

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von 17- β -Estradiol, Tamoxifen und ICI 182,780
(Faslodex) auf die mRNA-Expression der
Integrinuntereinheiten $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ in den
Plattenepithelkarzinomzelllinien UM-SCC 14A, 14B und 14C

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Victor Helmstädter

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. Lage

2. Prof. Dr. H. Bier

3. Prof. Dr. Dr. B. Hell

Datum der Promotion: 23.06.2006

INHALTSVERZEICHNIS		I
ABBILDUNGS-, FORMEL- UND TABELLENVERZEICHNIS		III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS		IV
1	EINLEITUNG	
1.1	Das Plattenepithelkarzinom des Mundbodens – ein allgemeiner Überblick	1
1.2	Das Östrogen 17- β -Estradiol – Bedeutung in der Pathogenese von Mundbodenkarzinomen?	2
1.3	Die Östrogenrezeptoren – Angriffspunkte für Östrogene und Antiöstrogene	3
1.4	Die Antiöstrogene Tamoxifen und ICI 182,780 (Faslodex)	3
1.5	Integrine in Karzinomen – eine ätiopathologische Betrachtung	4
1.6	Zwei bedeutende Vertreter – die Integrine $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$	5
1.6.1	Die Integrine $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ – zwei grundlegende Faktoren der Karzinogenese	6
1.7	17- β -Estradiol – ein Modulator der Integrinexpression in östrogenresponsiven Geweben	8
1.8	Die Zelllinien UM-SCC 14A, 14B und 14C – progrediente Tumorstadien eines T1N0M0-Plattenepithelkarzinoms des Mundbodens	8
1.8.1	17- β -Estradiol, Tamoxifen und ICI 182,780 (Faslodex) – Modulatoren der Integrinexpression in einem progredienten Tumorleiden?	9
1.9	Zielsetzung und Aufbau dieser Arbeit	10
2	MATERIAL UND METHODEN	
2.1	MATERIAL	11
2.1.1	Chemikalien und Enzyme	11
2.1.2	Radiochemikalien	12
2.1.3	Kits, Fertiglösungen und Puffer	12
2.1.4	Nukleinsäuren	13
2.1.5	Biologisches Material	14
2.1.6	Verbrauchsmaterial	15
2.1.7	Zusammensetzung der Versuchslösungen	16
2.1.8	Geräte	16
2.1.9	Software	18
2.2	METHODEN	19
2.2.1	Zellkultur	19
2.2.2	Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren	20

2.2.3	Arbeiten mit Ribonukleinsäuren (RNA)	20
2.2.3.1	Isolation von RNA	20
2.2.3.2	Reverse Transkription von RNA	20
2.2.3.3	RNA-Agarosegelelektrophorese	20
2.2.3.4	Northern Blot-Analyse	21
2.2.4	Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	22
2.2.4.1	DNA-Agarosegelelektrophorese	22
2.2.4.2	DNA-Elution aus Agarosegelen	22
2.2.4.3	Die klassische Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.2.4.4	Quantitative <i>real time</i> PCR	23
2.2.4.5	Klonierung spezifischer PCR-Produkte und Vermehrung von Bakterienklonen	24
2.2.4.6	Präparation von Plasmid-DNA	24
2.2.4.7	Sequenzierung von DNA	25
2.2.4.8	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	25
2.2.4.9	Enzymatische Restriktion von DNA	25
3	ERGEBNISSE	
3.1	Die Östrogenrezeptoren α und β in den Zelllinien UM-SCC 14A, 14B und 14C	26
3.2	mRNA-Expressionsanalyse der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$	27
3.2.1	Die Integrinexpression in der Zelllinie UM-SCC 14A	27
3.2.2	Die Integrinexpression in der Zelllinie UM-SCC 14B	31
3.2.3	Die Integrinexpression in der Zelllinie UM-SCC 14C	35
4	DISKUSSION	
4.1	Die Integrinexpression in der Zelllinie UM-SCC 14A	40
4.2	Die Integrinexpression in der Zelllinie UM-SCC 14B	42
4.3	Die Integrinexpression in der Zelllinie UM-SCC 14C	43
4.4	Praxisrelevanz und Ausblick	45
	ZUSAMMENFASSUNG	46
	LITERATURVERZEICHNIS	47
	DANKSAGUNG	52
	CURRICULUM VITAE	53
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	56

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Schematische Darstellung eines Integrinrezeptors	5
Abb. 1.2	Zentrale Arbeitsschritte der in dieser Arbeit eingesetzten Methoden	10
Abb. 3.1	Nachweis der Östrogenrezeptoren α und β in den unbehandelten Zelllinien UM-SCC 14A, 14B und 14C mittels PCR	26
Abb. 3.2	Die Integrinuntereinheit $\alpha 6$ in der Zelllinie UM-SCC 14A	28
Abb. 3.3	Die Integrinuntereinheit $\beta 1$ in der Zelllinie UM-SCC 14A	29
Abb. 3.4	Die Integrinuntereinheit $\beta 4$ in der Zelllinie UM-SCC 14A	30
Abb. 3.5	Die Integrinuntereinheit $\alpha 6$ in der Zelllinie UM-SCC 14B	32
Abb. 3.6	Die Integrinuntereinheit $\beta 1$ in der Zelllinie UM-SCC 14B	33
Abb. 3.7	Die Integrinuntereinheit $\beta 4$ in der Zelllinie UM-SCC 14B	34
Abb. 3.8	Die Integrinuntereinheit $\alpha 6$ in der Zelllinie UM-SCC 14C	36
Abb. 3.9	Die Integrinuntereinheit $\beta 1$ in der Zelllinie UM-SCC 14C	37
Abb. 3.10	Die Integrinuntereinheit $\beta 4$ in der Zelllinie UM-SCC 14C	38

FORMELVERZEICHNIS

F. 1.1	Berechnung der Plasmid-DNA-Konzentration mit der Einheit [Moleküle/ μ l]	23
--------	--	----

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1	Charakterisierung der verwendeten Oligonukleotidprimer zur Amplifikation der Östrogenrezeptoren α und β , des sauren ribosomalen Phosphoproteins PO und der Aldolase	13
Tab. 2.2	Charakterisierung der verwendeten Oligonukleotidprimer zur Amplifikation der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$	14
Tab. 2.3	Charakterisierung der eingesetzten humanen Karzinomzelllinien	15
Tab. 2.4	Zusammensetzung der in dieser Arbeit eingesetzten Versuchslösungen	16
Tab. 2.5	Hormonkonzentrationen in phenolrotfreiem DMEM/ F12	19
Tab. 2.6	PCR-Bedingungen für die Oligonukleotidprimerpaare der Tab. 2.1 und 2.2	23
Tab. 2.7	In dieser Arbeit eingesetzte Restriktionsenzyme und Reaktionsbedingungen	25