

4 DISKUSSION

Der Einfluss des Östrogens 17- β -Estradiol, des selektiven Östrogenrezeptormodulatorens Tamoxifen und des Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182,780 (Faslodex) sollte in dieser Arbeit auf die Expression der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ in den Plattenepithelkarzinomzelllinien UM-SCC 14A, 14B und 14C untersucht werden. Zur Darstellung von Expressionsveränderungen auf mRNA-Ebene wurden die Northern Blot-Analyse und die quantitative *real time* PCR gewählt. Lediglich die $\beta 4$ -mRNA-Expression war in der Northern Blot-Analyse nicht darzustellen, da sich jeweils Banden unspezifischer Hybridisierung abbildeten. Als Ursache hierfür kommen nicht funktionsfähige DNA-Sonden oder defekte mRNA in Frage. Ersteres wurde durch Sequenzierung und Restriktionsanalysen ausgeschlossen. Zusätzlich wurden Hybridmoleküle mit Längen zwischen 200 bp und 1792 bp eingesetzt, welche unterschiedlichen Regionen des offenen Leserahmens der $\beta 4$ -mRNA-Originalsequenz entsprachen. Nicht auszuschließen ist, dass $\beta 4$ -mRNA aufgrund der höheren Basenzahl (etwa 5645 Basen) eine größere Empfindlichkeit aufweist und somit anfälliger für Degradierungen ist. Die Intaktheit der Northern Blots zeigten die regelrechten Hybridisierungen mit dem kleineren ribosomalen Phosphoprotein PO (etwa 1116 Basen; Abb. 3.4a, 3.7a, 3.10a).

4.1 Die Integrinexpression in der Zelllinie UM-SCC 14A

In der Zelllinie UM-SCC 14A hatten Voruntersuchen von Nelson *et al.* eine signifikante Oberflächensuppression der Integrinuntereinheit $\beta 1$ unter dem Einfluss von ICI 182,780 (Faslodex) bei einer Konzentration von 1 μ M ergeben (persönliche Kommunikation, Katja Nelson). Das ließ schlussfolgern, dass ICI 182,780 (Faslodex) Transkription, Translation oder die Proteinhaltzeit dieser Untereinheit reguliert. Die hier durchgeführten mRNA-Expressionsanalysen wiesen nach, dass ICI 182,780 (Faslodex) keinen Einfluss auf die Transkription der Integrinuntereinheit $\beta 1$ nimmt. Sowohl in der 1 μ M als auch in der 5 μ M Konzentration von ICI 182,780 (Faslodex) wurden zur unbehandelten Kontrolle vergleichbare mRNA-Expressionsmengen detektiert. Der Regulationsmechanismus muss somit auf Proteinebene liegen. Dalton *et al.* (1995) beschreiben die kontinuierliche Synthese, den Transport zur Zelloberfläche und die anschließende Internalisierung in Vesikeln mit lysosomaler Degradierung als Lebenszyklus der Integrine. Unseren Ergebnissen nach muss ICI 182,780 (Faslodex) auf noch unbekanntem Signalwegen in diese Kaskade eingreifen: entweder hemmt es direkt die an den Ribosomen stattfindende Translation, verhindert den Transport der fertigen Proteine zur Zelloberfläche oder

beschleunigt den anschließenden Internalisierungsprozess. Bei letzterem könnte einerseits eine Internalisierung mit anschließendem Wiedereinbau der funktionsfähigen Untereinheit in die Zellmembran oder andererseits gleichzeitig eine intralysosomale Degradierung vorliegen. Es ist bekannt, dass phosphorylierte Proteine Ziel des degradierenden 26S-Proteasoms werden (Meyer *et al.*, 2004). Während die auf der Zelloberfläche exprimierte β 1-Proteine dephosphoryliert sind, sind die im Zytoplasma vorzufindenden phosphoryliert (Barreuther *et al.*, 1996). Somit könnte ICI 182,780 (Faslodex) als weitere Möglichkeit das 26S-Proteasom aktivieren und durch die resultierende Degradierung den β 1-Proteinnachschub für die Zelloberfläche einschränken. Oder es führt über Zwischenschritte zu einer direkten Phosphorylierung des β 1-Oberflächenproteins. Das hätte zur Folge, dass Transkription und Translation regelrecht ablaufen, jedoch die Oberflächenexpression stark reduziert ist. In Analogie beobachteten Meyer *et al.* (2004) in verschiedenen Neuroblastomzelllinien ähnliche mRNA-Level der Integrinuntereinheit β 1. Die β 1-Proteinhalbwertszeiten variierten hingegen so stark, dass die Zelllinien unterschiedliche β 1-Oberflächenexpressionsmuster aufwiesen.

In Fibroblasten ist ein Verlust der Adhäsionskontakte zur extrazellulären Matrix der Initiator für vermehrte Internalisierung und Degradierung der β 1-Integrine (Dalton *et al.*, 1995). Vorversuche zeigten, dass unter ICI 182,780 (Faslodex, 0,1 μ M – 5 μ M) die Adhäsion der UM-SCC 14A-Zellen gegenüber Laminin 1 abnimmt (persönliche Kommunikation, Katja Nelson). Somit ist als weiterer Mechanismus der β 1-Oberflächenexpressionsminderung unter ICI 182,780 (Faslodex) die antiöstrogenbedingte Hemmung der Laminin 1-Adhäsion zu sehen. Erst sekundär, in Folge des Kontaktverlustes, würde schließlich eine verstärkte β 1-Internalisierung mit oder ohne Degradierung resultieren.

Wie in den anderen Zelllinien auch wurde der positive Östrogenrezeptorstatus durch die Polymerasekettenreaktion bestätigt. Nachgewiesenermaßen sind die Östrogenrezeptoren α und β zentrale Angriffspunkte von 17- β -Estradiol, Tamoxifen und ICI 182,780 (Faslodex) (Osborne *et al.*, 2000). Die Integrinuntereinheiten α 6, β 1 und β 4 erfuhren durch diese Wirkstoffe keine Modulation auf mRNA-Ebene, so dass deren Gene nicht zu den östrogenresponsiven Elementen in dieser Zelllinie zu zählen sind.

4.2 Die Integrinexpression in der Zelllinie UM-SCC 14B

In der Zelllinie UM-SCC 14B zeigten sich signifikante Expressionsveränderungen der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 1$ unter dem Einfluss von 17- β -Estradiol und Tamoxifen. Sowohl in der 1 μ M als auch in der 5 μ M Östrogenkonzentration wurde die $\alpha 6$ -mRNA-Expression auf etwa 30 % und die Expression der $\beta 1$ -mRNA auf etwa 20 % der unbehandelten Kontrolle supprimiert. Ebenso unabhängig von der eingesetzten Konzentration minderte Tamoxifen die Transkription der Integrinuntereinheit $\alpha 6$ auf etwa 50 % und die der Untereinheit $\beta 1$ auf etwa 40 % des unbehandelten Ausgangsniveaus. Es wird deutlich, dass der von Zielgen und -zelle abhängig wirkende selektive Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen in diesem Modell eine östrogenagonistische Wirkung entfaltet. Die Integrin $\alpha 6$ - und $\beta 1$ -Gene sind in dieser Zelllinie zu den östrogenresponsiven Elementen zu zählen, da die nukleären Transkriptionsfaktoren Östrogenrezeptor α und β die Angriffspunkte für 17- β -Estradiol und Tamoxifen darstellen (Osborne *et al.*, 2000). Die zentrale Stellung dieser Rezeptoren in der beobachteten Regulationskaskade sollte durch selektive Rezeptorblockade in Folgeexperimenten untermauert werden. In der Mammkarzinomzelllinie MCF-7 beschrieben Swiatecka *et al.* (2001) eine Stimulation der $\beta 1$ -Expression unter dem Einfluss von 17- β -Estradiol. Dabrowska *et al.* (2001) beobachteten in der gleichen Zelllinie nach Tamoxifengabe eine $\beta 1$ -Suppression. Behandelten sie die Zellen zunächst mit 17- β -Estradiol und anschließend mit Tamoxifen, war der Antagonismus weitaus geringer ausgeprägt. Wie in der Zelllinie UM-SCC 14B weist das den gleichen Mechanismus beider Wirkstoffe nach und legt die Östrogenrezeptoren α und β als zentrale Angriffspunkte nahe.

Im Gegensatz zur Modulation der Integrinexpression auf mRNA-Ebene, wurden die Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 1$ auf Proteinebene nicht reguliert; unter dem Einfluss von 17- β -Estradiol und Tamoxifen waren unveränderte Oberflächenexpressionen zu beobachten (persönliche Kommunikation, Katja Nelson). Das zeigt, dass trotz verminderter Transkription Mechanismen bestehen, die die Oberflächenexpression konstant halten. Eine Möglichkeit wäre, dass innerhalb des Zeitfensters von 22 Stunden im Versuchsaufbau Änderungen auf Transkriptionsebene rasch eintreten, während sich ergebende Modulationen auf Proteinebene verzögert manifestieren. Das könnte ein Hinweis auf inaktive, vesikulär gespeicherte Integrinuntereinheiten sein, die erst im Rahmen einer Transkriptionsminderung aktiviert und in die Zellmembran eingebaut werden. Folglich würde eine stark verzögerte Oberflächenexpressionsminderung der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 1$ bei Sistieren der $\alpha 6$ - und $\beta 1$ -Transkription unter dem Einfluss von 17- β -

Estradiol und Tamoxifen zu beobachten sein. Um Hinweise auf eine Proteinmodulation zu finden, muss in Folgeexperimenten die Versuchsdauer von 22 Stunden verlängert werden.

Ist dieser Zeitpunkt der Oberflächensuppression der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 1$ erreicht, so resultiert eine Minderung sowohl des Integrins $\alpha 6\beta 1$ als auch des Integrins $\alpha 6\beta 4$. Der Grund liegt in der ausschließlichen Heterodimerisierung von $\alpha 6$ mit den Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 4$ (Mizejewski, 1999). Auch wenn die Expression der Untereinheit $\beta 4$ nicht moduliert wird, wie unsere Versuche zeigen, so steht $\beta 4$ keiner anderen Untereinheit der Integrinbildung zur Verfügung. Es ist ausschließlich in dem Integrin $\alpha 6\beta 4$ vertreten (Hemler *et al.*, 1989) und liegt somit bei $\alpha 6$ -Minderung in einer nicht funktionsfähigen Form vor. Eine automatische $\beta 4$ -Minderung, wie sie Hemler *et al.* (1989) bei spezifischer Ausschaltung des $\alpha 6$ -Proteins beobachteten, trat bei uns nicht auf.

Aber auch $\beta 1$ -Heterodimere, wie die in oralen Plattenepithelkarzinomen überexprimiert beschriebenen Integrine $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ (Shinohara *et al.*, 1999), erfahren bei $\beta 1$ -Expressionsminderung eine Funktionseinschränkung. Entweder werden die hier nicht untersuchten Integrinuntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ unter dem Einfluss von 17- β -Estradiol und Tamoxifen ebenfalls minderexprimiert, liegen in Form nicht funktionsfähiger Monomere vor oder heterodimerisieren kompensatorisch mit anderen β -Untereinheiten. Letzteres wird nicht selten beobachtet, wobei Aufgaben eines Integrins durch andere übernommen werden und der eigentliche Integrinverlust phänotypisch unauffällig bleibt (van der Flier *et al.*, 2001). Weitere Expressionsanalysen müssen zeigen, inwiefern Integrinuntereinheiten einer gegenseitigen Regulation unterliegen.

4.3 Die Integrinexpression in der Zelllinie UM-SCC 14C

In der Zelllinie UM-SCC 14C wiesen die durchgeführten Versuche eine hochsignifikante ($p < 0,01$) mRNA-Expressionssteigerung der Integrinuntereinheit $\beta 1$ unter dem Einfluss von ICI 182,780 (Faslodex) in einer Konzentration von 5 μM nach. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde etwa die anderthalbfache $\beta 1$ -mRNA-Menge transkribiert. In der Northern Blot-Analyse war diese Expressionssteigerung nicht ausreichend zu detektieren, da sie eine geringere Sensitivität gegenüber der quantitativen *real time* PCR aufweist. Die 1 μM Konzentration von ICI 182,780 (Faslodex) hatte keinen Einfluss auf die Expression der Integrinuntereinheit $\beta 1$.

Eine gesteigerte mRNA-Expression resultiert in der Regel in einer ebenfalls gesteigerten Translation. Die Versuche von Nelson *et al.* detektierten in Immunfluoreszenz und FACS-Analysen (*fluorescence activated cell sorting*) jedoch keine vermehrte $\beta 1$ -Proteinexpression auf der Zelloberfläche (persönliche Kommunikation, Katja Nelson). Das kann erneut darauf hindeuten, dass in diesem Zelllinienmodell Transkriptionsvorgänge rascher auf Veränderungen reagieren als Translationsprozesse. Andererseits können Regulationsmechanismen vorliegen, die die Oberflächenexpression von Proteinen konstant halten. In diesem Sinne ist vorzustellen, dass bei gesteigerter Transkription und Translation funktionsfähige $\beta 1$ -Proteine eine zusätzliche intravesikuläre Speicherung erfahren, bevor ihr Einbau in die Zellmembran erfolgt. Erst bei gesättigter Speicherkapazität werden dann die funktionsfähigen Proteine auf der Zellmembran exprimiert.

Es stellt sich die Frage, ob die beschriebene mRNA-Regulation über die Östrogenrezeptoren α und β erfolgt. Wäre das der Fall, würden auch Expressionsveränderungen nach Gabe von 17- β -Estradiol zu erwarten sein. Solche wurden für alle drei Integrinuntereinheiten nicht detektiert. Es lässt sich vermuten, dass die verstärkte Expression der Integrinuntereinheit $\beta 1$ unter ICI 182,780 (Faslodex) daher nicht über die Östrogenrezeptoren gesteuert wird. Anerkannterweise bindet und degradiert ICI 182,780 (Faslodex) in allen bisher untersuchten Zellen diese Rezeptoren (Morris *et al.*, 2002). Es greift somit hemmend in die Wirkung von östrogenrezeptoraktivierenden Stoffen ein. Dieser Effekt ließe sich durch die Applikation eines bekannten Östrogenrezeptorstimulators im Anschluss an die ICI 182,780-Gabe nachweisen, wobei die Wirkung des letzteren durch die vorherige ICI 182,780-Gabe abgeschwächt oder aufgehoben wäre. Somit scheinen weitere Regulationsmechanismen von ICI 182,780 (Faslodex) zu existieren.

4.4 Praxisrelevanz und Ausblick

In den Plattenepithelkarzinomzelllinien UM-SCC 14A, 14B und 14C wurde der Einfluss des Östrogens 17- β -Estradiol, des selektiven Östrogenrezeptormodulatorens Tamoxifen und des Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182,780 (Faslodex) auf die mRNA-Expression der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ untersucht. In der Zelllinie UM-SCC 14B hemmten 17- β -Estradiol und Tamoxifen signifikant bis höchstsignifikant die $\alpha 6$ - und $\beta 1$ -Transkription. Das zeigt, dass Tamoxifen in diesem Modell als Östrogenrezeptoragonist agiert. Nach Aufbrauchung der Proteinspeicher bedeutet eine $\alpha 6$ - und $\beta 1$ -Transkriptionshemmung eine deutliche Minderung der funktionsfähigen Zelloberflächenintegrine $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$; letzteres, weil die Untereinheit $\beta 4$ ausschließlich in diesem Integrin vertreten ist (Hemler *et al.*, 1989). Aus einer Minderexpression der Integrine $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ resultiert folglich eine Einschränkung der die Tumorzellen charakterisierenden Fähigkeiten wie Invasion, Migration und Überleben unter proapoptotischen Bedingungen.

In der Zukunft müssen die Regulationsmechanismen der beobachteten Effekte näher untersucht und Zusammenhänge zu Änderungen des Tumorzellverhaltens hergestellt werden. Die Bedeutung von Krankheitsstadium, Behandlung (Operation, Bestrahlung, Chemotherapie) und Zustand des Tumorzellgenoms als Voraussetzung für die Einflüsse von 17- β -Estradiol und Tamoxifen müssen geklärt werden, da lediglich Zelllinie UM-SCC 14B, die invasivste dieser Tumorzellreihe (persönliche Kommunikation, Katja Nelson), die deutlichen Expressionsmodulationen unter 17- β -Estradiol und Tamoxifen zeigte. In Zelllinie UM-SCC 14C muss die Stimulation der Integrinuntereinheit $\beta 1$ durch ICI 182,780 (Faslodex) weiter untermauert und der vorliegende Wirkmechanismus des Östrogenrezeptorantagonisten geklärt werden. Erst dann kann abgesehen werden, ob die Modulation der Integrinexpression durch Östrogene und Antiöstrogene eine Zukunftsoption in der Behandlung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich darstellt.