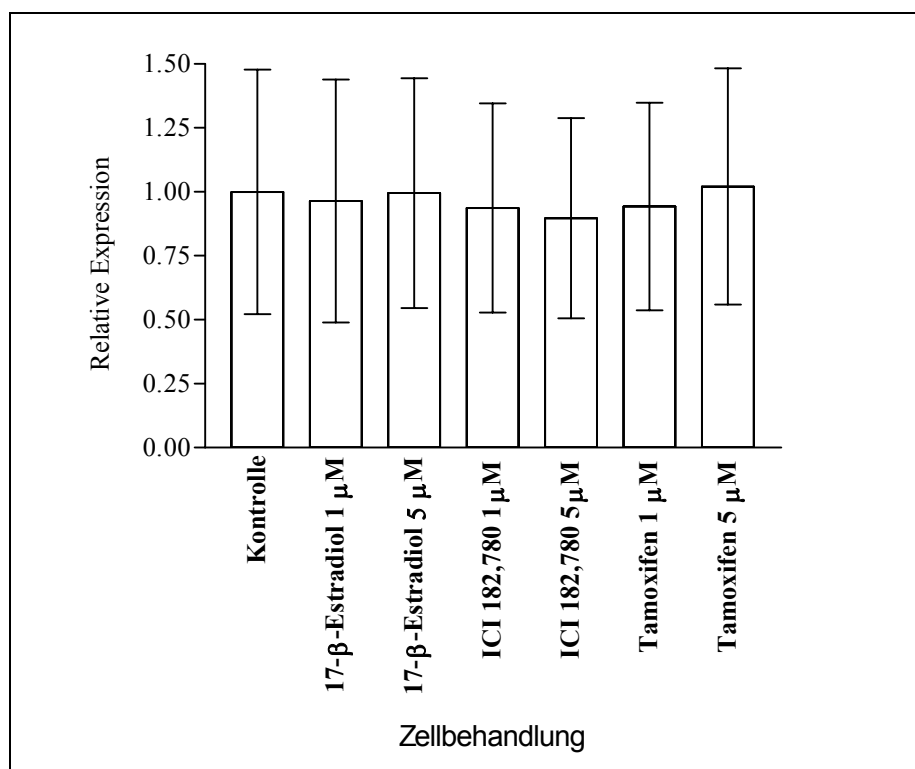


(b)

Abbildung 3.6: Die *Integrinuntereinheit $\beta 1$* in der Zelllinie *UM-SCC 14B* - Expressionsanalyse mittels Northern Blot (a) und quantitativer *real time PCR* (b) bei Behandlung mit 17- β -Estradiol, ICI 182,780 (Faslodex) und Tamoxifen; ¹ Integrinuntereinheit $\beta 1$, ² saures ribosomales Phosphoprotein PO als endogene Kontrolle, *** $p < 0,001$; Fehlerbalken in (b) zeigen die Standardabweichung



(a)



(b)

Abbildung 3.7: Die *Integrinuntereinheit $\beta 4$* in der Zelllinie *UM-SCC 14B* - Expressionsanalyse mittels Northern Blot (a) und quantitativer *real time PCR* (b) bei Behandlung mit 17- β -Estradiol, ICI 182,780 (Faslodex) und Tamoxifen; ¹ Integrinuntereinheit $\beta 4$, ² saures ribosomales Phosphoprotein PO als endogene Kontrolle; Fehlerbalken in (b) zeigen die Standardabweichung

In der quantitativen *real time* PCR bestätigten sich die Aussagen der Northern Blot-Analyse. Die Transkription der Integrinuntereinheit $\alpha 6$ wurde unter Behandlung mit 1 μM und mit 5 μM 17- β -Estradiol höchstsignifikant (***) $p < 0,001$) supprimiert. Die Behandlung mit 1 μM Tamoxifen führte zu einer hochsignifikanten (***) $p < 0,01$) und die Gabe von 5 μM Tamoxifen resultierte in einer signifikanten (***) $p < 0,05$) Expressionsminderung (Abb. 3.5b). 17- β -Estradiol minderte in beiden Konzentrationen die Transkription auf das etwa 0,27-fache und Tamoxifen in beiden Konzentrationen auf das etwa 0,5-fache der unbehandelten Kontrolle. Somit bewirkt das Östrogen eine stärkere Modulation.

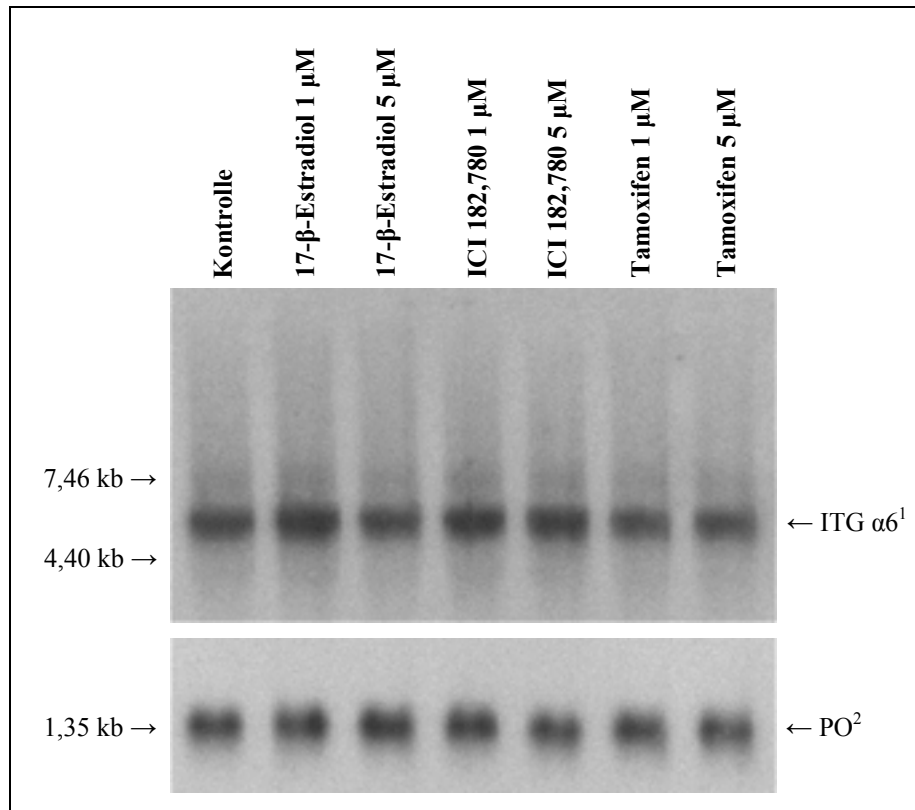
Analoges zeigt sich für die Integrinuntereinheit $\beta 1$ in der quantitativen *real time* PCR. In den eingesetzten Konzentrationen supprimieren 17- β -Estradiol und Tamoxifen die $\beta 1$ -Transkription höchstsignifikant (***) $p < 0,001$, Abb. 3.6b). Dabei erreicht das Expressionsniveau durch das Östrogen das 0,17-fache und durch den selektiven Östrogenrezeptormodulatorens das 0,4-fache des Ausgangsniveaus. ICI 182,780 (Faslodex) hat keinen signifikanten Einfluss auf die Regulation der mRNA-Expression der Integrinuntereinheit $\beta 1$.

Für die Integrinuntereinheit $\beta 4$ in der Zelllinie UM-SCC 14B lassen sich mittels quantitativer *real time* PCR eindeutige Aussagen treffen. Die auf 1 normierten relativen Expressionswerte liegen zwischen dem 0,94- und 1,01-fachen der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.7b). Nach statistischer Auswertung mit dem t-Test liegt hier keine signifikante mRNA-Expressionsmodulation vor.

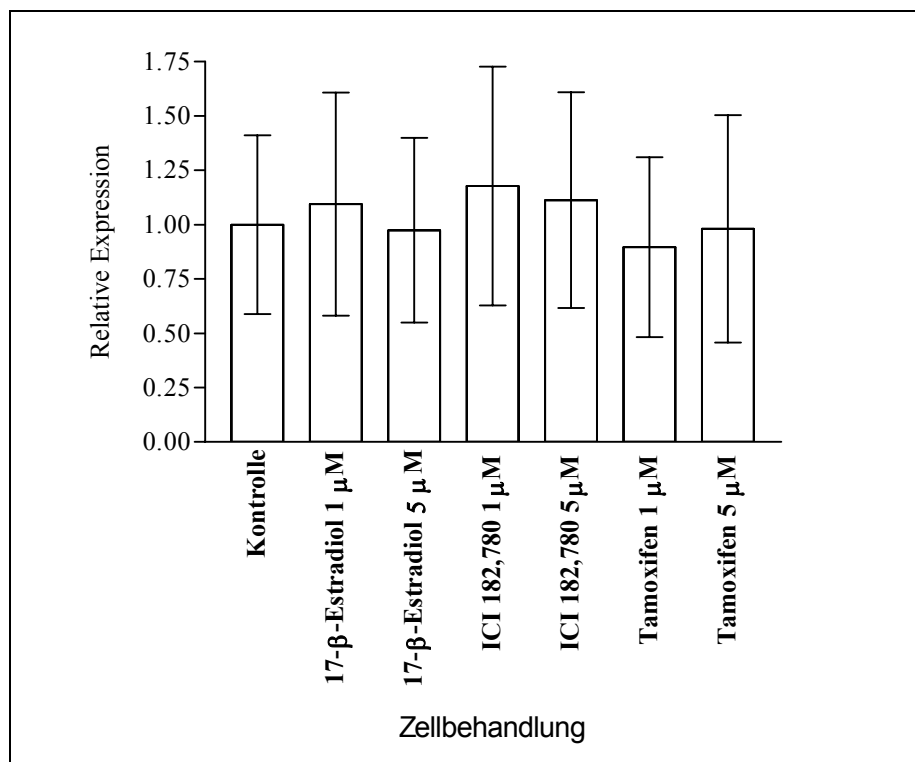
3.2.3 Die Integrinexpression in der Zelllinie UM-SCC 14C

In den Abbildungen 3.8 bis 3.10 sind die mRNA-Expressionsanalysen der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ in der Zelllinie UM-SCC 14C unter dem Einfluss von 17- β -Estradiol, Tamoxifen und ICI 182,780 (Faslodex) dargestellt.

In der Northern Blot-Analyse zeigen sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gleiche autoradiographische Signalintensitäten bei der spezifisch detektierten $\alpha 6$ - und $\beta 1$ -mRNA (Abb. 3.8a, 3.9a). Die zugehörigen Kontrollhybridisierungen mit dem sauren ribosomalen Phosphoprotein PO weisen gleichmässige Beladung nach. Die Northern Blot-Analyse für die Integrinuntereinheit $\beta 4$ ist nicht aussagefähig (Abb. 3.10a, s.a. Kap. 3.2.1).

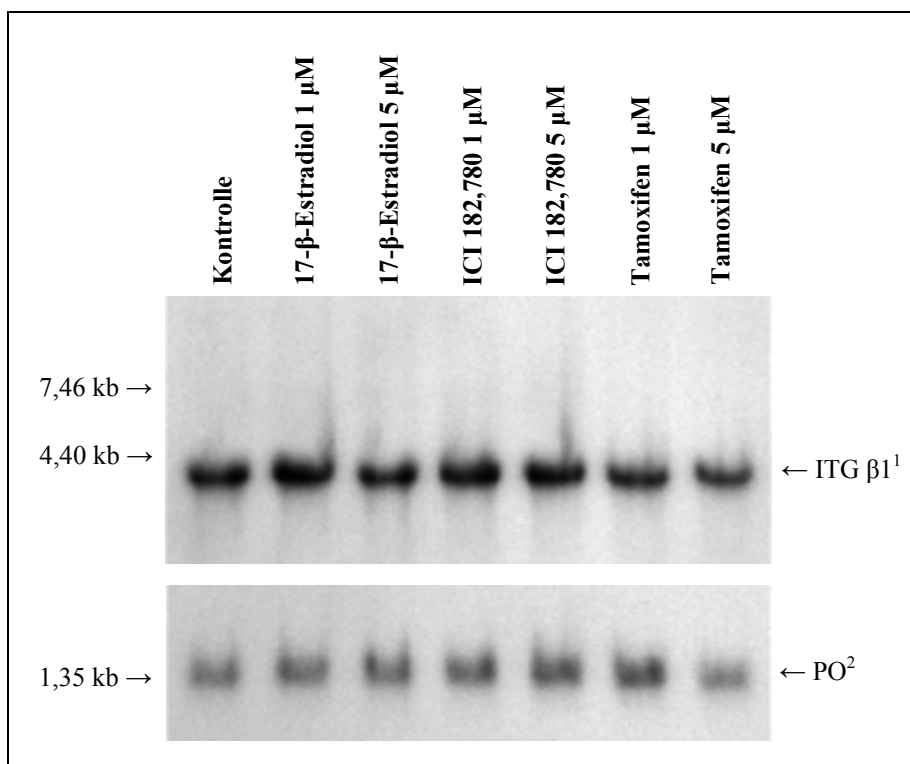


(a)

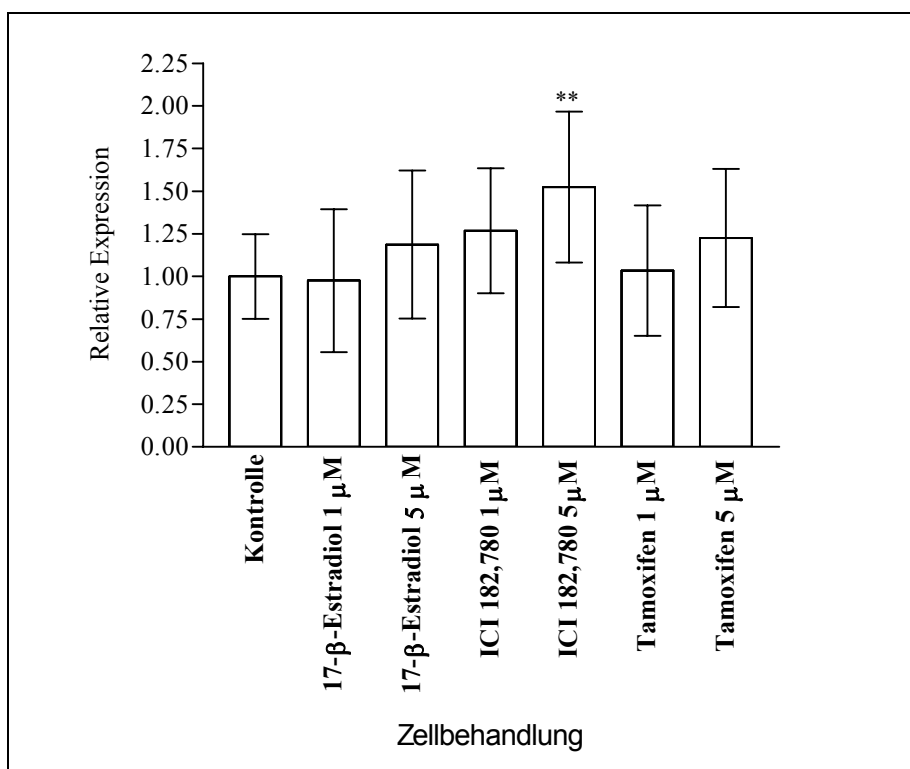


(b)

Abbildung 3.8: Die *Integrinuntereinheit $\alpha 6$* in der Zelllinie *UM-SCC 14C* - Expressionsanalyse mittels Northern Blot (a) und quantitativer *real time PCR* (b) bei Behandlung mit 17- β -Estradiol, ICI 182,780 (Faslodex) und Tamoxifen; 1 Integrinuntereinheit $\alpha 6$, 2 saures ribosomales Phosphoprotein PO als endogene Kontrolle; Fehlerbalken in (b) zeigen die Standardabweichung

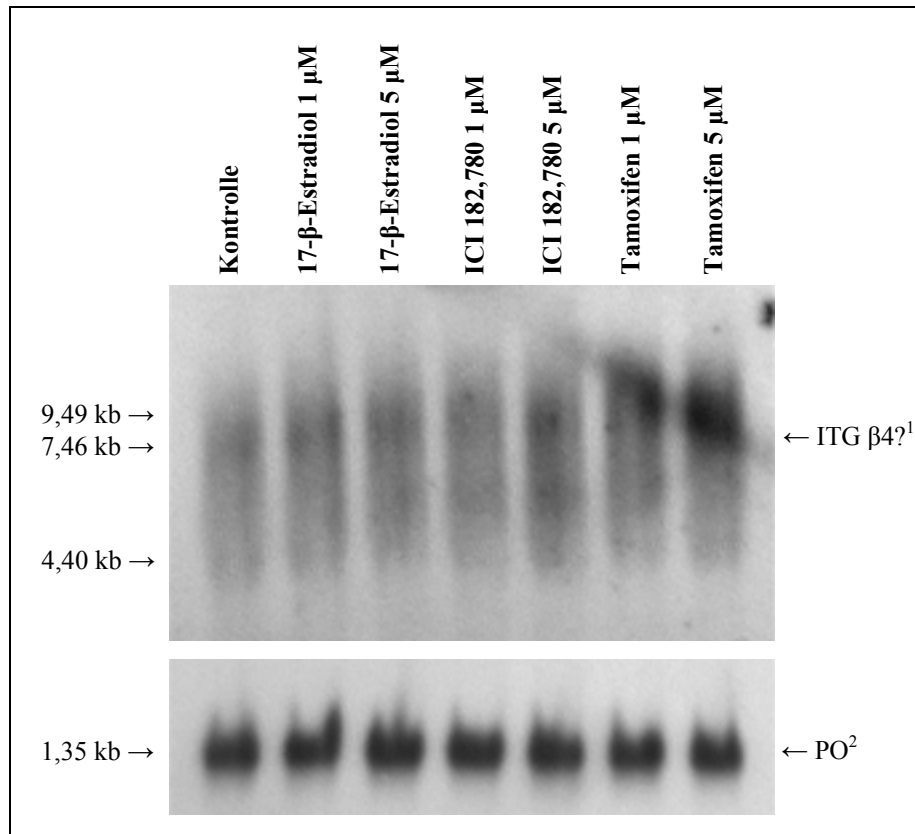


(a)

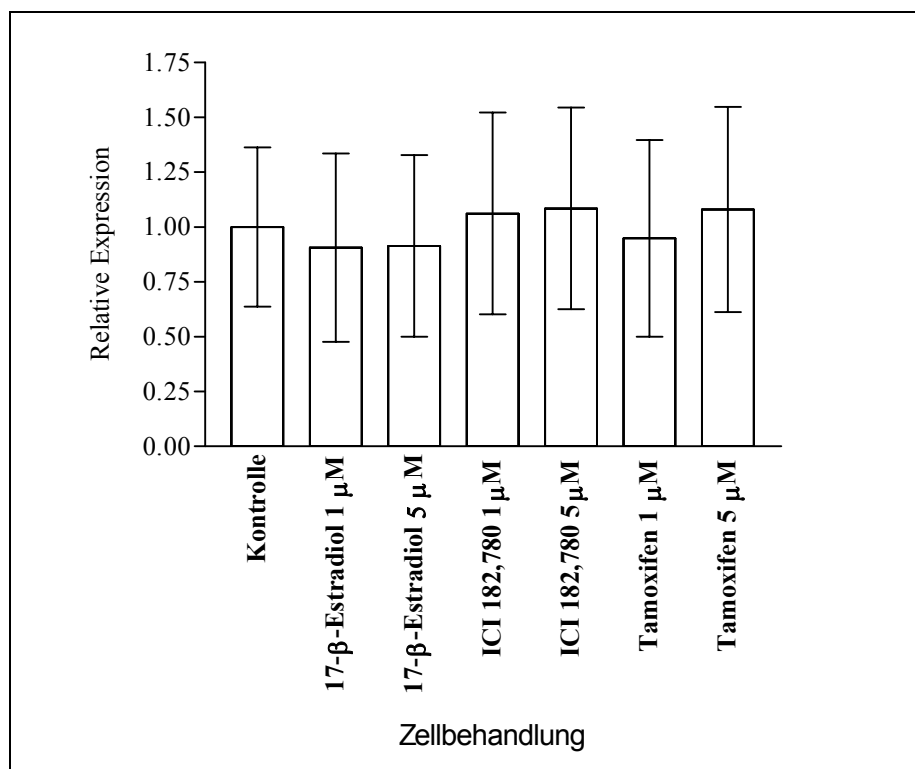


(b)

Abbildung 3.9: Die *Integrinuntereinheit $\beta 1$* in der Zelllinie *UM-SCC 14C* - Expressionsanalyse mittels Northern Blot (a) und quantitativer *real time PCR* (b) bei Behandlung mit 17- β -Estradiol, ICI 182,780 (Faslodex); ¹ *Integrinuntereinheit $\beta 1$* , ² *saures ribosomales Phosphoprotein PO* als endogene Kontrolle, ** $p < 0,01$; Fehlerbalken in (b) zeigen die Standardabweichung



(a)



(b)

Abbildung 3.10: Die *Integrinuntereinheit $\beta 4$* in der Zelllinie *UM-SCC 14C* - Expressionsanalyse mittels Northern Blot (a) und quantitativer *real time PCR* (b) bei Behandlung mit 17- β -Estradiol, ICI 182,780 (Faslodex) und Tamoxifen; ¹ *Integrinuntereinheit $\beta 4$* , ² *saures ribosomales Phosphoprotein PO* als endogene Kontrolle; Fehlerbalken in (b) zeigen die Standardabweichung

In der quantitativen *real time* PCR liegen für die Integrinuntereinheit $\alpha 6$ die auf die unbehandelte Kontrolle normierten Expressionen zwischen dem 0,88- und 1,16-fachen (Abb. 3.8b). Statistisch ergeben sich keine signifikanten Expressionsveränderungen im t-Test. Bei der Integrinuntereinheit $\beta 1$ zeigt sich eine 1,52-fache Expressionsverstärkung unter der Behandlung mit ICI 182,780 (Faslodex) in der Konzentration von 5 μM . Die statistische Auswertung mit dem t-Test ergibt hier eine hochsignifikante (** $p < 0,01$) Transkriptionszunahme (Abb. 3.9b). Die Expressionen der anderen Behandlungsmodalitäten liegen zwischen dem 0,95- und 1,24-fachen der unbehandelten Kontrolle und sind nicht signifikant reguliert.

Die quantitative *real time* PCR für die Integrinuntereinheit $\beta 4$ zeigt nach Auswertung Expressionsveränderungen, die zwischen dem 0,89- bis 1,08-fachen der unbehandelten Kontrolle liegen (Abb. 3.10b). Die statistische Auswertung mit dem t-Test ergibt hier keine signifikante Transkriptionsmodulation.