

Aus der Klinik für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Modulation der Integrinexpression
auf Zelllinien humaner Plattenepithelkarzinome
des Mundbodens durch Östradiol, ICI 182,780 und Tamoxifen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Cynthia Moreau

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. K. Nelson

2. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. M. Herzog

3. Prof. Dr. H. Bier

Datum der Promotion: 27.03.2009

Bismillah

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Integrine	2
1.1.1	Aufbau der Integrine	2
1.1.2	Funktionen der Integrine	3
1.1.2.1	Zell-Substrat-Verbindung	4
1.1.2.1.1	Fokaladhäsionen	4
1.1.2.1.2	Hemidesmosomen	5
1.1.2.2	Signalübertragung	5
1.1.2.3	Migration	6
1.1.3	Integrinexpression in normaler und maligne veränderter Mundschleimhaut	7
1.1.3.1	Bedeutung einzelner Integrine	8
1.1.3.1.1	$\alpha\beta4$ -Integrin	8
1.1.3.1.2	$\alpha2\beta1$ - und $\alpha3\beta1$ -Integrin	9
1.2	Hormone und Östrogenrezeptor	10
1.2.1	Die Wirkung von Östrogenen auf die Mundschleimhaut	10
1.2.1.1	Tamoxifen	11
1.2.1.2	ICI 182,780	12
2	Zielstellung	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Material	15
3.1.1	Lösungen, Chemikalien und Kits	15
3.1.2	Antikörper	16
3.1.3	Geräte/Materialien	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Zellkultur	18
3.2.1.1	Versuchsansatz	18
3.2.1.2	Hormonbehandlung	19
3.2.2	Immunfluoreszenz	20
3.2.2.1	Prinzip	20

3.2.2.2	Antikörper	21
3.2.2.3	Versuchsaufbau	22
3.2.3	Fluoreszenzmikroskopie	23
3.2.3.1	Prinzip	23
3.2.3.2	Durchführung	24
4	Ergebnisse	26
4.1	Morphologie	26
4.1.1	Modulation der Morphologie durch Hormone	27
4.2	Integrinexpression in der Zelllinie 14A	27
4.2.1	Integrinuntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$	27
4.2.2	Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$	27
4.2.3	Modulation der Integrine durch Hormone	28
4.3	Integrinexpression in der Zelllinie 14B	28
4.3.1	Integrinuntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$	28
4.3.2	Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$	29
4.3.3	Modulation der Integrine durch Hormone	29
4.4	Integrinexpression in der Zelllinie 14C	31
4.4.1	Integrinuntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$	31
4.4.2	Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$	31
4.4.3	Modulation der Integrine durch Hormone	32
4.5	Negativkontrolle	33
4.6	Vergleich der Zelllinien 14A, 14B und 14C sowie der hormonellen Modulation	33
5	Diskussion	36
5.1	Morphologie	36
5.2	Integrinexpression in unbehandelten Monolayerzellkulturen	38
5.2.1	Expression der Integrinketten $\alpha 6$ und $\beta 4$	38
5.2.2	Expression der Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$	41
5.3	Einfluss von Hormonen auf die Integrinexpression	44
5.3.1	Östradiol	44
5.3.2	ICI 182,780	45
5.3.3	Tamoxifen	49

5.3.4	Divergente Integrinexpression unter hormoneller Modulation	50
6	Zusammenfassung	53
7	Literaturverzeichnis	55
	Danksagung	65
	Lebenslauf	66
	Publikation	67
	Selbständigkeitserklärung	68

1 Einleitung

Jedes Jahr werden in Deutschland ca. 425 000 Krebserkrankungen diagnostiziert, allein 10 400 davon sind bösartige Neubildungen im Mund- und Rachenbereich, wie z. B. maligne Neoplasien des Gaumens, der Zunge, des Mundbodens, der Lippe, der Speicheldrüse und des Rachens. Das durchschnittliche Alter bei der Diagnosestellung liegt für Männer bei 61 und für Frauen bei 69 Jahren. Prädisponierende Faktoren für die Entstehung solcher Tumore sind Nikotin- und Alkoholabusus (Krebs in Deutschland 2006, Karim-Kos et al. 2008). Trotz typischer Frühsymptome wie Fremdkörpergefühl, Heiserkeit, Schluckstörungen und Schmerzen im Mund suchen viele Patienten erst im fortgeschrittenen Stadium ärztliche Hilfe.

Für Mundkrebs ist lokales Wachstum mit Invasion in die angrenzenden Gewebe, Gefäße, Nerven und Knochen charakteristisch. Lymphogen breitet er sich in den primären Lymphknotenstationen des Halses aus (Preiß et al. 2000). Fernmetastasen treten erst in fortgeschrittenen Tumorstadien auf und betreffen dann Leber, Knochen und Lunge.

Der Versuch, die Prognose eines Tumors zu verifizieren, ist die TNM-Klassifikation (Tabelle 1.1). Dabei entspricht ein höheres TNM-Stadium einer größeren Wahrscheinlichkeit, an den Folgen des Tumors zu versterben. So überleben 85 % der Patienten in Tumorstadium I, aber nur 10 % der Patienten in Tumorstadium IV die nächsten fünf Jahre (Scully und Felix 2006).

Tabelle 1.1: TNM- Klassifikation und Tumorstadien (Preiß et al. 2000; Scully und Felix 2006)

T - Tumorgröße	N - Lymphknotenbefall	M - Metastasen
T1 Tumor < 2 cm	N0 keine befallenen Lymphknoten	M0 kein Hinweis für Fernmetastasen
T2 Tumor 2 – 4 cm	N1 solitär ipsilateral < 3 cm	M1-3 Fernmetastasen vorhanden
T3 Tumor > 4 cm	N2 ein- oder beidseitig 3-6 cm	
T4 Infiltration benachbarter Strukturen (Knochen, Halsweichteile, Haut, etc.)	N3 ausgeprägt ipsi-, bi- oder kontralateral, > 6 cm	
Tumorstadien		
I (T1 N0 M0), II (T2 N0 M0), III (T3 N0 M0, T1-3 N1 M0), IV (T4 N2-3 oder M1)		

1.1 Integrine

Für einen Tumorpatienten hängt die Prognose zum Großteil von der Invasivität und Metastasierungstendenz der malignen Neubildung ab. Während gesunde Zellen ihre physiologischen Grenzen erkennen und in ihrem Wachstum gehemmt werden, sind Tumorzellen in der Lage, ihre natürlichen Schranken im Zell- und Gewebeverband zu überschreiten. Sie vermehren sich, koppeln sich ab und binden an Strukturen, die nicht den Bindungspartnern der normalen Ausgangszellen entsprechen. Nach dem Multi-Step-Modell beinhaltet der Prozess der Metastasierung mehrere Stufen:

1. die Ablösung der Zellen von den Nachbarzellen (Detachment),
2. das Durchwandern der Basalmembran und des Interstitiums (Migration)
3. das Eindringen in andere Gewebe sowie in das Lymph- und Bluttransportsystem (Invasion) (Guo und Giancotti 2004).

Alle drei Stufen sind gekennzeichnet von einer fein abgestimmten Verständigung zwischen den Zellen untereinander und der extrazellären Matrix. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei die Integrine. Wie ihr Name verrät, „integrieren“ sie das Zelläußere in das Zellinnere (van der Flier und Sonnenberg 2001). Als Oberflächenrezeptoren der Zellen vermitteln sie nicht nur die mechanische Zell-Matrix-Verbindung, sondern tauschen auch Signale zwischen den Zellen und der Matrix aus (Janes und Watt 2006).

1.1.1 Aufbau der Integrine

Die Integrine bestehen aus einer transmembranären α - und β -Glycoproteinuntereinheit (Hynes 1992) (Abbildung 1.1). Es gibt 18 unterschiedliche α - und acht verschiedene β -Integrinketten. Durch deren Heterodimerisierung konnten bisher über 24 Integrinrezeptoren identifiziert werden. Die Zusammensetzung der Untereinheiten bestimmt die Ligandenspezifität sowie die Funktion der Integrine (Tabelle 1.2). Den Integrinen fehlt eine Domäne für die Bindung an das Zytoskelett. Solche Aufgaben vermitteln Integrin-assoziierte Moleküle. Die intrazelluläre Domäne der β -Integrinkette bindet an einen Anheftungsproteinkomplex, welcher sich u. a. aus Talin, α -Aktinin, Filamin und ILK (Integrin Linked Kinase) zusammensetzt. Dieser Komplex verknüpft das Integrin mit dem Zytoskelett und mehreren Signalmolekülen (Brakebusch und Fässler 2005). An der Zellaußenseite binden die Integrine an die Proteine der extrazellulären Matrix, wie z. B. Collagen, Fibronectin und Laminin (Jin und Varner 2004).

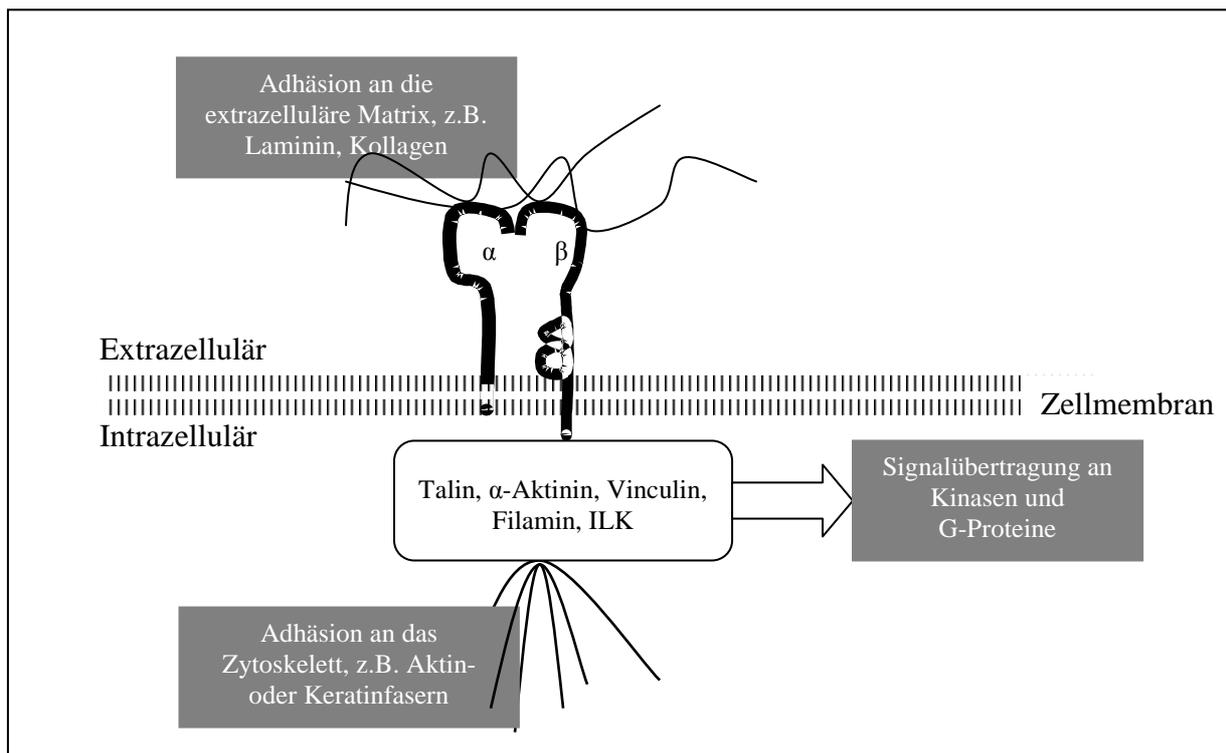


Abbildung 1.1: Aufbau der Integrine: Die α - und β -Kette bilden einen Integrinrezeptor. (Erläuterungen im Text)

Tabelle 1.2: Liganden und Funktionen der Integrine in Plattenepithelien (Thomas et al. 1997; Jin und Varner 2004)

Integrin	Hauptligand	Funktion
$\alpha 2 \beta 1$	Kollagen Typ I und IV, Laminin, $\alpha 3 \beta 1$	Zell-Matrix, Zell-Zell-Verbindung, Fokaladhäsionen
$\alpha 3 \beta 1$	Laminin-1 und -5, Fibronectin, Kollagen, $\alpha 2 \beta 1$	Zell-Matrix, Zell-Zell-Verbindung, Fokaladhäsionen
$\alpha 6 \beta 1$	Laminin-1 und -5	Zell-Matrix, Zell-Zell-Verbindung
$\alpha 6 \beta 4$	Laminin-1 und -5	Hemidesmosomen

1.1.2 Funktionen der Integrine

Die Hauptaufgabe der Integrine im Epithelzellverband liegt in der Interaktion der Zellen mit den Komponenten der extrazellulären Matrix bzw. mit anderen Zellen.

Die Bindung der Integrine an Matrixkomponenten führt zu einer Aggregation in Adhäsionskomplexen, sogenannten „Clustern“. Diese unterteilen sich entsprechend ihrer Zusammensetzung in Fokaladhäsionen oder Hemidesmosomen. Hierbei assoziieren mehrere

Integrine mit verschiedenen Proteinen des Zytoplasmas und des Zytoskeletts und bilden Informationsplattformen. Über diese erfolgt der Austausch von Signalen zwischen den Matrixkomponenten und dem Zellinneren. Je nach Informationsrichtung unterscheidet man zwischen „outside-in“-Signalen und „inside-out“-Signalen (Hood und Cheresch 2002).

1.1.2.1 Zell-Substrat-Verbindung

Während der Bindung an Matrixkomponenten sind Integrine in Fokaladhäsionen oder Hemidesmosomen organisiert. Dies sind die punktförmigen Stellen in der Plasmamembran, mit denen die Zellen an die extrazelluläre Matrix binden.

1.1.2.1.1 Fokaladhäsionen

1971 hatten Abercrombie et al. unter dem Elektronenmikroskop elektronendichte Plaques beobachtet, die die Plasmamembran mit dem Substratum verknüpfen und diese als Adhäsionsplaques bezeichnet. 1976 fielen Izzard und Lochner in Untersuchungen mit dem Interferenzreflexionsmikroskop Punkte in der Plasmamembran auf, die dem Substratum besonders eng anlagen. Die Punkte wurden Fokalkontakte genannt. Später stellte sich heraus, dass Adhäsionsplaques und Fokalkontakte die gleichen Strukturen darstellten. Die Verknüpfung ihrer Namen zu „Fokaladhäsion“ betont einerseits ihre punktförmige Morphologie, andererseits ihre Aufgabe als Bindeglied. Fokaladhäsionen sind hochorganisierte Adhäsionskomplexe aus Integrinen und anderen Proteinen. Die Integrine gruppieren sich zu Clustern und erhöhen die Bindungskraft der Fokaladhäsion (Burrige et al. 1988).

Für eine stabile Bindung sind größere Mengen an Integrinen erforderlich, da ein einzelnes Integrin eine sehr geringe Affinität zu seinen Liganden hat. Damit ist es ihm möglich, Informationen über seine Umgebung aufzunehmen, ohne sofort fest zu adhären. Bei der Erkennung von Zielstrukturen werden weitere Integrine in die Fokaladhäsionen rekrutiert, wodurch sich ihre Bindungskraft erhöht (Hood und Cheresch 2002). In Abhängigkeit von Aktivierungsstatus, Zelltyp und Zusammensetzung stoßen die Fokaladhäsionen verschiedene Signalkaskaden an. Über eine Brücke von weiteren Fokaladhäsions-Proteinen, u.a. Talin, Vinculin und α -Actinin, binden die geclusterten Integrine an Aktinfilamente (van der Flier und Sonnenberg 2001). Diese indirekte Verbindung zum Zellgerüst ermöglicht es den Fokaladhäsionen, Einfluss auf die Zellform zu nehmen. Die Zelle verliert ihre undifferenzierte runde Form und nimmt eine reife Form an (Horwitz 1998). Fokaladhäsionen können außerdem

Ausstülpungen der Zellmembran bilden, mit denen sich die Zelle an Matrixproteinen fortbewegt (Wozniak et al. 2004).

1.1.2.1.2 Hemidesmosomen

Hemidesmosomen sind elektronendichte Adhäsionsplaques aus einer Vielzahl von Proteinen, welche die Zellen mit der Basalmembran verbinden. Die Basalmembran ist eine Laminin-5-haltige Grenzschrift zwischen dem Epithel- und dem Bindegewebe. Hemidesmosomen zeichnen sich durch eine hohe Konzentration an $\alpha 6\beta 4$ -Integrin aus, die über zytoplasmatische Plaque-Proteine an die Intermediärfasern des Zytoskeletts binden. Mit Hilfe von $\alpha 6\beta 4$ -Integrin übernehmen Hemidesmosomen Aufgaben in der Adhäsion, Signalübertragung sowie in der Bestimmung der Zellform (Borradori et al. 1999; Litjens et al. 2006). Für die Bildung von Hemidesmosomen ist $\alpha 6\beta 4$ -Integrin nicht notwendig, allerdings ist es für deren Erhalt und Stabilisierung wichtig (Niessen et al. 1996). Die Anordnung von $\alpha 6\beta 4$ -Integrin in Hemidesmosomen kann man in kultivierten Zellen an dem polarisierten Expressionsmuster erkennen. In diesem Fall liegen $\alpha 6$ und $\beta 4$ in Streifen und Punkten an der basalen Zellseite und bilden „tigerfellartige“ Muster (Borradori et al. 1997; Witkowski et al. 2000).

Integrine, die nicht an Matrixproteine gebunden sind, verteilen sich diffus auf der Zelloberfläche und scheinen keine Verbindung zum Zellgerüst zu haben. Erst die Bindung an einen extrazellulären Liganden führt zum „Clustern“ der Integrine in Fokaladhäsionen oder Hemidesmosomen. Die Verteilung der Integrine gibt also Hinweise auf das Verhalten der Zelle.

1.1.2.2 Signalübertragung

Integrine übertragen Informationen in die Zelle („outside-in signalling“) und aus ihr heraus („inside-out-signalling“) (Abbildung 1.3).

Bei Bindung an Liganden initiieren die Integrine „outside-in“-Signale. Diese Signale regulieren das Wachstum, die Differenzierung und die Beweglichkeit der Zellen, indem sie die Genexpression und Zytoskelettorganisation beeinflussen (Gonzales et al. 1999; Guo und Giancotti 2004; Zhou und Kramer 2005). Letztendlich entscheiden sie auch, ob die Zelle überhaupt überlebt oder in ein internes Selbstmordprogramm, die sogenannte Apoptose, übergeht. Die Unterbrechung der Zell-Matrix-Interaktion führt bei normalen Zellen zur Apoptose, da die Signalübertragung gestört ist. Allerdings ist dieser Mechanismus bei Tumorzellen häufig ausgeschaltet. Dies hängt unter anderem mit den Signalen zusammen,

welche die Integrine generieren. Integrine können dadurch die Apoptose entweder verhindern oder fördern (Frisch und Ruoslahti 1997; Grossmann 2002; Zahir et al. 2003).

„Inside-out“-Signale gehen von Effektoren im Zytoplasma aus. Sie modulieren die Affinität und Spezifität der Integrine zu ihren extrazellulären Liganden. Dies trägt zur Bindung, Ablösung und Migration der Zellen bei. Eine maligne entartete Zelle kann also mit Hilfe von Signaltransduktion selbst Einfluss auf die Tumorprogression ausüben (Hood und Cheresch 2002; Wilhelmsen et al. 2007).

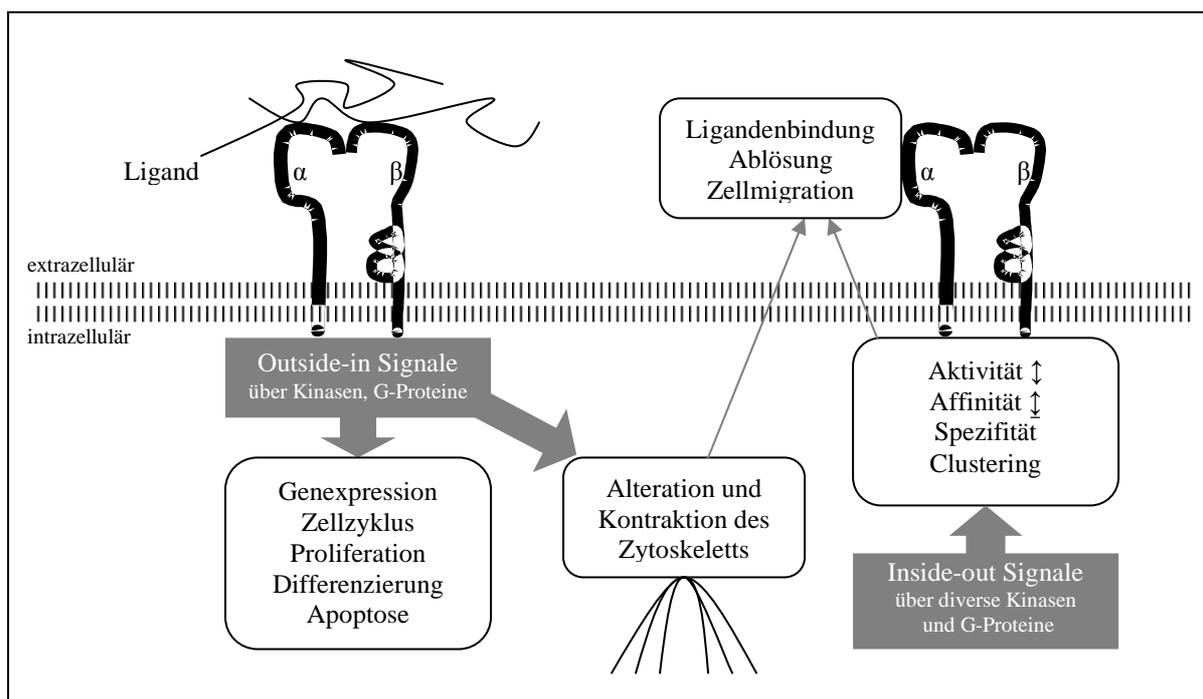


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung zu der wechselseitigen Beziehung zwischen Integrin, Signalkaskaden und dem Einfluss auf das Zellverhalten (Erläuterungen im Text)

1.1.2.3 Migration

Pseudopodien sind Ausläufer der Zellmembran, welche Zellen zur Migration verwenden. Es wird zwischen den hauchdünnen Filopodien und den etwas breiteren Lamellipodien unterschieden. Die initiale Ausstülpung von Pseudopodien ist integrinunabhängig. Die Pseudopodien schieben sich beispielsweise durch Lücken im Endothel oder in der Basalmembran. Um Kontraktionskraft zu entwickeln und sich in Richtung der Pseudopodien fortzubewegen, ist die Ausbildung von Bindungskontakten zu den Matrixproteinen erforderlich. Dies fällt in das Aufgabengebiet der Integrine. Sie stabilisieren auf mechanischem Weg und über Signalkaskaden den Zellausläufer, verhindern dessen Retraktion und tragen so zum

Migrationsprozess bei. Fehlen die Integrine, ziehen sich die Pseudopodien zurück. Letztendlich führt der systematische Auf- und Abbau von Integrinclustern zur Fortbewegung der Zelle (Chodniewicz und Klempe 2004).

Sollte es gelingen, durch exogene Agenzien Einfluss auf die Integrine auszuüben, wäre es denkbar, dass die Tumorzellen zu einem normalen Bindungsverhalten an die extrazelluläre Matrix animiert werden oder dass aufgrund fehlender Interaktion zwischen Zelle und Matrix die Apoptose induziert wird.

1.1.3 Integrinexpression in normaler und maligne veränderter Mundschleimhaut

Normales Mundschleimhautepithel exprimiert die Integrinuntereinheiten $\alpha 2^1$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$. In gesundem Epithelgewebe sind nur die basalen Zellen durchgehend positiv für die Integrine. Zusätzlich zeigen ein bis zwei suprabasale Schichten eine schwach positive Integrinexpression. Dies hängt vermutlich mit erhöhten Umbauraten in diesen Schichten zusammen. $\alpha 6$ und $\beta 4$ treten ausschließlich basal auf, d.h. im Bereich zwischen den Zellen und der Basalmembran. $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ finden sich sowohl basal als auch perizellulär, also zusätzlich in der Region der interzellulären Kontakte. Alle fünf genannten Integrine zeigen eine schwache zytoplasmatische Anfärbung.

In oralen Plattenepithelkarzinomen (oPECA) variiert die Integrinexpression erheblich zwischen verschiedenen Tumoren und innerhalb einzelner Areale derselben Tumoren. Einige Tumoren erinnern in ihrem Bild an normale Epithelien. Andere Tumoren zeigen Veränderungen in der zytoplasmatischen und perizellulären Färbung (Jones et al. 1993, Janes und Watt 2006).

Eine einfache Korrelation zwischen Integrinverlusten und Differenzierungsgrad kann bei den oralen Karzinomen nicht hergestellt werden: Jones und Watt (1993) beobachteten in den meisten Tumoren der Mundhöhle verminderte Integrinlevel. Hauptsächlich zeigten sich fokale Verluste von $\alpha 6$ und $\beta 4$ sowie die Verminderung von $\alpha 2$ und $\alpha 3$. Dagegen stellten Shinohara et al. (1999) fest, dass je undifferenzierter das Karzinom ist, umso mehr Integrine gebildet werden. Auch Carey et al. (1992) schlugen vor, dass eine höhere $\alpha 6\beta 4$ -Integrin-Expression mit einer früheren Rezidivrate einhergeht.

¹ Im weiteren Verlauf beziehen sich die Abkürzungen $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ auf die jeweiligen Integrinuntereinheiten.

1.1.3.1 Bedeutung einzelner Integrine

1.1.3.1.1 $\alpha 6\beta 4$ -Integrin

Die $\beta 4$ -Integrinuntereinheit wurde bisher nur in Assoziation mit $\alpha 6$ nachgewiesen und formt das $\alpha 6\beta 4$ -Heterodimer. Die $\alpha 6$ -Kette kann sich auch mit der $\beta 1$ -Untereinheit zusammenschließen und bildet einen $\alpha 6\beta 1$ -heterodimeren Rezeptor für Laminin-1 und -5 (Dogic et al. 1998). Dies betrifft hauptsächlich Karzinomzellen und deutet auf eine stärkere Malignität des Tumors hin (Davis et al. 2001; Chung und Mercurio 2004). Hauptbindungspartner des $\alpha 6\beta 4$ -Integrins ist das in der Basalmembran angereicherte Laminin-5. Dieses Integrin stellt daher den idealen Rezeptor zur Verbindung von Zytoskelett und Basalmembran dar (Kramer et al. 2005).

$\alpha 6\beta 4$ -Integrin zeichnet sich vor allem durch die zytoplasmatische Domäne der $\beta 4$ -Kette aus. $\beta 4$ unterscheidet sich aufgrund seiner Struktur und seiner Größe von 1000 Aminosäuren von den anderen Integrinuntereinheiten. $\alpha 6\beta 4$ -Integrin ist neben Bullösem Pemphigoid-Antigen (BP180, BP280) und HD-1/Plectin ein wichtiger Bestandteil von Hemidesmosomen. $\alpha 6\beta 4$ -Integrin bindet über HD1/Plectin an die Intermediärfilamente und ist entscheidend an der Formierung und dem Erhalt der Hemidesmosomen beteiligt. In ruhenden Keratinozyten vermitteln hemidesmosomal organisierte $\alpha 6\beta 4$ -Integrine die statische Bindung an die Basalmembran. Damit ist $\alpha 6\beta 4$ -Integrin essentiell für die Organisation der epithelialen Architektur (Mercurio und Rabinovitz 2001).

Zunehmend zeigt sich, welche wichtige Rolle $\alpha 6\beta 4$ -Integrin in der Tumorprogression spielt: Fokale $\alpha 6\beta 4$ -Integrin-Verluste in den basalen Zellen von Karzinomzellen der Mundschleimhaut gehen mit Lamininverlust in der Basalmembran einher, was die Migration von Tumorzellen erleichtert (Downer et al. 1993; Thorup et al. 1998; Hood und Cheresch 2002). Eine Ausweitung der ursprünglich rein basal polarisierten $\alpha 6$ -Expression in höhere Zellschichten steigert die Proliferation von oPECA (Owens et al. 2003). Außerdem beteiligt sich das $\alpha 6\beta 4$ -Integrin an der Migration, indem sich das Integrin in Zellausläufern von Karzinomzellen anordnet. Dabei assoziiert es entweder in Hemidesmosomen mit den Keratinfilamenten oder verschiebt sich in Fokaladhäsionen und verbindet sich dann mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts. Darüber bestimmt das $\alpha 6\beta 4$ -Integrin die Funktion der Pseudopodien (Rabinovitz und Mercurio 1997).

1.1.3.1.2 $\alpha 2\beta 1$ - und $\alpha 3\beta 1$ -Integrin

Die $\beta 1$ -Integrine verbinden die Zellen untereinander und mit dem Substratum. Sie erhalten den Zellverband und fördern die Proliferation. Durch Blockade der $\beta 1$ -Untereinheit mit einem Antikörper kann in vitro ein Zellverband aufgelöst und die Proliferation von Epithelzellen gehemmt werden (Larjava et al. 1990). Auch wenn die zellverbandsstabilisierende Funktion und die perizelluläre Lokalisation eine direkte Zell-Zell-Interaktion nahelegen, ist bisher keine unmittelbare Verbindung zwischen den $\beta 1$ -Integrinen nachgewiesen worden. Sie beteiligen sich allerdings an einem Zell-Zell-Adhäsionskomplex, der unter anderem Cadherine und verschiedene Signalmoleküle enthält (Chattopadhyay et al. 2003). Bei der Verbindung der Zellen mit der extrazellulären Matrix ordnen sich die $\beta 1$ -Integrine in Fokalkontakten an.

$\alpha 2\beta 1$ -Integrin wirkt hauptsächlich als Kollagenrezeptor, kann aber auch an Laminin binden (Carter et al. 1990). Zunehmend zeigt sich, dass $\alpha 2\beta 1$ -Integrin die Progression maligner Tumore fördert. Insbesondere beteiligt sich das Integrin an der epithelial-mesenchymalen Transition. Dabei verlieren Plattenepithelien ihre epithelialen Muster und bekommen ein spindelzelliges, fibroblastenähnliches Erscheinungsbild. Dies entspricht bei Tumoren einer Entdifferenzierung in proliferationsfreudigeres Gewebe, was die Heilungschancen betroffener Patienten deutlich verschlechtert. Die Antikörpergabe gegen $\alpha 2\beta 1$ -Integrin verhindert in vitro die epithelial-mesenchymale Transition (Boyer et al. 1996; Shield et al. 2007; Shintani et al. 2008). Darüber hinaus unterliegt die $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression östrogenen Einflüssen: Östradiolapplikation erhöht in den Milchdrüsen des Brustgewebes die $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Menge. Östradiol kann demzufolge die Zell-Matrix-Wechselwirkung modulieren (Iype et al. 2001).

Das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin bindet an verschiedene Matrixproteine, vor allem an Laminin-5. Besonders stark ist die Adhäsion an die Proteine, die von den Zellen selbst sezerniert wurden (Carter et al. 1990). Das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin nimmt eine zentrale Rolle in der Tumordinvasion ein. Es aktiviert verschiedene Signalkaskaden, welche die Ausbreitung und Proliferation der Zellen fördern (Kramer et al. 2005). Das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin vermittelt also sowohl Adhäsion als auch Migration. Beide Funktionen können zu erhöhter Malignität führen und durch Antikörper blockiert werden. $\alpha 3\beta 1$ - und $\alpha 6\beta 4$ -Integrine sind die einzigen Bindungspartner für Laminin-5. Die beiden Integrine erfüllen dabei unterschiedliche biologische Aufgaben. Ruhende Keratinozyten binden über $\alpha 6\beta 4$ -Integrin an Laminin-5. $\alpha 6\beta 4$ -Integrine versammeln sich dabei in Hemidesmosomen, welche die statische Bindung an die Basalmembran stabilisieren. Das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin befindet sich in dieser Phase in Kontakten zwischen den Zellen. Wenn die Keratinozyten einen migratorischen

Phänotyp entwickeln, konzentriert sich das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin in Fokalkontakten an der basalen Zellseite und vermittelt eine schnelle Bindung und Ausbreitung der Zellen. Die Hemidesmosomen sind hierbei zerlegt (Giannelli et al. 2002).

Abweichungen in der Funktionsfähigkeit, Affinität und Molekularstruktur der Integrine führen zu veränderter Zellmorphologie und Integrinexpression, was eine dezidierte Beurteilung unter dem Mikroskop ermöglicht.

1.2 Hormone und Östrogenrezeptor

Die Behandlung von Mundtumoren umfasst die chirurgische Sanierung, Strahlentherapie und Chemotherapie (Scully und Porter 2001). Bei der Bekämpfung von Brustkrebs sind Erfolge durch Anwendung von Antihormonen erzielt worden. Schwerpunktmäßig finden Substanzen Einsatz, welche die Östrogeneffekte blockieren, da Östrogene bei östrogenrezeptorpositiven Mamma-Karzinomen als wachstumsfördernd gelten (Osborne et al. 2000). Nachdem Östrogene auch die Expression von Integrinen modulieren (Iype et al. 2001), erschien es sinnvoll, die Wirkung von Östrogenen und Antiöstrogenen auf Tumoren der Mundschleimhaut anhand der Integrinexpression zu untersuchen.

1.2.1 Die Wirkung von Östrogenen auf die Mundschleimhaut

Östrogene sind Geschlechtshormone, die in den Ovarien der Frau und geringfügig in den Hoden des Mannes gebildet werden (Pschyrembel 1998). Die traditionelle Theorie besagt, dass Östrogene über die Bindung an nukleare Östrogenrezeptoren („estrogen receptor“ = ER) im Zellkern wirken. Der ER durchläuft Konformationsänderungen und lagert sich an „estrogen-response-elements“ (ERE) in der DNA an. Dies verstärkt die Transkription östrogensensitiver Gene und die Synthese von Proteinen (Translation) (Howell 2006). Auf diese Weise werden beispielsweise Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle oder Signalproteine synthetisiert. Über Jahrzehnte hinweg ging man von der Existenz lediglich eines ERs aus. Der sogenannte Östrogenrezeptor- α (ER α) kommt hauptsächlich in Organen des Fortpflanzungssystems vor. 1995 wurde dann ein zweiter Östrogenrezeptor entdeckt. Dieser Östrogenrezeptor- β (ER β) ist vor allem in nicht-reproduktiven Organen nachweisbar. Die Existenz zweier Östrogenrezeptoren bietet Erklärungsmöglichkeiten für die zell- und gewebespezifischen Wirkungsweisen verschiedener Pharmaka (Kuiper et al. 1998).

Östrogene scheinen das Milieu der Mundhöhle zu beeinflussen. In der Menopause, in welcher physiologisch der Östrogenspiegel im Blut absinkt, berichten Frauen gehäuft über Brennen, Trockenheit und andere Missempfindungen im Mundbereich. Diese Beschwerden lassen sich durch Hormonersatztherapien lindern oder beseitigen (Forabosco et al. 1992). Ist die Mundschleimhaut atrophisch, wird sie durch die lokale Auftragung von Östradiol reaktiviert (Felgentreff et al. 1980). Anders ist die Situation in der Schwangerschaft, in der der Östrogenspiegel im Blut und im Speichel erhöht ist. Hier zeigen sich häufig hyperplastische Zahnfleischveränderungen (Beck 1977). Dies deutet darauf hin, dass Östrogene einen proliferationsfördernden Effekt auf die Zellen der Mundschleimhaut haben. Wirkorte für die Östrogene in der oralen Mucosa könnten die ER sein, welche aufgrund eines positiven mRNA-Nachweises in gesunder Mundschleimhaut zu finden sind (Leimola-Virtanen et al. 2000).

Verstärkte Stimulation durch Östrogen kann die Proliferation von ER-positiven epithelialen Tumoren begünstigen (Osborne et al. 2000). Zur unterstützenden Behandlung östrogenabhängiger epithelialer Tumore, wie Mamma- und Uteruskarzinome, wurden Substanzen entwickelt, die die östrogene Wirkung blockieren: Antiöstrogene. Sie binden kompetitiv oder nicht-kompetitiv an Östrogenrezeptoren und modulieren dessen Aktionen. Daher hat sich der Begriff selektiver Östrogenrezeptormodulator („selective estrogen receptor modulator“ = SERM) etabliert. Sie können steroidal (ICI 162,780) und nicht-steroidal (Tamoxifen) Ursprungs sein. Abhängig von der Spezies, dem Gewebe und der Dosis arbeiten Antiöstrogene bzw. SERMs östrogenagonistisch oder –antagonistisch (Osborne et al. 2000; Howell 2006).

Bekanntestes Beispiel für diese entgegengesetzten Effekte auf den Östrogenrezeptor ist das Tamoxifen.

1.2.1.1 Tamoxifen

Das nicht-steroidale Triphenylethylen Tamoxifen (Nolvadex®) findet seit über 30 Jahre Anwendung in der Behandlung von ER-positivem Brustkrebs (Furr und Jordan 1984). Ursprünglich bestand die Annahme, dass Tamoxifen seine antitumoröse Wirkung über die kompetitive Bindung und Blockade des Östrogenrezeptors entfaltet. Dabei antagonisiert Tamoxifen die östrogenvermittelte Transkription wachstumsregulierender Gene, unterbricht den Zellzyklus und wirkt zytostatisch (Osborne et al. 2000).

Allerdings ist Tamoxifen ein gemischter Östrogenagonist-Antagonist: In Abhängigkeit von Spezies, Gewebe und Zelltyp wirkt Tamoxifen über den ER α partiell östrogenagonistisch. Dies führt zu einem leichten Anstieg von Endometriumhyperplasien und Thromboembolien unter Tamoxifenbehandlung (Jordan 2004). Rein östrogen-antagonistisch wirkt Tamoxifen über den ER β (Paech et al. 1997; Kim et al. 2007).

Da Tamoxifen auch die Proliferation ER-negativer Tumore hemmt, müssen ER-unabhängige Wirkmechanismen existieren. Diese umfassen unter anderem die Inhibition von Proteinkinase C und Phosphodiesterasen, welche die Zellproliferation und Sekretion von Wachstumsfaktoren stimulieren. Außerdem fördert Tamoxifen die Sekretion von „transforming growth factor β 1“ (TGF- β 1) – ein Polypeptid, welches für seine wachstumshemmenden Eigenschaften in vielen Zelltypen bekannt ist (Kim MJ et al. 2007). Insgesamt existieren verschiedene Signalwege, über die Tamoxifen den Zellzyklus blockiert und die Apoptose induziert (Mandlekar und Kong 2001; Kim et al. 2007).

Kopf-Hals-Tumoren betreffend konnte nachgewiesen werden, das Tamoxifen wachstumshemmend und apoptoseinduzierend wirkt. Zudem erhöht Tamoxifen in oPECA-Zellen die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika (Hoffmann et al. 2002; Tavassoli et al. 2002; Kim et al. 2007).

1.2.1.2 ICI 182,780

ICI 182,780² ist ein Derivat von Östradiol und blockiert den ER komplett, indem es die Dimerisierung des ER und die ER-Bindung an ERE verhindert, die ER-vermittelte Transkription hemmt und zur Degradierung des ER beiträgt (Howell 2006). ICI hemmt über 90% der östrogenregulierten Gene (Frasor et al. 2004). Im Gegensatz zu Tamoxifen unterbricht ICI auch die Aktivierung des ER durch andere Signalmoleküle als Östrogen, wie z. B. durch EGF („epidermal growth factor“). Zudem reduziert ICI die Menge an ER, so dass die Ausbildung einer Hormonresistenz umgangen wird (Hutcheson et al. 2003). Insbesondere postmenopausale Patientinnen mit fortgeschrittenen Tamoxifen-resistenten Brusttumoren profitieren von einer Behandlung mit ICI (Chia et al. 2008).

Aufgrund des Wirkmechanismus wird in allen Geweben von einer antiöstrogenen Wirkung ausgegangen. Inwieweit ICI auf Tumorzellen des Mundbodens antiöstrogen wirkt, ist bislang ungeklärt.

² Imperial Chemical Industries 182,780, Faslodex®, Fulvestrant®, Abkürzung: ICI

Die Beobachtung der tumorhemmenden Wirkung bei anderen Tumorerkrankungen gab den Anlass zur Untersuchung von Östrogenantagonisten bei Mundtumoren.

2 Zielstellung

Während der letzten fünfzig Jahre lag die Fünfjahresüberlebensrate von Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches nahezu unverändert bei 50 %. Die hohe Mortalität ist dabei auf die Unkontrollierbarkeit des Primärtumors und der lokalen Metastasen (Scully und Felix 2006). Der chirurgischen Therapie sind wegen der Nähe zu essentiellen anatomischen Strukturen Grenzen gesetzt, so dass der Wunsch nach systemischen Behandlungsverfahren groß ist.

In östrogenrezeptorpositiven Tumorarten wie Mamma- und Ovarialkarzinomen findet die Anti-Hormontherapie erfolgreich Anwendung (Osborne et al. 2000). Die Entdeckung von Östrogenrezeptor-mRNA in Tumoren der Mundhöhle legt die Hoffnung nahe, auch bei dieser Krebsart den Verlauf mit Hormonen oder Antihormonen beeinflussen zu können. So können Antiöstrogene als adjuvantes Therapeutikum die Invasivität von oPECA mindern, die Resistenzentwicklung verzögern und die Chemoreaktivität verstärken (Kim et al. 2007).

Hormone nehmen Einfluss auf die Integrinexpression (Iype et al. 2001). Integrine spielen wegen ihrer Zell-Zell- und Zell-Matrix-bindenden Funktion eine entscheidende Rolle bei der Abkopplung und Anheftung von Zellen und im Prozess der Karzinogenese epithelialer Tumore. Die vorliegende Dissertation untersucht den Einfluss verschiedener Therapeutika auf die Integrinexpression anhand dreier Zelllinien aus rezidivierenden oralen Plattenepithelkarzinomen einer Patientin (UM-SCC-14A¹, -14B, -14C).

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde überprüft, in welcher Weise Hormone und Antihormone auf die Integrinexpression von $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ wirken. Hiermit sollten eventuelle Einflüsse auf die Pathogenese von Tumoren der Mundschleimhaut aufgezeigt werden. Dazu wurde untersucht,

1. ob Östrogen, sein Partialantagonist/-agonist Tamoxifen und sein hochaffiner Antagonist ICI die $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 4$ -Integrinexpression beeinflusst im Sinne einer Veränderung der Integrinmenge oder der Integrinverteilung,
2. ob es unter verschiedenen Östrogen-, Tamoxifen- und ICI-Konzentrationen zu unterschiedlichen Integrinexpressionsmustern kommt.

¹ Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird auf die Ausschreibung UM-SCC-14A-Zellen, UM-SCC-14B-Zellen und UM-SCC-14C-Zellen verzichtet und die Abkürzung 14A (-Zellen), 14B (-Zellen) und 14C (-Zellen) verwendet.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Lösungen, Chemikalien und Kits

Lösungen/Chemikalien/Kits	Hersteller
D- MEM / F 12 mit Phenolrot (Dulbecco's modified Eagle's Medium/F12 mit L-Glutamin, 15 mM HEPES Buffer)	Gibco BRL, Paisley, Scotland Cat. 31330 – 038
D- MEM / F 12 ohne Phenolrot (Dulbecco's modified Eagle's Medium/F12 mit L-Glutamin, 15 mM HEPES Buffer)	Gibco BRL, Paisley, Scotland Cat. 11039 – 021
17 β -Estradiol (Östradiol)	Sigma, Steinheim, D ¹ , Cat. E-4389
Fetal Bovine Serum (fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin, D Cat. S 0115, Lot 1061 EE
Fetal Bovine Serum (fetales Kälberserum) hormonfrei, kohlebehandelt	Biochrom, Berlin, D Cat. S 3113, Lot 571 B
Glycine	Merck, Darmstadt, D, Cat. 1.04201.1000
HBSS	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, D Cat. 14025-050
HEPES 1M ohne Phenolrot	Biochrom, Berlin, D, Cat. L1613
ICI 182,780	Tocris/BioTrend, Bristol, UK, Cat. 1047
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Steinheim, D, Cat. P-6148
Penicillin 10000 U / Streptomycin 10000 μ g/ml	Biochrom, Berlin, D Cat. A2213
PCR-Mycoplasmenkit VenorGem	Minerva Biolabs, Berlin, D
Tamoxifen Citrate	Tocris/Biotrend, Bristol, UK, Cat. 0999
Triton X 100	Merck, Darmstadt, D, Cat. 1.08603.1000
Ziegenerum	Dako, Glostrup, Dänemark Cat. X 0907, Lot. 019 (201)

¹ D = Deutschland

3.1.2 Antikörper

Tabelle 3.1 Primärantikörper

Antigen	Hersteller Cat.	CD-Nr.	Klon	Spezies	Original- konzentration	Verdünnung
Integrin $\alpha 2$	Immunotech, Marseille, Frankreich Cat. 0717, Lot 11	CD 49b	GI 9	Maus IgG1-kappa	0,2 mg/ml	1:100
Integrin $\alpha 3$	Calbiochem Oncogene Research, Schwalbach, D Cat. CP11L, Lot D01258-3	CD 49c	P1B5 (Q193)	Maus IgG1-kappa	0,1 mg/ml	1:100
Integrin $\alpha 6$	Immunotech, Marseille, Frankreich Cat. 0769, Lot 21	CD 49f	GoH3 Q107 Q193	Ratte IgG2a	0,2 mg/ml	1:100
Integrin $\beta 1$	Immunotech, Marseille, Frankreich Cat. 1151, Lot 06	CD 29	K20 Q193	Maus IgG2a	0,2 mg/ml	1: 100
Integrin $\beta 4$	Biomol, Hamburg, D Cat. A054, Lot 2703		<i>3E1</i> <i>Q193</i>	Maus IgG1	100 μ l Aszitis	1:500
Kontrolle Maus	Dako, Glostrup, Dänemark Cat. Z0259, Lot 067			Maus Ig	3,5 mg/ml	1:100
Kontrolle Ratte	Dako, Glostrup, Dänemark Cat. Z0455, Lot 119			Ratte Ig	6,2 mg/ml	1:100

Tabelle 3.2: Sekundärantikörper

Anti- körper	Hersteller Cat.	Konjugat	Spezies	Original- konzentration	Verdünnung
Anti- Maus	Dianova, Hamburg, D Cat. 115-096- 062 Lot 43108	FITC	Ziege IgG (H+L)	1,5 mg/ml	1:100 ($\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 4$ -Integrin, Kontrolle Maus) 1:50 ($\alpha 2$ - Integrin)
Anti- Ratte	Sigma, Steinheim, D Cat. F 1763 Lot 28H4834	FITC	Ziege IgG (absorbed with hu IgG)	4,1 mg/ml	1:100 ($\alpha 6$ - Integrin, Kontrolle Ratte)

Zusammensetzung der Versuchslösungen:

10%iger Blockpuffer (zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen):

PBS mit Zusatz von 10%igem Ziegenserum und 10%igem 1 Mol Glycine

1%iger Blockpuffer (zur Verdünnung der Antikörperlösungen):

PBS mit Zusatz von 1%igem Ziegenserum und 1%igem 1 Mol Glycine

3.1.3 Geräte/Materialien

Gerät/Material	Hersteller
Arbeitsbank Laminar Air Flow Class 100	Gelman Instruments, Mailand, Italien
Brutschrank	Heraeus, Hanau, D
Deckgläschen	Menzel, Braunschweig, D
Dia-Film, Kodak Select Series, 35mm, Elite Chrome, 400 ASA, Cat. 377 5681	Kodak, Rochester, USA
Dia-Bearbeitungssoftware PolaColor Insight	Polaroid, Cambridge, USA
Mikroskop-Kamera-Aufsatz Axiophot, Filmkassette 35 mm Mot	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Photomikroskop Axiophot	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Zellkulturschalen	BD, Heidelberg, D
Zentrifuge Hettich Rotanta/TRC, Typ 4401	Hettich, Tuttlingen, D

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Für die in vitro Untersuchungen fanden drei etablierte Plattenepithelkarzinomzelllinien des Mundbodens Anwendung. Die Zelllinien UM-SCC¹ 14A, 14B und 14C stellte Prof. T. E. Carey² freundlicherweise zur Verfügung. Sie stammen aus Lokalrezidiven des Mundbodenkarzinoms einer Patientin (Tabelle 3.3). Sie stellen somit die Progression eines Tumors nach unterschiedlichen Behandlungen dar. Unter dem Gesichtspunkt, dass erkrankte Frauen ohne Risikofaktoren eine schlechtere Prognose bei der Behandlung aufweisen als Männer, erschien die Untersuchung innovativer Beeinflussungsmöglichkeiten an weiblichen Zelllinien sinnvoll.

Tabelle 3.3: Charakterisierung der Zelllinien (Lansford et al. 1999; Carey 1994)

Zelllinie	Patientin	Angaben zum Primärtumor	Differenzierungsgrad	Herkunft
UM-SCC 14A	58 Jahre	Plattenepithelkarzinom des Mundbodens (T1N0M0) Tumorstadium I	Wenig bis moderat-gut differenziert	Lokalrezidiv nach einer Operation und Radiatio
UM-SCC 14B	59 Jahre		Wenig differenziert	Lokalrezidiv nach einer weiteren Operation und Radiatio
UM-SCC 14C	59 Jahre		Wenig differenziert	Lokalrezidiv nach Chemotherapie

3.2.1.1 Versuchsansatz

Die Zellen vermehrten sich adhärent in Zellkulturschalen in einem Brutschrank, der folgende Konditionen aufwies: Die Temperatur betrug 37°C und die Luftfeuchtigkeit 95% bei einem CO₂-Gehalt von 5%. Die Subkultivierung der Zellen fand 72 Stunden vor Versuchsbeginn statt. Die Passagierungsverdünnung war aus den Vorversuchen bekannt und so gewählt, dass am

¹ University of Michigan Squamous Cell Carcinoma, Angaben zur Etablierung und Charakterisierung der Zelllinien finden sich in den Beschreibungen von Krause et al. (1981) und Lansford et al. (1999)

² University of Michigan, Ann Arbor, USA

Versuchstag eine Zelldichte von ca. 80 – 90% erreicht wurde. In die Kulturschalen wurden autoklavierte Deckgläschen gelegt, auf denen die Zellen haften und sich vermehren sollten. Am Versuchstag konnten die Deckgläschen mit den adhären Zellen dann getrennt behandelt und untersucht werden.

Als Nährmedium diente D-MEM/F12 mit Phenolrot und Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin. Für ein optimales Wachstum der Zellen wurde dem Kulturmedium 10% fetales Kälberserum (FKS) beigemischt. Seren können eine geringe Menge an Hormonen aufweisen. Für den Versuch wurde daher eine mit Hormonen und Antihormonen niedrig dosierte FKS-Charge von Biochrom verwendet. Das Phenolrot war im Wachstumsmedium als pH-Indikator enthalten. Um den schwach östrogenen Einfluss von Phenolrot (Berthois Y et al. 1986; Moreno-Cuevas JE und Sirbasku DA 2000) so gering wie möglich zu halten, wurde 22 Stunden vor Versuchsbeginn das phenolrothaltige Kulturmedium ersetzt durch D-MEM/F12 ohne Phenolrot mit Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin und 10% kohlebehandeltem, hormonfreiem FKS. Zwei Stunden vor Versuchsanfang wurde das Wachstumsmedium gegen identisch zusammengesetztes Medium unter Verzicht auf das hormonfreie FKS ausgetauscht, um serumfrei zu arbeiten.

Sämtliche Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Arbeitsbank gemäß den Standardprotokollen der Zellkultur (Lindl und Bauer 1994).

Um vergleichbare biologische Eigenschaften der Zellen zu gewährleisten, fanden bei den Versuchen nur die Passagen 10 bis 15 Anwendung. Zum Ausschluss einer Mycoplasmenkontamination wurden sämtliche Zelllinien mit dem PCR-Mycoplasmenkit VenorGeM untersucht.

3.2.1.2 Hormonbehandlung

Die Auswahl der in den Versuchen verwendeten Hormonverdünnungen orientierte sich an den Größenordnungen der klinischen Anwendung und den Ergebnissen früherer Studien. Danach war bei einer Tamoxifenkonzentration über 10 μM mit einer nahezu 100%igen Apoptoserate der Zellen zu rechnen. In der klinischen Anwendung ließen sich innerhalb solider Tumore Konzentrationen von 1 μM und 5 μM erreichen (Hoffmann et al. 2002). ICI-Dosierungen zwischen 0,1 und 10 μM führten zu einer 100%igen Blockade der Östrogenrezeptoren (Rosenberg Zand et al. 2000).

In Anlehnung an diese Erkenntnisse wurden Östradiol, Tamoxifen und ICI aus einer vorbereiteten Stocklösung jeweils auf eine Endkonzentration von 1 μM bzw. 5 μM im

Kulturmedium verdünnt und den zu behandelnden Zellschalen beim Mediumwechsel 22 Stunden sowie zwei Stunden vor Versuchsbeginn zugegeben. Diese Angaben illustriert Tabelle 3.4.

Als Kontrolle diente eine unbehandelte Zellschale, die bei jedem Versuch mitgezüchtet und bewertet wurde. Diese Zellschale wurde in gleicher Weise bearbeitet wie die übrigen Zellschalen, allerdings ohne Zusatz von Therapeutika.

Tabelle 3.4: Östradiol und Antiöstrogene

Hormon	Herstellung der Stocklösung	Anwendung
17 β -Estradiol (Östradiol)	50 mg 17 β -Estradiol + 36,7 ml Aqua dest. → 5 mM	2 μ l Stocklösung + 10 ml Kulturmedium ¹ → 1 μ M
		10 μ l Stocklösung + 10 ml Kulturmedium ¹ → 5 μ M
ICI 182,780 (ICI)	10 mg ICI 182,780 + 3,29 ml 100% Ethanol → 5 mM	2 μ l Stocklösung + 10 ml Kulturmedium ¹ → 1 μ M
		10 μ l Stocklösung + 10 ml Kulturmedium ¹ → 5 μ M
Tamoxifen Citrate (Tamoxifen)	100 mg Tamoxifen Citrate + 35,48 ml 100% Ethanol → 5 mM	2 μ l Stocklösung + 10 ml Kulturmedium ¹ → 1 μ M
		10 μ l Stocklösung + 10 ml Kulturmedium ¹ → 5 μ M

¹Kulturmedium: phenolrotfreies DMEM/F12 mit bzw. ohne hormonfreies fetales Kälberserum

3.2.2 Immunfluoreszenz

3.2.2.1 Prinzip

Zur Beurteilung der Menge und Verteilung der Integrine fand ein semiquantitatives Nachweisverfahren Anwendung: die Fluoreszenzmethode. Die Immunfluoreszenztechnik basiert auf einer empfindlichen Immunreaktion zur Darstellung intra- und extrazellulärer Antigene und Antikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop. Hierzu werden spezifische Antikörper gebraucht, die mit dem Fluorochrom Fluoresceinisothiozyanat (FITC) beladen sind. Diese binden in vitro direkt oder indirekt spezifisch an Strukturen von Zellen oder Gewebe. In den vorliegenden Untersuchungen wurde die indirekte Immunfluoreszenz verwendet, da die Sensitivität gegenüber der direkten Methode fünf bis zehn Mal höher ist. Der FITC-gekoppelte sekundäre Antikörper bindet die Primärantikörper. Letztere erkennen spezifisch die Integrine (Abbildung 3.1). Es handelt sich um ein qualitatives Verfahren, da die Menge der ausgesendeten Fluoreszenzsignale

unter dem Mikroskop nicht in konkreten Zahlenwerten messbar ist. Semiquantitativ kann die Intensität der Leuchtsignale bewertet werden (Ueki und Yaoita 1991).

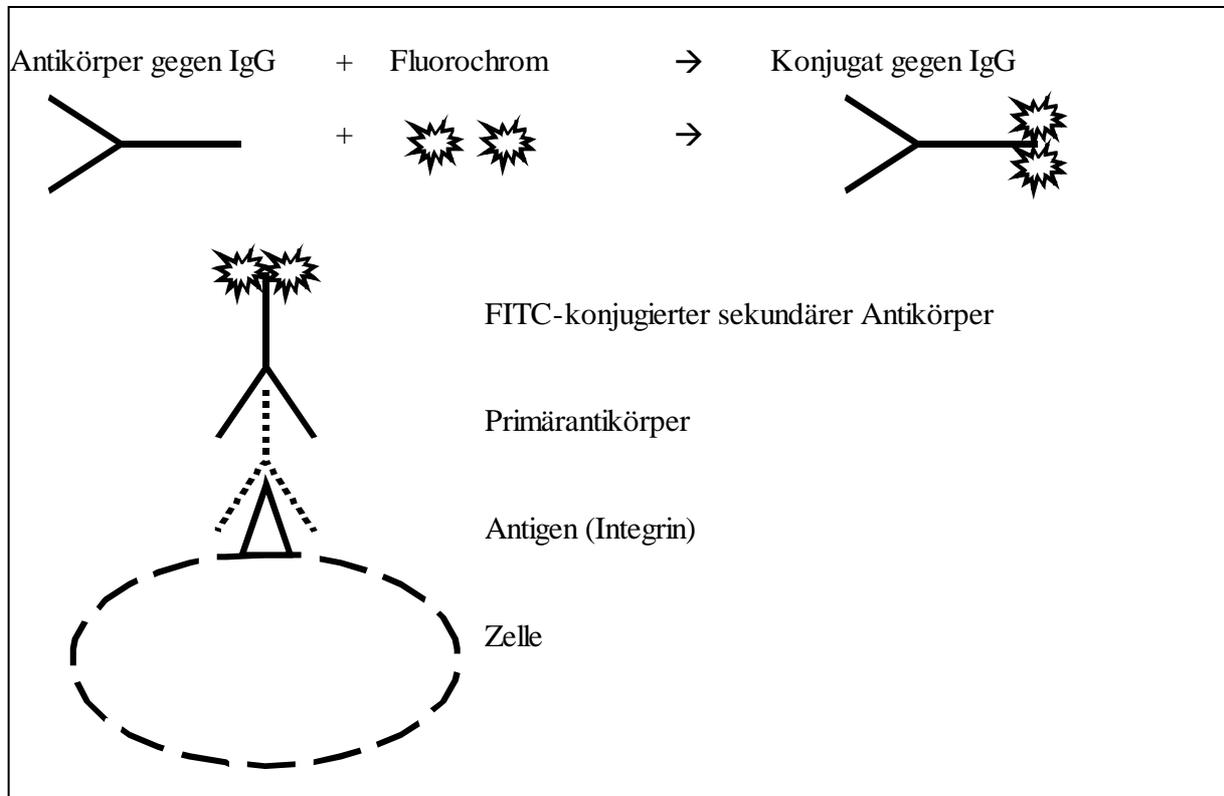


Abbildung 3.1: Indirekte Immunfluoreszenz (mit freundlicher Genehmigung von Ueki und Yaoita 1991, Fig. 3)

3.2.2.2 Antikörper

Für die Visualisierung der Integrinexpression auf den Zellen wurde, wie bereits erwähnt, die indirekte Immunfluoreszenzfärbung gewählt. Als Primärantikörper kamen monoklonale Antikörper gegen die Integrinuntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ zum Einsatz (Tabelle 3.1). Zur Negativkontrolle dienten Maus- und Ratten-Immunglobuline. Mit diesen Kontrollantikörpern wurden die Autofluoreszenz der Zellen und die Fluoreszenz, die durch unspezifische Antikörperbindung entsteht, überprüft. Die FITC-konjugierten Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus IgG waren gegen die Antigene der Primärantikörper gegen $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 4$ und die Negativkontrolle Maus gerichtet. Der Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte IgG erkannte die Antigene der Primärantikörper gegen $\alpha 6$ und die Negativkontrolle Ratte (Tabelle 3.2). Die Einsatzkonzentrationen der Antikörper wurden in Vorversuchen ausgetestet. Zur Verdünnung

der Antikörper diente 1%iger Blockpuffer, der aus PBS mit Zusatz von 10%igem Ziegenserum und 10%igem 1 Mol Glycine bestand.

3.2.2.3 Versuchsaufbau

Innerhalb einer dreitägigen Vermehrungszeit wuchsen die Zellen auf den Deckgläschen zu subkonfluenten Monolayern heran. Dies wurde am Versuchstag lichtmikroskopisch überprüft. Daraufhin erfolgten sämtliche Versuchsschritte an den Zellen, die auf den Deckgläschen hafteten. Die Zellen wurden folgenden Vorbehandlungen unterzogen:

- 1.) Sie wurden zweimal mit handwarmem PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen und Zelltrümmer zu entfernen,
- 2.) für 30 Minuten mit 1% Paraformaldehyd auf HBSS mit Zusatz von 1% 1 Mol Hapes fixiert,
- 3.) drei Minuten mit 0,3% Triton X 100 auf PBS inkubiert, um die Zellmembranen zu permeabilisieren,
- 4.) luftgetrocknet,
- 5.) mit PBS befeuchtet,
- 6.) in die feuchte Kammer überführt,
- 7.) 30 Minuten mit 10% Blockpuffer (PBS mit Zusatz von 10%igem Ziegenserum und 10%igem 1 Mol Glycine) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen,
- 8.) dreimal mit PBS gewaschen,
- 9.) eine Stunde in den Primär-Antikörper-Lösungen belassen,
- 10.) dreimal in PBS gespült,
- 11.) 30 Minuten den Sekundär-Antikörper-Lösungen ausgesetzt,
- 12.) dreimal in PBS und zweimal in Aqua dest. gewaschen, um die Gefahr von Kristallbildungen beim Eindecken zu verringern,
- 13.) auf Objektträgern in Prolong Antifade Eindeckmedium eingedeckt,
- 14.) über Nacht getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt.

3.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

3.2.3.1 Prinzip

Fluoreszenz ist die Eigenschaft, Energie aufzunehmen und in einer höheren Wellenlänge in Form von Licht abzugeben. Voraussetzung hierfür ist die Anregung der Moleküle auf ein höheres Energieniveau durch eine für jedes Fluorochrom spezifische Wellenlänge aus einer externen Energiequelle, wie beispielsweise einer Quecksilberlampe oder einem Argon-Laserstrahl. In einer als „Stokes Shift“ bezeichneten Reaktion springen die Fluoreszenzmoleküle von dem angeregten Energieniveau herunter und geben elektromagnetische Strahlung höherer Wellenlänge ab (Herman 1998). FITC ist ein Derivat des Fluoreszeins, das von einer Wellenlänge von 495 nm angeregt wird und gelb-grüne Fluoreszenz der Wellenlänge 528 nm aussendet (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Dieser Vorgang, der sich bei FITC ca. 30000 Mal wiederholt, wird für die Betrachtung unter dem Immunfluoreszenzmikroskop benutzt (Abbildung 3.2) (Herman 1998).

Die Fluoreszenzmikroskopie kam in dem Versuch in erster Linie zum Einsatz, weil sie hervorragend geeignet ist, Proteine in der Zelle zu lokalisieren (Alberts 1995). Eine Quecksilberlampe diente als Energiequelle und regte die fluoreszierenden Konjugate an, die an die Sekundärantikörper gekoppelt waren.

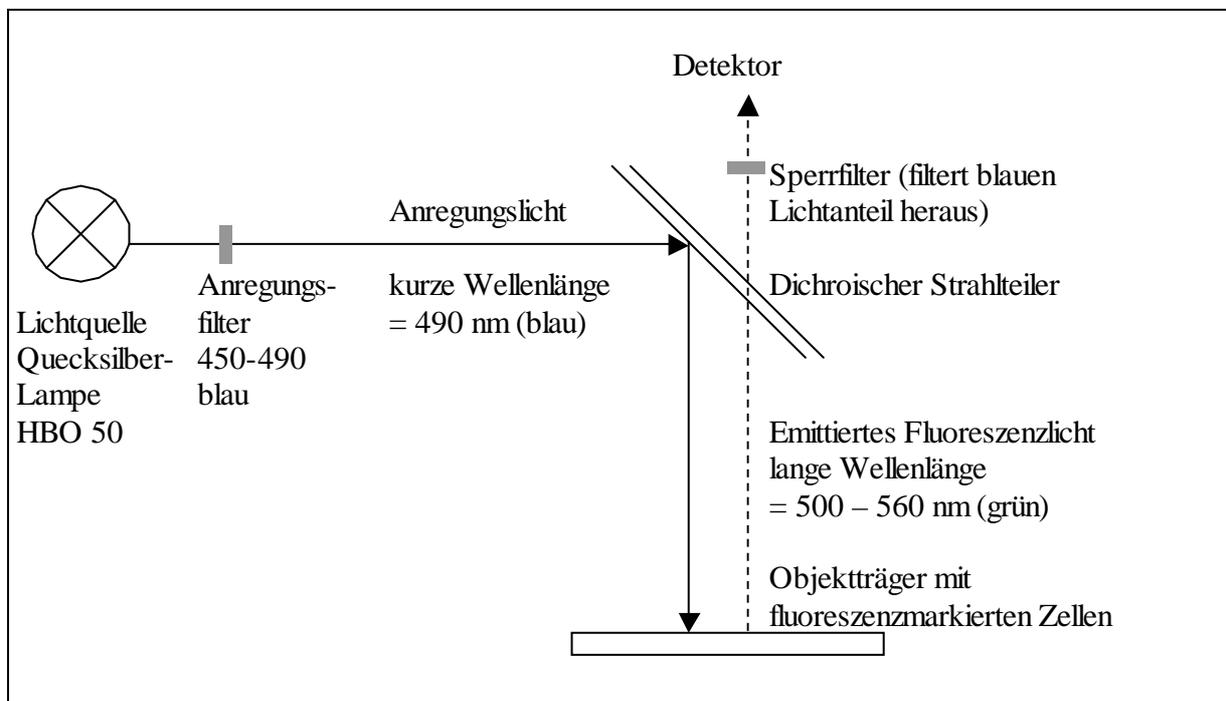


Abbildung 3.2: Aufbau des Fluoreszenzmikroskops: Filterschema für die Betrachtung von FITC-markierten Zellen (mit freundlicher Genehmigung von Herman 1998, Seite 21, Fig. 2.5)

Der wichtigste Bestandteil des Mikroskops ist der dichroische Strahlteiler, welcher die kurzwelligen Strahlen (<510 nm) des Anregungslichtes von der Lichtquelle zum Objektiv und Objektträger reflektiert, wohingegen er die ausgesendeten Fluoreszenzstrahlen längerer Wellenlänge über 510 nm zum Betrachter oder zur Kamera durchlässt. Ein Sperrfilter absorbiert das Licht mit der Anregungswellenlänge, d.h. das blaue Licht. Die Sensitivität der Methode ist sehr hoch, da nur die in der zulässigen Wellenlänge ausgesandten Strahlen als leuchtende Punkte wahrgenommen werden (Herman 1998).

3.2.3.2 Durchführung

Die Auswertung der angefärbten Zellen erfolgte mit dem Photomikroskop „Axiophot“ von Carl Zeiss. Hierfür wurden die gesamten Präparate in 10-, 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung betrachtet und lammellenförmig durchgearbeitet. Dabei wurde eine Einschätzung zur Fluoreszenzintensität der angefärbten Zellen und zur Lage der Leuchtsignale vorgenommen. Die Intensität der Fluoreszenzsignale nimmt proportional der Menge exprimierter Integrinketten zu. Daraus ergibt sich eine semiquantitative Beurteilungsskala (Abbildung 3.3). Die Lokalisation der Fluoreszenzpartikel entspricht der Lage der Integrinketten an der Zelle. Die Auswertung orientierte sich an Abbildung 3.4.

Die aus den Präparaten gewonnenen Ergebnisse wurden durch zwei unabhängige Untersucher bezüglich ihrer Übereinstimmung im Sinne eines Blindversuchs verglichen. Ausschnitte, welche das charakteristische Bild des Präparates wiedergaben, wurden mit dem Mikroskop-Kamera-Aufsatz Axiophot in Form von Dias aufgenommen. Das Kamerabedienpult wählte nach Eingabe der konstanten Funktionsparameter (Tabelle 3.5) die Belichtungszeit automatisch. Zur weiteren Dokumentation wurden die entwickelten Dias schließlich eingescannt und einheitlich bearbeitet.

Tabelle 3.5: Grundeinstellungen der Fluoreszenzmikroskop-Kamera

RECI-Wert	6
Exposure Adjustment	-2
ASA	400

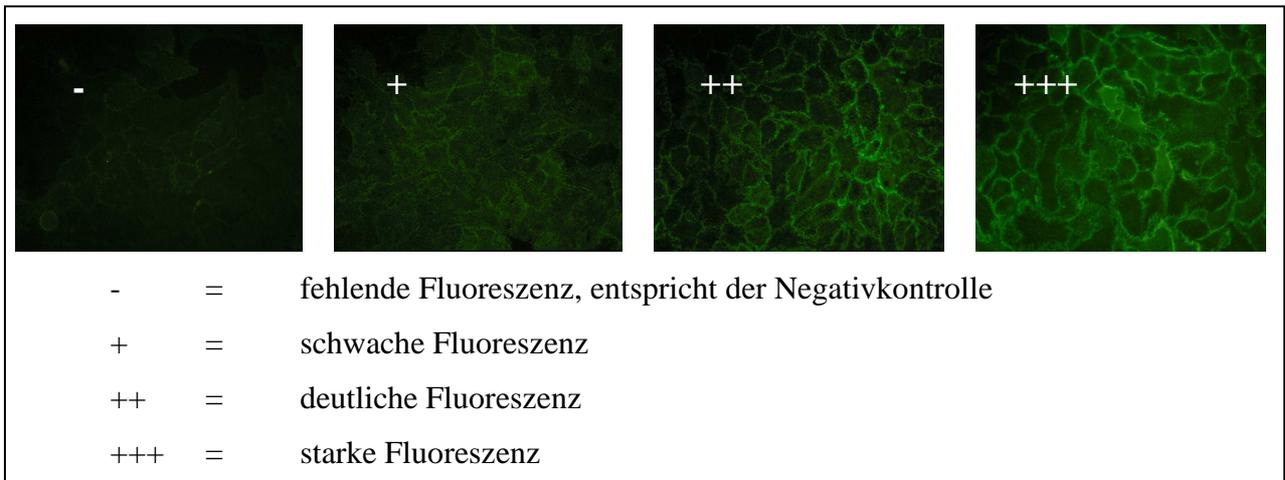


Abbildung 3.3: Bewertung der Fluoreszenzintensität in einer vierstufigen semiquantitativen Beurteilungsskala

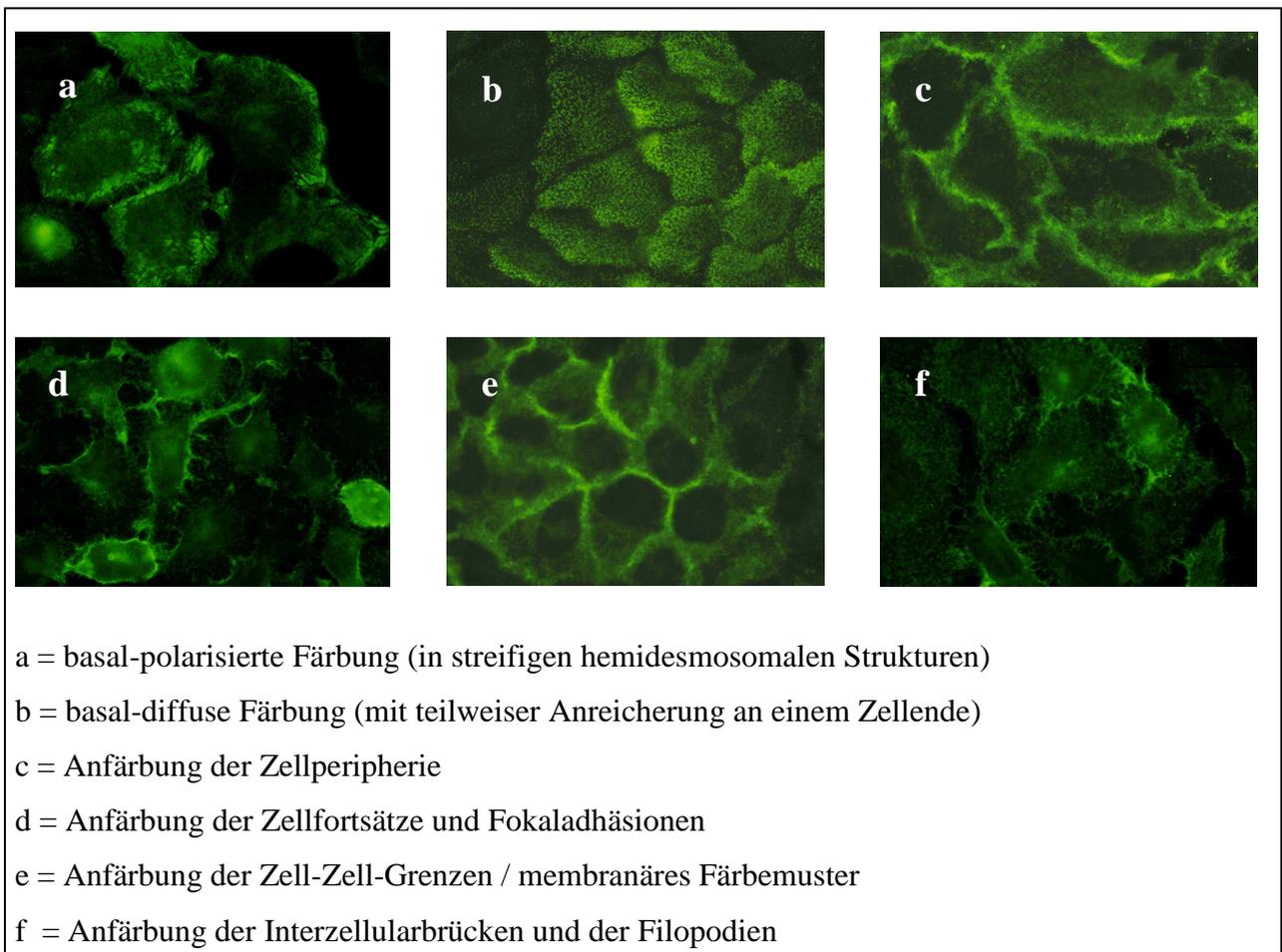


Abbildung 3.4: Bewertung der Lokalisation der Fluoreszenzsignale

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Zelllinien (14A, 14B und 14C) eines rezidivierenden Mundbodenkarzinoms untersucht, ob das Östrogen 17- β -Estradiol (Östradiol), der Östrogenrezeptorantagonist ICI 182,780 (ICI) und der selektive Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen die Expression der Integrinuntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ beeinflussen. Die Anwendung der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie erlaubte die qualitative und semiquantitative Analyse der Ausprägung und Verteilung von Integrinen aufgrund von fluoreszierenden Signalintensitäten. Die Versuche wurden für jede Integrinuntereinheit drei Mal an unabhängig voneinander kultivierten Zellen wiederholt und von zwei unabhängigen Untersuchern beurteilt.

4.1 Morphologie

Die drei untersuchten Zelllinien wiesen kein einheitliches Aussehen auf.

Die Rezidivzelllinie 14A nach Operation und Nachbestrahlung bildete einschichtige Kolonien aus epitheloiden, polygonalen Zellen, die zu einem Zellrasen zusammengewachsen waren. Die Zellen ordneten sich relativ homogen an und unterschieden sich nur geringfügig in ihrer Größe und im Kern-Zytoplasma-Verhältnis (Abbildung 4.1). Einige randständige Zellen zeigten breite Protrusionen im Sinne von Lamellipodien (Abbildung 4.2a).

Die Zelllinie 14B wirkte deutlich heterogener als 14A. Sie bildete epitheloide Monolayerinseln aus länglichen polygonalen und fibroblastoiden Zellen (Abbildung 4.3). Die Zellform und die Zellgröße variierten stark. Zwischen benachbarten Zellen befanden sich winzige Lücken. Die Größe der Interzellularspalten schwankte zwischen mikroskopisch nicht erkennbaren und deutlich sichtbaren Abständen. Diese Lücken waren von Interzellularbrücken durchzogen. Einige Zellen streckten lange Zytoplasmafortsätze in unbewachsene Areale aus oder schoben ihre Pseudopodien durch die Zellspalten (Abbildung 4.5a, b).

Die Zelllinie 14C wuchs in einschichtigen Kolonien und bildete bei 80%iger Dichte einen Rasen aus polygonalen epitheloidförmigen Zellen. Die Größe und das Kern-Matrix-Verhältnis der einzelnen Zellen variierten erheblich. Bemerkenswert war die hohe Zahl mitotischer Zellen. Mikroskopisch zeigten sich zwischen benachbarten Zellen keine Abstände (Abbildung 4.6). Bei einzelnen Zellen fielen breite Zellausläufer auf (Abbildung 4.7).

4.1.1 Modulation der Morphologie durch Hormone

Die Applikation von Östradiol und seinen Antagonisten hatte keinen Einfluss auf die Morphologie der Zellen.

4.2 Integrinexpression in der Zelllinie 14A

4.2.1 Integrinuntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$

In den unbehandelten 14A-Zellen konzentrierten sich die Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ auf Kontaktbereiche benachbarter Zellen. Die Farbsignale lagen bandförmig im Bereich der Membranen, so dass sich ein honigwabenartiges Fluoreszenzmuster ergab, welches für besser differenzierte Epithelien charakteristisch ist. Die Zell-Zell-Grenzen zeigten für $\alpha 2$ eine schwache Farbintensität, während für $\alpha 3$ und $\beta 1$ deutliche und starke Farbsignale erkennbar waren. Die freien Zellränder blieben ohne Anfärbung (Abbildung 4.1). Dies deutete auf Aufgaben in der Zell-Zell-Interaktion hin. Daneben sprach eine schwache basale Anfärbung für die Beteiligung der Integrinketten an der Zell-Matrix-Adhäsion.

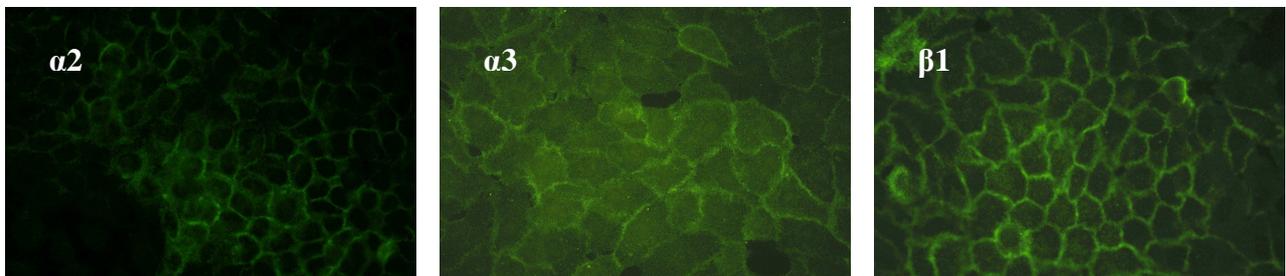


Abbildung 4.1: Bandförmige Expression der Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ an den Zell-Zell-Grenzen der Zelllinie 14A in der 40fachen Vergrößerung. Die Zellgröße und Signalintensität variierten innerhalb der Präparate. Die epitheloiden 14A-Zellen bildeten einen relativ geordneten einschichtigen Zellverband.

4.2.2 Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$

In den unbehandelten 14A-Zellen ordneten sich die Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$ in körnigen Mustern an der basalen Zellseite im Kontaktbereich zwischen den Zellen und der Kulturfläche an (Abbildung 4.2b). Des Weiteren zeigten sich $\alpha 6$ und $\beta 4$ in der Zellperipherie und an den Spitzen der breiten Zellfortsätze (Abbildung 4.2a). Die für benigne Plattenepithelzellen typischen $\alpha 6\beta 4$ -haltigen hemidesmosomalen Strukturen ließen sich nicht erkennen. Insgesamt entsprach die Expression dem diffusen Bild undifferenzierter Karzinomzellen, wobei $\alpha 6$ und $\beta 4$ scheinbar an der Protrusion der Zellen mitwirkten.

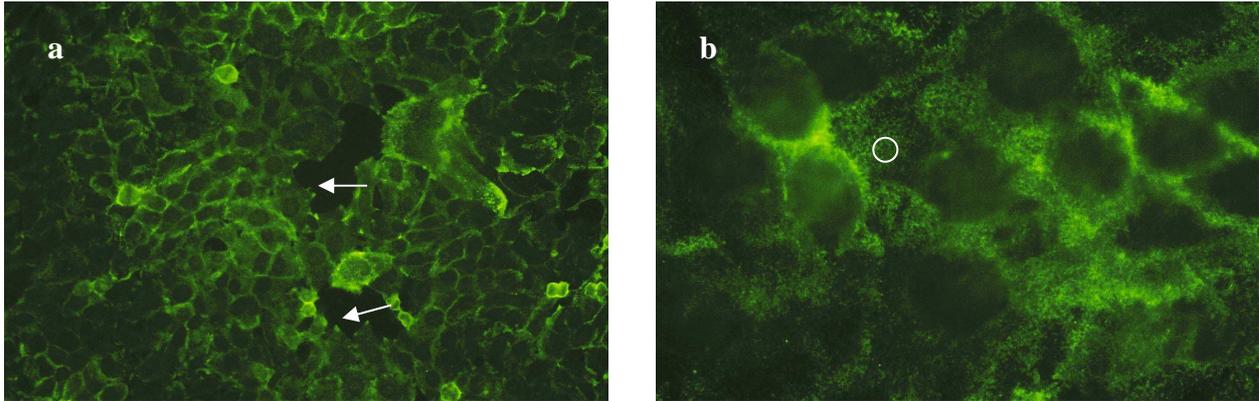


Abbildung 4.2: Verteilung der $\beta 4$ -Integrinkette in den 14A-Zellen in der Zellperipherie und an den Lamellipodien (\leftarrow) in der 20fachen Vergrößerung (a) sowie in suprabasalen und basalen körnigen Mustern (O) in der 100fachen Vergrößerung (b).

4.2.3 Modulation der Integrine durch Hormone

Auf der Zelllinie 14A führte die Behandlung mit Östradiol, ICI oder Tamoxifen weder zu qualitativen noch zu quantitativen Veränderungen in der Integrinexpression.

4.3 Integrinexpression in der Zelllinie 14B

4.3.1 Integrinuntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$

Von den 14B-Zellen wies nur ein geringer Anteil spezifische $\alpha 2$ -Signale auf. Diese lagen in schwacher Intensität punkt- und bandförmig membranär zwischen benachbarten Zellen sowie vereinzelt an den Enden von langen Zellausläufern (Abbildung 4.3).

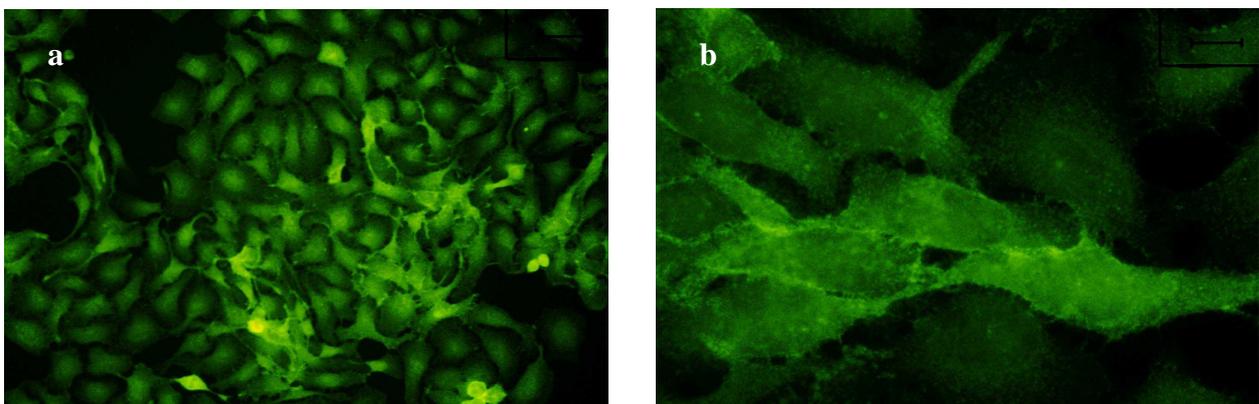


Abbildung 4.3: Schwache band- und punktförmige Expression der $\alpha 2$ -Integrinkette an den Membranen einzelner 14B-Zellen sowie an den Spitzen der Pseudopodien, zusätzlich diffuse basale Anfärbung. Der inhomogene Zellrasen zeigt epitheloide und fibroblastoide 14B-Zellen, die in Größe und Form variierten. (a) 20fache und (b) 100fache Vergrößerung.

Für die Integrinketten $\alpha 3$ und $\beta 1$ waren nahezu keine bandförmigen Membrananfärbungen sichtbar. Die Fluoreszenzsignale beschränkten sich auf punktförmige Formationen und schmale Interzellularbrücken im Bereich der angrenzenden Zellen. Darüber hinaus lokalisierten sich $\alpha 3$ und $\beta 1$ in langen Pseudopodien, mit denen sich die Zellen in zellfreie Areale vorschoben (Abbildung 4.5a, b). Das hierneben erkennbare basale Färbemuster sprach für eine Beteiligung von $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ am Zell-Matrix-Austausch.

4.3.2 Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$

In der Zelllinie 14B ordneten sich die Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$ an den basalen Zellflächen in polymorphen Flecken und streifigen Mustern an. Dies wies auf eine Polarisierung von $\alpha 6$ und $\beta 4$ in hemidesmosomalen Adhäsionskomplexen hin. Deutliche Signale in Form von polymorphen Flecken ließen sich auch an der Basis der langen Zellausläufer darstellen, was für eine Rolle des $\alpha 6\beta 4$ -Integrins in der Protrusion der Zellen sprach (Abbildung 4.4). Die Streifen waren allerdings nicht durchgehend und nicht auf allen Zellen erkennbar. Alternativ verteilten sich $\alpha 6$ und $\beta 4$ diffus und körnig am Grund der Zellschicht. Der Bereich zwischen den Zellen blieb ausgespart, so dass eine Beteiligung an Zell-Zell-Kontakten unwahrscheinlich war.

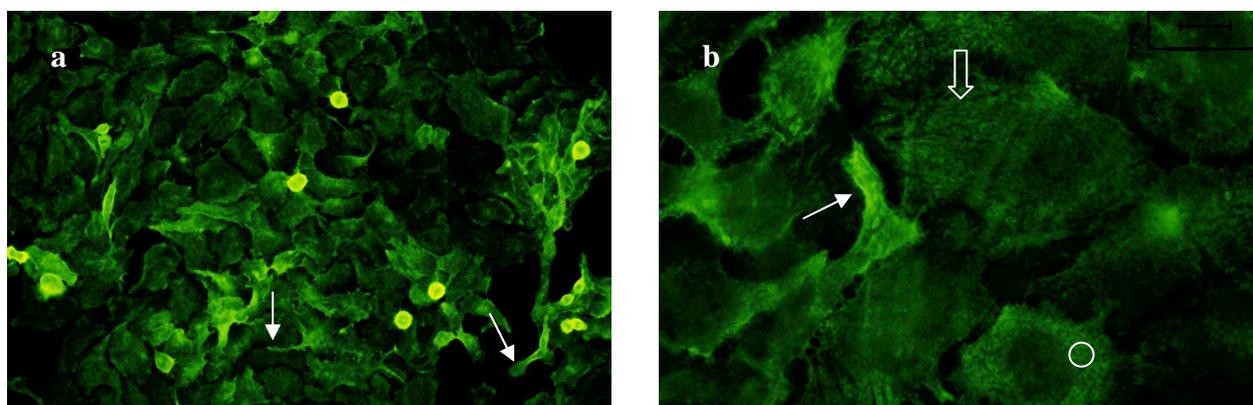


Abbildung 4.4: Expression der Integrinkette $\alpha 6$ in den 14B-Zellen in langen Pseudopodien (\blackleftarrow) sowie an der basalen Zellseite in streifenförmigen Adhäsionskomplexen (\blackleftrightarrow) und in diffusen körnigen Mustern (O), (a) 20fache und (b) 100fache Vergrößerung.

4.3.3 Modulation der Integrine durch Hormone

Die Behandlung der 14B-Zellen mit ICI und $5 \mu\text{M}$ Tamoxifen veränderte die Anordnung der Integrinketten $\alpha 3$ und $\beta 1$ zugunsten eines homogenen membranären Expressionsmusters. Wie

oben beschrieben, waren in den unbehandelten Präparaten $\alpha 3$ und $\beta 1$ zum Großteil punktförmig und als zarte Interzellularbrücken im Bereich der Zell-Zell-Kontakte verteilt (Abbildung 4.5a, b). Während der Exposition von ICI und 5 μM Tamoxifen nahm die Menge bandförmiger Färbesignale im Bereich der Zellmembranen zu. Dadurch ergaben sich honigwabenartige membranäre Färbemuster. Gleichzeitig war die Anfärbung der langen Pseudopodien vermindert. Das Gesamtbild wirkte geordneter. Besonders deutlich wurde das honigwabenartige Muster nach Applikation von 5 μM Tamoxifen (Abbildung 4.5c, d).

Dagegen zeigte die Behandlung der Zellkulturen mit Östradiol im Vergleich mit der Kontrolle keinen Unterschied bezüglich der Färbung der Integrinketten $\alpha 3$ und $\beta 1$. Ebenso wenig veränderten sich die Fluoreszenzmuster der Integrinuntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 6$ und $\beta 4$ nach Zusatz von Östradiol, ICI und Tamoxifen. Auch die Zellmorphologie blieb von den Integrinveränderungen unberührt.

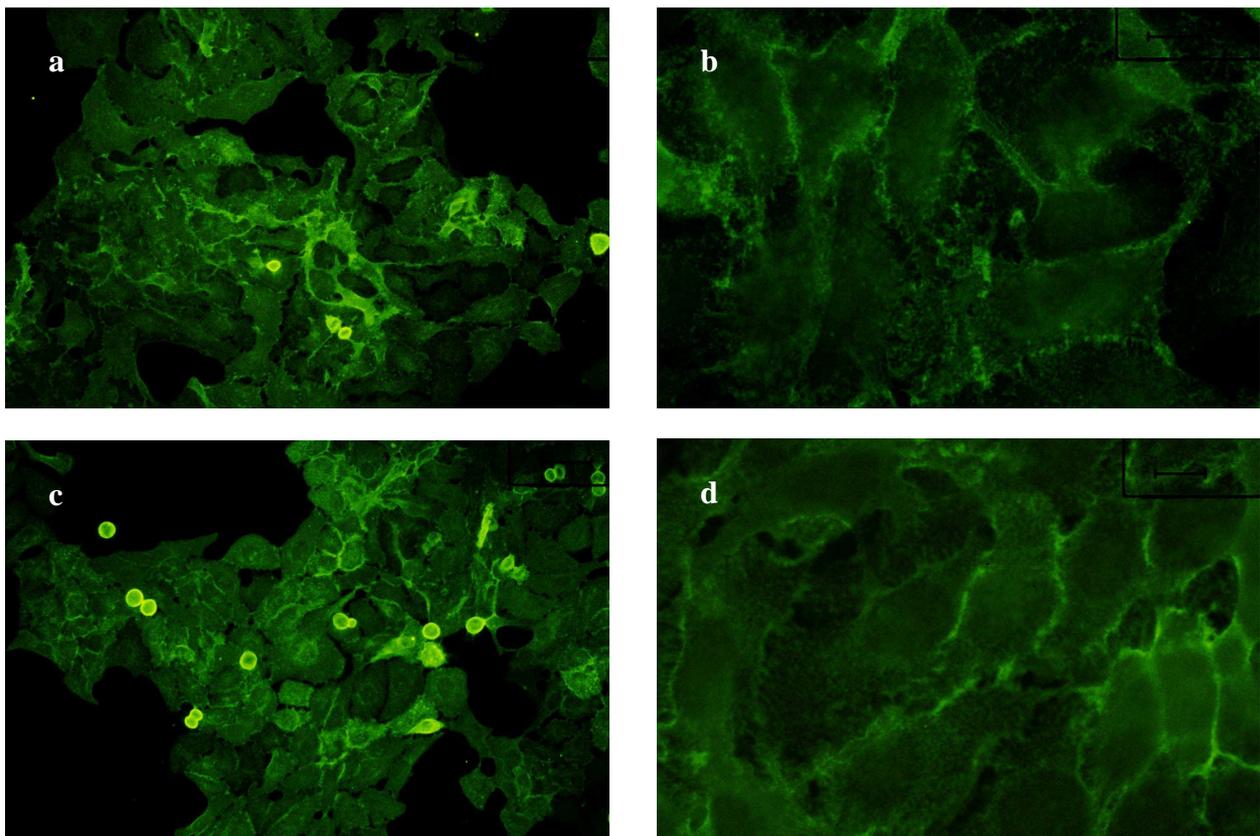


Abbildung 4.5: Die unbehandelten 14B-Zellen (a=20fache, b=100fache Vergrößerung) zeigten die $\alpha 3$ -Fluoreszenzsignale an den langen Pseudopodien, basal sowie in punktförmigen Kontakten und Interzellularbrücken zwischen den Zellen. Nach Behandlung mit 5 μM Tamoxifen (c=20fache, d=100fache Vergrößerung) nahm die Menge der angefärbten Pseudopodien ab. Stattdessen ordneten sich die $\alpha 3$ -Signale bandförmig im Bereich der Zellmembranen an. Die basale Färbung blieb unverändert.

4.4 Integrinexpression in der Zelllinie 14C

4.4.1 Integrinuntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$

Das Färbemuster der Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ in den unbehandelten 14C-Zellen ähnelte den Beobachtungen an der Zelllinie 14A, d.h. die Farbsignale lagen als bandförmige Verdichtung im Bereich der Membranen, ohne dass eine definitive Zuordnung zu einer der beiden nebeneinander liegenden Zellen möglich war. Es entstand ein honigwabenförmiges Fluoreszenzmuster, welches aufgrund der unterschiedlichen Zellgrößen und der variierenden Farbtintensitäten innerhalb des Zellverbandes etwas inhomogen wirkte. Die membranären Farbsignale der $\beta 1$ -Integrinkette wiesen hauptsächlich eine deutliche Intensität auf, wohingegen $\alpha 2$ und $\alpha 3$ eine vorwiegend schwache Anfärbung zeigten. Das basale Fluoreszenzmuster war bei allen drei Integrinuntereinheiten lediglich schwach ausgeprägt, deutete aber auf eine Beteiligung an der Zell-Matrix-Adhäsion hin. Die freien Zellränder waren nicht angefärbt (Abbildung 4.6).

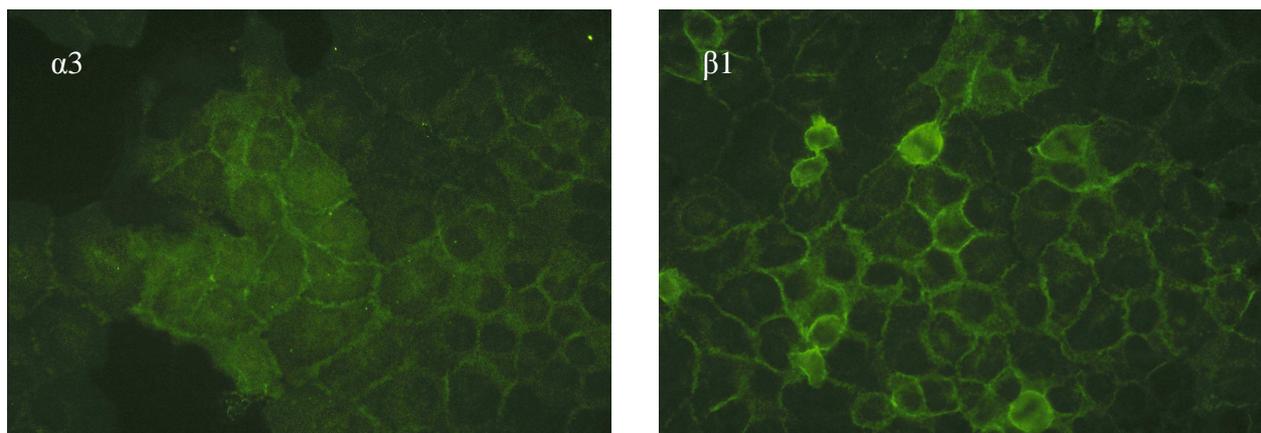


Abbildung 4.6: Die epitheloidförmigen 14C-Zellen bildeten zusammenhängende Monolayerkolonien. Die Zellen zeigten ein inhomogenes membranäres Färbemuster der überwiegend schwach exprimierten $\alpha 3$ -Integrinkette und der hauptsächlich deutlich ausgeprägten $\beta 1$ -Integrinuntereinheit. Die Zellgröße und Farbtintensität variierten innerhalb der Präparate. 40fache Vergrößerung

4.4.2 Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$

Die 14C-Zellen zeigten für die Integrinketten $\alpha 6$ und $\beta 4$ das charakteristische Fluoreszenzbild nicht-differenzierter Karzinomzellen: $\alpha 6$ und $\beta 4$ ordneten sich in diffusen körnigen Mustern am Grund der Zellschicht und in der Zellperipherie an. Die Intensität variierte zwischen schwachen und deutlichen Fluoreszenzsignalen und nahm häufig in Richtung eines Zellpols zu. Ebenso waren $\alpha 6$ und $\beta 4$ in den Lamellipodien angereichert, was auf eine Rolle in der Zellmotilität hindeutete (Abbildung 4.7a, b). Dahingegen ließen sich keine Hinweise für ein „Clustering“ der

$\alpha 6$ - und $\beta 4$ -Integrinkette in hemidesmosomalen Strukturen erkennen, wie dies bei gesunden Keratinozyten beobachtet wird.

4.4.3 Modulation der Integrine durch Hormone

Nach Applikation von ICI veränderte sich die Anordnung der basalen $\alpha 6$ -Integrinmuster. Die Integrinkette $\alpha 6$ lag in streifenförmigen Konglomeraten im Kontaktbereich zwischen der Zellunterseite und der Kulturfläche, was für eine Polarisierung der Zellen sprach. Die hemidesmosomalen Strukturen zeigten sich nicht durchgehend an der gesamten Zellunterfläche und traten nicht bei allen Zellen gleichermaßen auf. Der Effekt war nach Exposition von 5 μM ICI stärker ausgeprägt als unter 1 μM ICI. Alternativ lag $\alpha 6$ in diffusen körnigen Mustern an der basalen Zellseite, wie dies bei den unbehandelten Zellen der Fall war (Abbildung 4.7c, d).

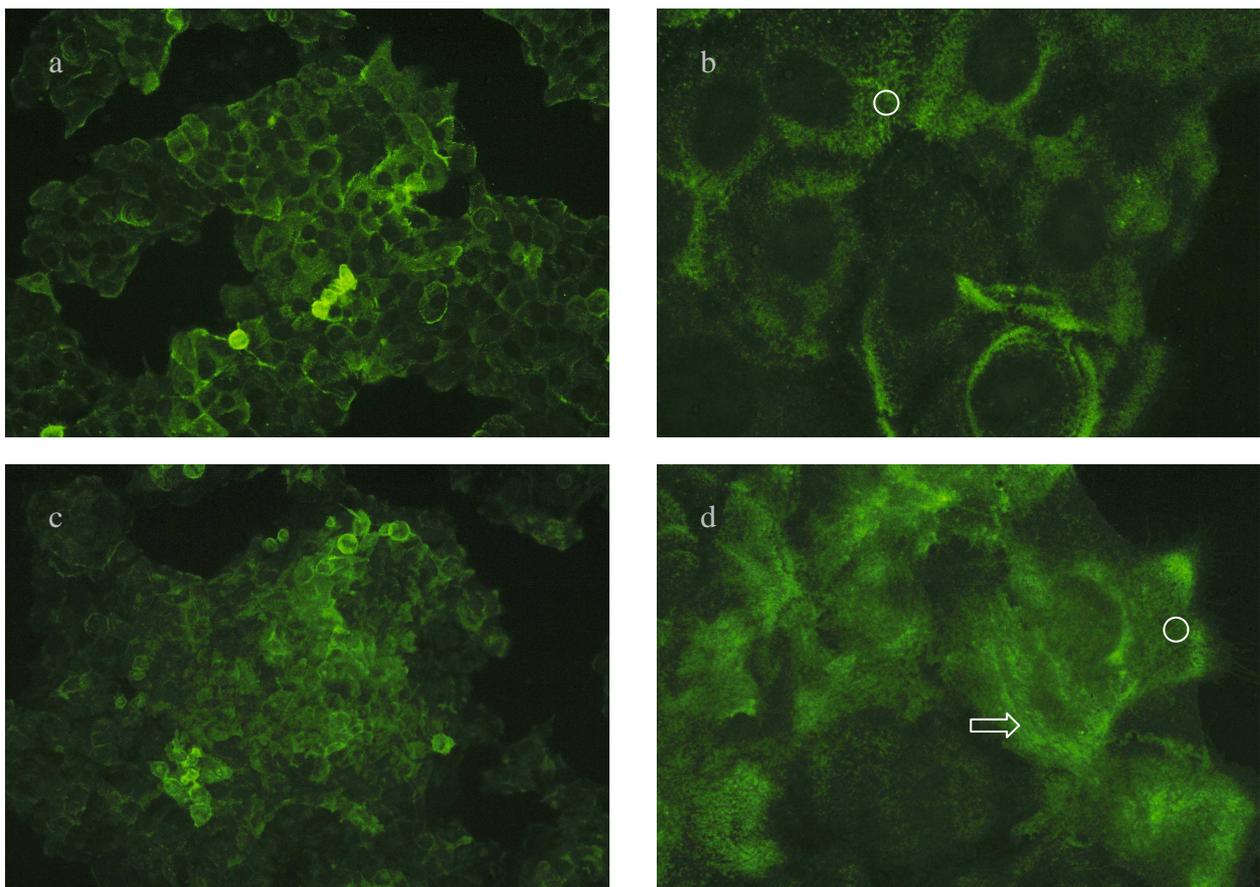


Abbildung 4.7: In den unbehandelten 14C-Zellen (a=20fache, b=100fache Vergrößerung) zeigte die $\alpha 6$ -Integrinkette eine diffuse körnige Verteilung (O) an der Zellbasis und der Zellperipherie, teilweise mit Betonung eines Zellpols. Nach Behandlung mit 5 μM ICI (c=20fache, d=100fache Vergrößerung) polarisierte sich $\alpha 6$ in streifigen Adhäsionskomplexen an der basalen Zellseite (↔). Daneben lag es weiterhin in diffusen körnigen basalen Mustern. Unverändert blieb die Anfärbung einzelner Zellprotrusionen.

Auf die $\beta 4$ -Integrinkette hatte die ICI-Behandlung nur vereinzelt und diskret die polarisierende Wirkung, die bei $\alpha 6$ beobachtet wurde. Die Färbung blieb überwiegend auf die diffusen körnigen Muster am Grund der Zellen beschränkt.

Die übrigen Behandlungen mit Östradiol und Tamoxifen ließen keinen Einfluss auf das Färbemuster von $\alpha 6$ und $\beta 4$ erkennen. Ebenso blieben die Fluoreszenzmuster von $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ unter den verschiedenen Behandlungsmodalitäten unverändert.

4.5 Negativkontrolle

Die Präparate, die mit keinem Antikörper bzw. mit Kontrollantikörpern behandelt wurden, zeigten keine spezifischen Markierungen. Es wurde lediglich eine unspezifische perinukleäre Anfärbung beobachtet. Dies ist typisch bei permeabilisierten Zellen, wie sie in dieser Arbeit Anwendung fanden (Kawahara et al. 1999).

4.6 Vergleich der Zelllinien 14A, 14B und 14C sowie der hormonellen Modulation

Die kultivierten Zellen der Linien 14A, 14B und 14C exprimierten die in dieser Arbeit untersuchten Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$. Dabei bevorzugten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ den Membranbereich, die Filopodien und die langen Zellausläufer zwischen benachbarten Zellen, was auf eine Rolle in der Zell-Zell-Interaktion hindeutete. Die Aufgaben von $\alpha 6$ und $\beta 4$ lagen indessen eher in der Zell-Matrix-Adhäsion und der Protrusion der Zelle, da die beiden Integrinuntereinheiten überwiegend im Kontaktbereich zwischen Zellunterseite und Kulturfläche sowie in Lamellipodien zu finden waren.

Die Expressionsmuster der Zelllinien 14A und 14C ähnelten sich bezüglich der bandförmigen membranären Anfärbung von $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ sowie der diffusen basalen Fluoreszenz von $\alpha 6$ und $\beta 4$. In den schlechter differenzierten 14C-Zellen war eine Reduktion der Integrine $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ und $\beta 4$ zu verzeichnen (Tabelle 4.1). Allerdings ließ sich hier durch den Zusatz von ICI eine Polarisierung der diffus basal lokalisierten $\alpha 6$ -Einheit in hemidesmosomalen Adhäsionskomplexen verzeichnen (Tabelle 4.2).

$\alpha 6$ - und $\beta 4$ -haltige hemidesmosomale Konglomerate waren an der Zellbasis der 14B-Zellen bereits ohne Behandlung erkennbar und änderten sich auch nicht nach hormoneller Modulation. Die 14B-Zellen stachen zudem hervor durch die Anordnung von $\alpha 3$ und $\beta 1$ in punktförmigen

Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakten, die sich nach der Applikation von ICI und 5 μ M Tamoxifen in bandförmige membranäre Muster umorganisierten. Gleichzeitig führte die Behandlung zu einer verminderten Anfärbung der Pseudopodien bei unveränderter Zellmorphologie.

Insgesamt war die quantitative Auswertung der nach hormoneller Behandlung beobachteten Veränderungen in der Integrinexpression schwierig. Die Abweichungen betrafen eher Integrinmodulationen struktureller bzw. funktioneller Art.

Tabelle 4.1: Vergleich der Expression der Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\alpha 6$ und $\beta 4$ auf den Zelllinien 14A, B und C (+++ = starke Fluoreszenz, ++ = deutliche Fluoreszenz, + = schwache Fluoreszenz, (+) = sehr schwache Fluoreszenz, die Angabe von zwei Intensitäten hebt die Fluoreszenzschwankungen innerhalb des Präparats hervor)

	14A	14B	14C
$\alpha 2$	+ bandförmig membranär (+) diffus basal	+ vereinzelt punkt- und bandförmig membranär, an Spitzen der Zellausläufer (+) diffus basal	+ vereinzelt bandförmig membranär (+) diffus basal
$\alpha 3$	++ bandförmig membranär (+) diffus basal	++ punktförmig im Bereich der Zell-Zell-Kontakte und an Spitzen der Zellausläufer (+) diffus basal	+ bandförmig membranär (+) diffus basal
$\beta 1$	+++ bandförmig membranär (+) diffus basal	++ punktförmig im Bereich der Zell-Zell-Kontakte und an Spitzen der Zellausläufer (+) diffus basal	++ bandförmig membranär (+) diffus basal
$\alpha 6$	++ diffus körnig basal, Zellperipherie und lange Zellausläufer	++ basal geclustert in streifigen Adhäsionskomplexen und langen Zellausläufern, daneben diffuse basale Muster	+ - ++ diffus körnig basal, Zellperipherie und lange Zellausläufer
$\beta 4$	++ diffus körnig basal, Zellperipherie und lange Zellausläufer	++ basal geclustert in streifigen Adhäsionskomplexen und langen Zellausläufern, daneben diffuse basale Muster	+ - ++ diffus körnig basal, Zellperipherie und lange Zellausläufer

Tabelle 4.2: Vergleich der Wirkung von Östradiol, ICI und Tamoxifen auf die Expression der Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\alpha 6$ und $\beta 4$ auf den Zelllinien 14A, B, C (\emptyset = keine qualitativen oder quantitativen Veränderungen)

	Integrin	14A	14B	14C
Östradiol	$\alpha 2$	\emptyset	\emptyset	\emptyset
	$\alpha 3$	\emptyset	\emptyset	\emptyset
	$\beta 1$	\emptyset	\emptyset	\emptyset
	$\alpha 6$	\emptyset	\emptyset	\emptyset
	$\beta 4$	\emptyset	\emptyset	\emptyset
ICI	$\alpha 2$	\emptyset	\emptyset	\emptyset
	$\alpha 3$	\emptyset	1 μ M + 5 μ M ICI: $\alpha 3$ bandförmiger membranär, weniger an langen Zellausläufern, homogeneres Bild	\emptyset
	$\beta 1$	\emptyset	1 μ M + 5 μ M ICI: $\beta 1$ bandförmiger membranär, weniger an langen Zellausläufern, homogeneres Bild	\emptyset
	$\alpha 6$	\emptyset	\emptyset	1 μ M + 5 μ M ICI: Clustering der ursprünglich diffus verteilten basalen $\alpha 6$ -Signale in streifigen Adhäsionskomplexen
	$\beta 4$	\emptyset	\emptyset	1 μ M + 5 μ M ICI: Geringfügiges Clustering der ursprünglich diffus verteilten basalen $\beta 4$ -Signale in streifigen Adhäsionskomplexen
Tamoxifen	$\alpha 2$	\emptyset	\emptyset	\emptyset
	$\alpha 3$	\emptyset	5 μ M Tamoxifen: $\alpha 3$ bandförmiger membranär, weniger an langen Zellausläufern, homogeneres Bild	\emptyset
	$\beta 1$	\emptyset	5 μ M Tamoxifen: $\beta 1$ bandförmiger membranär, weniger an langen Zellausläufern, homogeneres Bild	\emptyset
	$\alpha 6$	\emptyset	\emptyset	\emptyset
	$\beta 4$	\emptyset	\emptyset	\emptyset

5 Diskussion

Unkontrolliertes Wachstum, Invasion und Metastasierung sind die entscheidenden Merkmale eines malignen Tumors. Hierzu gehören verschiedene Mechanismen, welche einzelnen Zellen die Ablösung vom Gewebeverband ermöglichen. Da die Prognose des Patienten von der Ausbreitung des Tumors abhängt, ist das Verständnis der ersten Schritte in der Progression eines malignen Tumors von grundlegender Bedeutung, um Behandlungsmaßnahmen zu entwickeln. Die Integrine spielen als Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung eines Zellverbands. Ebenso steuern sie die Migration von Zellen. Veränderungen der Integrinexpression sind in Tumorgeweben sichtbar (Guo und Giancotti 2004).

Bestandteil dieser Arbeit war zu examinieren, ob sich die Integrine durch exogene Agenzien beeinflussen lassen. Dabei ließ der Nachweis von Östrogenrezeptor-mRNA in der Mundschleimhaut vermuten, dass diese ebenso wie die Brustdrüse zu den östrogensensiblen Geweben gehört (Leimola-Virtanen et al. 2000; Nelson et al. 2007).

Epidemiologische Daten und die Erfolge einer antiöstrogenen Behandlung unterstreichen die Bedeutung von Östrogen für die Entwicklung epithelialer Karzinome. Seit Jahrzehnten wird die Behandlung von Brustkrebs durch den Östrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen unterstützt (Furr und Jordan 1984; Ellis et al. 1997; Jordan 2004), wobei seit 2002 auch ICI zum Einsatz kommt (Howell et al. 2002; Chia et al. 2008).

Ähnliche Erfolge verspricht der Einsatz von Tamoxifen bei Tumoren nicht-reproduktiver Gewebe, wie z.B. Astrozytomen und Melanomen (Atallah und Flaherty 2005; Rabbani et al. 2007).

Im Zentrum dieser Dissertation steht die Untersuchung der Wirkung von Östrogenen und deren hormonellen Antagonisten auf die Integrinexpression von oralen Plattenepithelkarzinomzellen (oPECA) *in vitro*.

5.1 Morphologie

Zellen gesunder Plattenepithelien sind homogen angeordnet und besitzen ein einheitlich niedriges Kern-Zytoplasma-Verhältnis. In Plattenepithelkarzinomen (PECA) sind die Zellen unregelmäßiger verteilt und unterscheiden sich untereinander deutlich in der Zellgröße, -form und in der Kern-Zytoplasma-Ratio (Xiaoming et al. 2001; Kumagai et al. 2004).

Die Zelllinien 14A, 14B und 14C wurden dem T1N0M0-Stadium der TNM-Klassifikation zugeordnet. 14A wurde 75 Monate nach Erstdiagnose und anschließender Resektion und Radiatio aus dem ersten Rezidiv eines Mundbodenkarzinoms kultiviert. Histopathologisch wurde der Tumor, aus dem die 14A-Zellen isoliert wurden, als schlecht bis moderat gut klassifiziert (Lansford et al. 1999). Diese Zellen zeigten in den vorliegenden Untersuchungen eine relativ homogene Morphologie. Dies sprach für einen niedrigeren Malignitätsgrad als bei 14B und 14C. Der Tumor, aus dem 14B isoliert wurde, ist nach zweimaliger chirurgischer Intervention und Bestrahlung aufgetreten, wobei zwischen dem ersten und zweiten Rezidiv circa ein Jahr lag. Im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien wirkte 14B wegen des hohen Anteils fibroblastoider Zellen am schlechtesten differenziert. Der Verlust eines epithelialen Musters zugunsten eines spindelzelligen, fibroblastenähnlichen Erscheinungsbildes wird als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet. Sie entspricht bei Tumoren einer Entdifferenzierung in ein proliferationsfreudigeres Gewebe und zieht eine schlechtere Prognose für den Patienten nach sich (Guarino et al. 2007). In Karzinomzellen des Ovars konnte gezeigt werden, dass der ER α die EMT stimuliert, während der ER β die EMT hemmt (Park et al. 2008). Im Gegensatz zu den beiden anderen Zelllinien besitzen die 14B-Zellen keinen ER β (Nelson et al. 2007). Das Fehlen des ER β könnte somit die EMT der 14B-Zellen begünstigt haben, was zu einem vermehrten Wachstum fibroblastoider Zellen führte. Die Invasion von Karzinomzellen kann im Zellverband oder als Einzelzellen stattfinden. Letztere Option wird häufiger von fibroblastisch veränderten Zellen genutzt und korreliert mit einer stärkeren Invasivität (Mercurio und Rabinovitz 2001). In vitro-Untersuchungen bestätigten die stärkere Aggressivität von 14B gegenüber 14A: 14B zeigte ein schnelleres Wachstum (Kimmel und Carey 1986; Nelson et al. 2008).

14C wurde aus dem dritten Rezidiv der Patientin gewonnen. Der Tumor, dem 14C entstammt, entwickelte sich innerhalb eines Jahres nach Diagnose des Zweitrezidivs (14B) und folgender zweimaliger Operation, Radiatio und Chemotherapie (Lansford et al. 1999). Morphologisch nahm 14C allerdings eine Mittelstellung zwischen 14A und 14B ein. 14C wies nur epitheloide Zellen auf, die aufgrund der stärker variierenden Zellgröße, des variableren Zell-Kern-Verhältnisses und der hohen Mitoserate einen heterogenen Verband bildeten.

14B und 14C waren Rezidive von 14A und wurden als schlecht differenziert beurteilt (Lansford et al. 1999). Die voneinander abweichende Morphologie von 14B und 14C könnte Ausdruck der unterschiedlichen Invasivität der Tumorzellen sein. Von den untersuchten Zelllinien zeigte 14B die höchste Invasivität (persönliche Kommunikation, Katja Nelson).

Darüber hinaus zeigten die 14B-Zellen im Vergleich mit 14A und 14C die geringste Adhäsion an Laminin-1 (Nelson et al. 2008). Eventuell sezernierten die 14B-Zellen ihre eigene Laminin-5-haltige Matrix. Laminin-5 schwächt die Zell-Zell-Bindung und führt zur Auflösung des Zellverbandes und einer verstärkten Motilität der Zellen. Für andere Liganden wie Laminin-1 und Kollagen konnte diese Wirkung bisher nicht nachgewiesen werden (Kawano et al. 2001).

5.2 Integrinexpression in unbehandelten Monolayerzellkulturen

Gesunde Epithelien unterliegen einem fein abgestimmten Gleichgewicht aus Proliferation und terminaler Differenzierung der Keratinozyten. Integrine spielen dabei als Vermittler zwischen extrazellulärer Matrix und Zellinnerem eine wichtige Rolle. Hauptsächlich beteiligen sich die Integrine $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ an der Homöostase des Keratinozytenverbandes (Janes und Watt 2006). Die getesteten Zelllinien 14A, 14B und 14C exprimierten die Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\alpha 6$ und $\beta 4$. Dies sind die typischen Integrinketten in gesunder Mundschleimhaut und in oPECA (Jones et al. 1993; Sugiyama et al. 1993; Shinohara et al. 1999).

5.2.1 Expression der Integrinketten $\alpha 6$ und $\beta 4$

$\alpha 6\beta 4$ -Integrin liegt in gesunden Keratinozyten in Hemidesmosomen an der Zellbasis und vermittelt den Kontakt zur Basalmembran. Diese Hemidesmosomen sind unter dem Mikroskop erkennbar an der Aggregation von $\alpha 6\beta 4$ -Integrin in polymorphen basal lokalisierten Flecken, sogenannten Clustern (Marchisio et al. 1991; Witkowski et al. 2000).

In Tumorzellen ist die basale Polarisierung von $\alpha 6\beta 4$ -Integrin in Hemidesmosomen oft aufgehoben (Garzino-Demo et al. 1998; Witkowski et al. 2000; Ricci et al. 2002). Dies bestätigten die vorliegenden Ergebnisse: Die Zelllinien 14A und 14C zeigten in der Monolayerkultur eine diffuse Verteilung der Integrinketten $\alpha 6$ und $\beta 4$ an der Zellbasis und in der Peripherie der Zellen. Da die $\beta 4$ -Integrinuntereinheit ausschließlich mit $\alpha 6$ assoziiert (Mercurio und Rabinovitz 2001), war eine Heterodimerisierung zu $\alpha 6\beta 4$ -Integrin wahrscheinlich.

Als Ursachen für den Polarisationsverlust werden Veränderungen im $\beta 4$ -Integrin, in der Zusammensetzung der Hemidesmosomen und der Verlust von Matrixkomponenten diskutiert (Witkowski et al. 2000; Wilhelmsen et al. 2007). In normalen Epithelien bindet $\alpha 6\beta 4$ -Integrin bevorzugt an Laminin-5. Bei den Zelllinien 14A und 14C war die Affinität für Laminin-1 erhöht

(Nelson et al. 2008). Der Polarisationsverlust könnte daher mit dem Austausch des extrazellulären Liganden zusammenhängen. Zudem kann eine verminderte biologische Halbwertszeit zu einem erhöhten Umsatz der Integrine führen, was eine korrekte Polarisation verhindert (Witkowski et al. 2000). Unpolarisiert und suprabasal exprimiertes $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin verschlechtert die Prognose von Plattenepithelkarzinomen erheblich (Van Waes et al. 1995; Ricci et al. 2002; Owens et al. 2003). Dem könnten diverse Mechanismen zugrunde liegen: Suprabasales $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin moduliert Signalkaskaden, welche in die Zytoskelettorganisation, die Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung eingreifen (Borradori und Sonnenberg 1999). Beispielsweise stört suprabasales $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin die wachstumshemmenden Signale des TGF β (transforming growth factor β) und fördert somit die Proliferation der Zellen (Owens et al. 2003). Gleichzeitig erhöht es die Invasivität der Zellen durch Aktivierung der Phosphoinositide 3-Kinase (PI3-K) (Shaw et al. 1997). Die diffuse und periphere Verteilung von $\alpha 6$ und $\beta 4$ auf den Zelllinien 14A und 14C unterstreichen somit das Bild maligne transformierter Zellen.

Darüber hinaus kann suprabasales $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin statt mit Intermediärfilamenten mit dem Aktinzytoskelett assoziieren und die Zellmotilität fördern (Rabinovitz und Mercurio 1997). Beispielsweise führt die Phosphorylierung der $\beta 4$ -Untereinheit zu einer Disassemblierung von Hemidesmosomen und Verlagerung des $\alpha 6 \beta 4$ -Integrins in Lamellipodien (Santoro et al. 2003). Dieser Effekt wird u.a. durch EGF induziert (Wilhelmsen et al. 2007). Alle drei untersuchten Zelllinien zeigten eine Anreicherung von $\alpha 6$ und $\beta 4$ in Lamellipodien. Dies wies auf posttranslationale Veränderungen an der $\beta 4$ -Untereinheit, z. B. durch Phosphorylierung (Santoro et al. 2003), und eine Beteiligung von $\alpha 6 \beta 4$ -Integrins an der Migration der Tumorzellen hin. Im Rahmen von hemidesmosomalen Komplexen bindet das $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin normalerweise intrazellulär an das Netzwerk der Intermediärfilamente. Dadurch entstehen die stabilen Bindungskontakte zwischen Zelle und Basalmembran, die für den Erhalt eines gesunden Epithelverbandes erforderlich sind (Borradori und Sonnenberg 1999). Dahingegen ist die feine Organisationsstruktur in Tumorzellverbänden aufgehoben. Karzinomzellen zeichnen sich durch hohe Dynamik, Polarisationsverlust und Migrationsneigung aus. Mit der Verschiebung von $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin aus stabilen cytokeratinhaltigen Adhäsionskomplexen in dynamische aktin-assoziierte Cluster scheint das Integrin seinen Beitrag an der Zellmotilität zu leisten (Hood und Cheresch 2002). Gesunde Zellen nutzen zur Fortbewegung $\beta 1$ -Integrinhaltige Pseudopodien. In Karzinomzellen findet man zusätzlich oder ausschließlich $\alpha 6 \beta 4$ an der Spitze von Filopodien und Lamellipodien in Assoziation mit den Aktinfilamenten. Extrazellulär besteht im Bereich dieser Verankerungspunkten eine starke Bindung von $\alpha 6 \beta 4$ an Laminin-1 (Rabinovitz und Mercurio

1997). Der Nachweis von $\alpha 6\beta 4$ -Integrin an den Spitzen der Lamellipodien bei gleichzeitig starker Bindung an Laminin-1 (Nelson et al. 2008) geben einen Hinweis auf die Motilität von 14A, 14B und 14C und gaben somit eine Erklärung für die Aggressivität der Ausgangstumoren.

In den 14B-Zellen ordneten sich die Integrinketten $\alpha 6$ und $\beta 4$ zusätzlich in basalen Clustern an, die dem typischen Aussehen von Hemidesmosomen entsprachen. Morphologisch wiesen die fibroblastenartigen 14B-Zellen den schlechtesten Differenzierungsgrad auf, so dass die Polarisierung von $\alpha 6\beta 4$ -Integrin in vereinzelt Hemidesmosomen untypisch war. Die Ausbildung von Hemidesmosomen setzt normalerweise einen extrazellulären Liganden voraus. Da bei der Aufzucht von 14A, 14B und 14C keine Matrixkomponenten zugefügt wurden, kann man annehmen, dass die Zellen ihre eigene extrazelluläre Matrix gebildet haben (Marchisio et al. 1991). In vivo zeigen oPECA im Bereich der Invasionsfront eine Anreicherung von Laminin-5. Die selbstproduzierten Liganden könnten in vivo und in vitro eine provisorische Schiene formen, auf der die Zellen umliegende Gewebe infiltrieren (Kosmehl et al. 1999).

Vergleichende Adhäsionsexperimente an den untersuchten Zelllinien zeigten bei 14B die geringste Affinität für Laminin-1 (Nelson et al. 2008). Jedoch kann eine Bindung der 14B-Zellen an Laminin-5 - einem bevorzugten Liganden von $\alpha 6\beta 4$ -Integrin - erfolgt sein. Die Adhäsion an Laminin-5 könnte den Impuls zur Formierung von Hemidesmosomen gegeben haben. Andererseits induziert Laminin-5, wie oben erwähnt, die Auflösung eines epithelialen zugunsten eines fibroblastenartigen Zellverbandes, was als epithelial-mesenchymale Transition bezeichnet wird (Kawano et al. 2001). Die Anordnung in Hemidesmosomen bei gleichzeitig fibroblastoider Zellmorphologie könnte somit ein Hinweis auf die Sekretion von Laminin-5 durch 14B-Zellen sein.

Möglich wäre auch, dass sich $\alpha 6\beta 4$ -Integrin in hemidesmosomalen Strukturen anordnete, ohne dass das Integrin einen extrazellulären Liganden band. Dieser Mechanismus wurde für Brustkrebszellen beschrieben. Er beruht auf der Aktivierung von PI3-K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) und scheint das Überleben und die Motilität der Tumorzellen zu fördern (Gilcrease et al. 2004). Denn allgemein wird angenommen, dass geclusterte Integrine mehr Signale induzieren, als diffus verteilte (Miyamoto et al. 1995).

Carey et al. (1992) sahen einen Zusammenhang zwischen der Polarisierung der Zellen und der Morphologie: Bei epitheloidförmigen Zellen war $\alpha 6\beta 4$ -Integrin hauptsächlich diffus und peripher verteilt, wie dies bei den Zelllinien 14A und 14C der Fall war. Dahingegen reichte sich $\alpha 6\beta 4$ -Integrin in länglichen Zellen stärker in basalen polymorphen Clustern an, welche

andere Autoren als Hemidesmosomen beschrieben haben (Marchisio et al. 1991; Witkowski et al. 2000). Die basalen $\alpha 6$ - und $\beta 4$ -Integrincluster in den 14B-Zellen könnten demzufolge laut Carey et al. (1992) mit der länglichen fibroblastoiden Zellform zusammenhängen. Somit stände ein höherer Gehalt an Hemidesmosomen nicht im Gegensatz zu einem geringeren Differenzierungsgrad der Zellen, wie dies bei den fibroblastenartigen Zellen der Linie 14B zu vermuten war.

Ungeklärt ist allerdings, ob die beobachteten $\alpha 6$ - und $\beta 4$ -Cluster funktionierende Hemidesmosomen bilden. Takkunen et al. (2006) zeigten für oPECA-Zellen nach EMT den Verlust von Hemidesmosomen und das Fehlen einer autokrinen Sekretion von Laminin-5.

Ob eine verminderte oder vermehrte $\alpha 6\beta 4$ -Integrin-Expression die Prognose von oPECA verschlechtert, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen (Kimmel und Carey 1986; Carey et al. 1987, 1992; Jones et al. 1993; Sugiyama et al. 1993; Shinohara et al. 1999; Dyce et al. 2002). Im Vergleich der drei untersuchten Zelllinien fiel bei 14C eine Abnahme der Expression von $\alpha 6$ und $\beta 4$ auf. Dies könnte auf eine verkürzte Lebensdauer und eine erhöhte Umsatzrate von $\alpha 6$ und $\beta 4$ in den 14C-Zellen hindeuten. Solche erhöhten „turn-over“-Zahlen gehen häufig mit einem Polarisationsverlust der Zellen und fehlender Ausbildung von stabilen hemidesmosomalen Zell-Matrix-Kontakten einher (Witkowski et al. 2000). Eventuell hängt dies mit dem Verlust von Basalmembran-Komponenten zusammen (Downer et al. 1993). Dies unterstreicht den zunehmenden Rezidivgrad des Ausgangstumors.

5.2.2 Expression der Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$

Die Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ lassen sich hauptsächlich an den Zell-Zell-Grenzen benachbarter Zellen nachweisen. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen und deutet auf eine interzelluläre Expression der Heterodimere $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$ in 14A, 14B und 14C (Larjava et al. 1990; Albelda 1993; Jones et al. 1993; Shinohara et al. 1999; Ricci et al. 2002). Ursprünglich bestand die Annahme, dass die Integrine $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$ in kultivierten Keratinozyten die Bindung an Laminin und Kollagen vermitteln (Thomas et al. 1997). Allerdings sprach das interzelluläre Expressionsmuster der Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ in den untersuchten Zellen eher für eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion.

Eine homophile interzelluläre Bindung der $\beta 1$ -Integrine konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Kim und Yamada 1997). Zellen mit intakter $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-Expression zeigen eine bessere Zell-Zell-Verbindung, da eine Kommunikation zwischen $\alpha 3\beta 1$ -Integrin und Cadherin-

abhängiger Zell-Zell-Adhäsion besteht (Kreidberg 2000; Chattopadhyay et al. 2003). E-Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige transmembranäre Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren, welche in Epithelzellverbänden die interzellulären Kontakte stabilisieren (Kramer et al. 2005; Lyons und Jones 2007). In Karzinomzellen ist die E-Cadherin-Expression häufig herunterreguliert (Guarino et al. 2007). Dies bestätigten die Untersuchungen an 14A, 14B und 14C, die eine diskontinuierliche Verteilung von E-Cadherin an der Zellmembran aufwiesen. Dabei zeigte 14C die ausgeprägteste Abnahme von E-Cadherin (Nelson et al. 2007). Ein E-Cadherin-Verlust korreliert in Karzinomzellen mit einer Entdifferenzierung und stärkeren Invasivität (Cavallaro und Christofori 2004). Wie weiter unten noch ausführlicher erläutert wird, zeigte 14C außerdem die schwächste Expression von $\alpha 3$ und $\beta 1$. Dies steht eventuell im Zusammenhang mit der E-Cadherin-Reduktion in 14C und belegt die Progression der Entdifferenzierung von 14C im Vergleich zu 14A und 14B.

Die interzelluläre Integrinexpression übernimmt neben der mechanischen Verbindung der Zellen hauptsächlich Aufgaben in der Signalübertragung zwischen den Zellen sowie in der Organisation des Zytoskeletts (Carter et al. 1990; Larjava et al. 1990; Thomas et al. 1997; Chattopadhyay et al. 2003; Jin und Varner 2004; Janes und Watt 2006). Auf diese Weise können die Integrine entscheidend das Verhalten von Tumorzellen steuern.

So kann bereits das Fehlen einzelner Integrine zur Auflösung des Zellverbandes führen (Larjava et al. 1990; (Janes und Watt 2006). Bei den vorliegenden Versuchen war die $\alpha 2$ -Integrinkette an den Zell-Zell-Grenzen schwächer exprimiert als die $\alpha 3$ - und $\beta 1$ -Untereinheit. Besonders ausgeprägt war die $\alpha 2$ -Reduktion in den 14B-Zellen.

Studien an der Mamma-Karzinom-Zelllinie Mm5MT zeigten, dass der Verlust von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin mit dem Verschwinden des epithelialen Phänotyps einhergeht und dass $\alpha 2$ dem Erhalt eines differenzierten epithelialen Phänotyps dient (Sun et al. 1998). Die Verminderung der $\alpha 2$ -Integrinkette könnte demnach mit dem fibroblastenartigeren Phänotyp der 14B-Zellen im Zusammenhang stehen.

Versuche an PECA-Zellen zeigen, dass kollagengebundenes $\alpha 2\beta 1$ -Integrin durch Aktivierung von RhoA die Migration hemmt. Umgekehrt fördert, wie unten näher beschrieben, die Adhäsion von $\alpha 3\beta 1$ an Laminin-5 die Migration durch Hemmung von RhoA (Zhou und Kramer 2005). Die morphologischen Ergebnisse, Adhäsions- und Invasionsversuche (persönliche Kommunikation, Katja Nelson) wiesen auf eine stärkere Migration der 14B-Zellen hin, so dass $\alpha 2\beta 1$ -Integrin möglicherweise aufgrund der Hemmung von RhoA und einem fehlenden Bindungspartner herunterreguliert wurde.

Andere Untersuchungen an Adeno- und Pankreaskarzinomzellen zeigten allerdings eine Begünstigung des Tumorwachstums durch die Kopplung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins an den epidermalen Wachstumsfaktor EGF (Yu et al. 2000) und die Förderung der epithelial-mesenchymalen Transition durch $\alpha 2\beta 1$ -Integrin (Shintani et al. 2008). Die Divergenz der Ergebnisse verdeutlicht die Abhängigkeit der Integrinexpression von Zell- und Gewebetyp (Guo und Gianotti 2004).

Dies spiegelte sich in den heterogenen Ergebnissen zur Beziehung zwischen der Integrinexpression und dem Tumorverhalten wider. In den vorliegenden Testreihen waren $\alpha 3$ und $\beta 1$ bei den 14C-Zellen schwächer ausgeprägt als bei 14A und 14B. Verschiedene Untersucher haben den Verlust von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin auf oPECA als Kennzeichen für die zunehmende Invasivität und Entdifferenzierung der Tumorzellen beschrieben (Jones et al. 1993; Thorup et al. 1998; Ricci et al. 2002). Da $\alpha 3\beta 1$ -Integrin im gesunden Keratinozytenverband die geordnete mehrschichtige Organisation der Zellen vermittelt, schien es schlüssig, dass eine $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-Reduktion mit der ungeordneten Proliferation maligne transformierter PECA-Zellen zusammenhängt (Janes und Watt 2006). Allerdings fanden Shinohara et al. (1999) bei Zelllinien von oralen Plattenepithelkarzinomen eine Zunahme von $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ in schlecht differenzierten Tumoren. Der aktuelle Kenntnisstand über die $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-gekoppelten Signalketten spricht für eine tumorfördernde Funktion des Integrins (Kawano et al. 2001; Zhou und Kramer 2005; Ghosh et al. 2006), auch wenn eine einfache Korrelation zwischen $\alpha 3\beta 1$ -Integrinexpression und Tumorverhalten bisher nicht hergestellt werden konnte.

In der Zelllinie 14B trat ein zusätzliches Expressionsmuster auf: Die Integrinketten $\alpha 3$ und $\beta 1$ ordneten sich in punktförmigen Konglomeraten an den Zellrändern und in Zellausläufern an. Die punktförmigen Konglomerate sprachen für ein Clustering von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin in Fokalkomplexen bzw. Fokaladhäsionen. Dies setzt die Bindung an einen extrazellulären Liganden voraus. Im Fall von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin ist dies hauptsächlich Laminin-5 (Dogic et al. 1998; Nishiuchi et al. 2003). Die Aggregation von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin in Fokaladhäsionen ist somit ein weiterer Hinweis für die autokrine Sekretion von Laminin-5 durch die 14B-Zellen.

Fokaladhäsionen sind Multi-Proteinkomplexe, in denen sich Integrine und weitere Signalproteine zusammenlagern. Extrazellulär sind die Fokaladhäsionen an den Matrixkomponenten verankert, intrazellulär binden sie an das Aktinzytoskelett und ermöglichen so die Einflussnahme auf Zellform und -bewegung (Burrige et al. 1988, 1997). Die Bindung von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin an Laminin-5 und die Aggregation in Fokaladhäsionen setzt verschiedene Signalkaskaden in Gang, die zur Progression maligner Tumore beitragen. Laminin-5-gebundenes $\alpha 3\beta 1$ -Integrin aktiviert z.B. die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), welche das

Wachstum und das Überleben von Tumorzellen reguliert (Gonzales et al. 1999). Über die Inaktivierung von RhoA fördert Laminin-5-gebundenes $\alpha 3\beta 1$ -Integrin die Migration von PECA (Zhou und Kramer 2005). Die Zusammenlagerung der $\alpha 3\beta 1$ -Integrine in Fokalkontakten erhöht zudem die Invasivität von Krebszellen der Mundschleimhaut, indem die Sekretion von proteolytischen Enzymen, wie uPA (urinary-type plasminogen activator) stimuliert wird. Lymphknotenmetastasen treten in diesen Fällen häufiger auf (Ghosh et al. 2002, 2006). Die gleichförmige Verteilung von $\alpha 3$ und $\beta 1$ sprach für eine Heterodimerisierung zu $\alpha 3\beta 1$ -Integrin. Durch die Aggregation in Fokaladhäsionen könnte das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin demnach Signale aktiviert haben, die im weiteren Verlauf in den 14B-Zellen die Ausbildung von Zellausläufern initiierten. Die Stabilisierung von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-haltigen Zellausläufern erfolgt über die Adhäsion an Laminin-5 (Choma et al. 2004). Wie oben erwähnt, könnte das Vorhandensein von Laminin-5 zur Auflösung von Zell-Zell-Kontakten, zur $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-abhängigen Zell-Matrix-Interaktion und zur epithelial-mesenchymalen Transition beigetragen haben, was in einer erhöhten Tumorinvasivität resultierte (Kawano et al. 2001). Die autokrine Sekretion von Laminin-5 stellt einen Selektionsvorteil maligne transformierter Zellen dar, da dies das Überleben der Tumorzellen unabhängig von der Basalmembran ermöglicht (Zahir et al. 2003). Im Gegensatz zu 14A und 14C könnte 14B die einzige Zelllinie sein, welche selbständig Laminin-5 sezerniert, denn auch die oben erwähnte Ausbildung von Hemidesmosomen wurde nur auf der Zelllinie 14B beobachtet und ist von der Bindung an Laminin-5 abhängig.

Die Integrinexpression der Zelllinien 14A, 14B und 14C wurde bislang nicht beschrieben. Diese zeigte eine Anordnung der Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ im Bereich der Zell-Zell-Kontakte, wohingegen $\alpha 6$ und $\beta 4$ die basale Zellseite bevorzugten. Zusätzlich waren Integrinkonglomerate im Bereich der Zellausläufer nachweisbar. Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob Östrogen und seine Antagonisten Veränderungen in der Integrinausprägung hervorrufen.

5.3 Einfluss von Hormonen auf die Integrinexpression

5.3.1 Östradiol

Untersuchungen von Nelson et al. (2008) zeigten, dass Östradiol das Wachstum und die Adhäsion der Zelllinien 14B und 14C hemmt. Die Ankopplung der Zellen an die extrazelluläre Matrix und das Zellwachstum hängen eng miteinander zusammen. Da Integrine entscheidend an der Zell-Matrix-Adhäsion beteiligt sind (Janes und Watt 2006), besteht die Möglichkeit, dass

Östradiol über Alterationen der Integrine Einfluss auf Wachstum und Adhäsion nimmt. In den durchgeführten Untersuchungen veränderte Östradiol bei keiner Zelllinie die Oberflächenexpression der Integrine $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$. Dagegen reduzierte Östradiol in der Zelllinie 14B die Menge an $\beta 1$ -mRNA (Nelson et al. 2008).

Normalerweise resultiert eine verminderte Integrintranskription in einer herabgesetzten Proteinsynthese. Denkbar ist, dass die Oberflächenexpression durch die Stabilität der Integrine oder die Rekrutierung von Integrinen aus einem zytoplasmatischen Pool über eine gewisse Zeit aufrechterhalten blieb (Ning et al. 2007). Dann führte die Behandlungsdauer von 22 Stunden zu einer verminderten Transkription von $\beta 1$, doch für Effekte in der Oberflächenexpression wären längere Applikationszeiten notwendig gewesen. Die wachstumshemmende Wirkung von Östradiol setzte ebenfalls erst am 4. Behandlungstag ein (Nelson et al. 2008), was ein weiterer Hinweis auf die verlängerte Reaktionszeit zwischen Medikamentenadministration und Wirkungseintritt war.

Sollte eine prolongierte Behandlungszeit die Oberflächenmenge an $\beta 1$ drosseln, hätte dies eine herabgesetzte Zell-Matrix-Adhäsion zur Folge gehabt. $\beta 1$ ist der einzige Heterodimerisierungspartner der Integrinketten $\alpha 2$ und $\alpha 3$. Ein $\beta 1$ -Mangel resultiert somit in einer verminderten Affinität zu Kollagen und Laminin. Die Adhäsionsminderung an Laminin-1 nach Östradiolbehandlung wurde bereits nachgewiesen (Nelson et al. 2008).

Möglich ist auch, dass die verminderte $\beta 1$ -Transkription die Integrinfunktion trotz der unveränderten Integrinoberflächenexpression beeinträchtigte. Eine Voraussetzung für das Überleben von Zellen ist die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix und die integrinvermittelte Zell-Matrix-Kommunikation. So führt eine verminderte $\beta 1$ -Integrinexpression bzw. -funktion in Brustkrebszellen zu einer verstärkten Apoptose (Dabrowska et al. 2001). Ob die Östradiol-induzierte Abnahme von $\beta 1$ -mRNA für den Patienten von Vorteil im Sinne einer verstärkten Apoptose der Tumorzellen oder eher von Nachteil im Sinne einer erleichterten Metastasierung durch Ablösung der Karzinomzellen vom Zellverband ist, müssen weitere Untersuchungen klären.

5.3.2 ICI 182,780

Nach Zusatz von ICI fand in den 14C-Zellen eine Relokalisation der $\alpha 6$ -Integrinkette in Hemidesmosomen statt, ohne dass dies von quantitativen $\alpha 6$ -Veränderungen begleitet wurde. Der topographische Wandel war somit vermutlich auf Modulationen im funktionellen Status des

$\alpha 6$ -Integrins zurückzuführen. Diese könnte im Zusammenhang mit einer vermehrten Transkription von $\beta 1$ -mRNA stehen (Helmstaedter 2006). Es gibt Hinweise, dass die $\beta 1$ -Integrine sich an der Formierung von Hemidesmosomen beteiligen. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher nicht erforscht. Diskutiert wird eine Beteiligung von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin an der basalen Lokalisation von $\alpha 6\beta 4$ -Integrin, z.B. durch die Bildung von „prä-hemidesmosomalen“ Clustern, welche als Vorlage für die Ansammlung von Hemidesmosomen dienen (Sterk et al. 2000). Unerwarteterweise führte die vermehrte Transkription des $\beta 1$ -Integrins zu keiner Zunahme der Oberflächenexpression. Denkbar ist, dass die Translation in das fertige Protein unterbrochen war. Die Verschiebung der $\alpha 6$ -Integrinkette ließ allerdings vermuten, dass die vermehrte $\beta 1$ -Transkription bereits Signalketten in Gang setzte, die zur Reformierung von hemidesmosomalen Strukturen führten.

Ebenso denkbar sind andere Mechanismen, durch welche ICI die Formierung von Hemidesmosomen förderte:

Die Behandlung von Karzinomzellen mit EGF bewirkt die Mobilisierung von $\alpha 6\beta 4$ -Integrin aus Hemidesmosomen in diffuse Verteilungsmuster und aktinhaltige Motilitätsstrukturen (Mercurio und Rabinovitz 2001; Santoro et al. 2003; Wilhelmsen et al. 2007). Zwischen dem ER und dem EGF-Rezeptor besteht ein „crosstalk“. ICI könnte durch die komplette Blockade aller ER-Aktionen die Wirkung von EGF unterbinden (Howell 2006) und so die Redistribution von $\alpha 6\beta 4$ -Integrin in hemidesmosomale Strukturen induzieren.

Ähnliche Effekte treten nach Behandlung der Brustkrebszelllinie MDA-MB 231 mit TGF- $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$) auf: Die Rekrutierung von $\alpha 6\beta 4$ -Integrin in diskreten peripheren hemidesmosomalen Strukturen geht mit einer geringeren Invasivität der Zellen einher (Jones et al. 1997). TGF- $\beta 1$ ist ein Zytokin, dem proliferationshemmende Eigenschaften zugeschrieben werden. Für Tamoxifen ist bereits eine TGF- $\beta 1$ -induzierende Wirkung auf Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs nachgewiesen (Tavassoli et al. 2002). Dagegen sind für ICI bisher nur TGF- $\beta 1$ -abschwächende Effekte auf Astrozyten beschrieben (Dhandapani et al. 2005). Eventuell aktiviert ICI in Abhängigkeit vom Zelltyp die TGF- $\beta 1$ -Expression und erreicht auf den 14C-Zellen eine Wiederherstellung von stabilen Hemidesmosomen und eine Proliferationshemmung.

Auch der Zusatz von Laminin-5 fördert die Relokalisation von $\alpha 6\beta 4$ -Integrin in Hemidesmosomen (Baker et al. 1996; Geuijen und Sonnenberg 2002). Es wurde bereits nachgewiesen, dass ICI die Adhäsion von 14C an Laminin-1 reduziert (Nelson et al. 2008). Möglicherweise moduliert ICI die Produktion der Matrixkomponenten. Jedoch ist die Wirkweise von ICI auf oPECA bislang ungeklärt.

Auffällig war, dass die $\beta 4$ -Integrinketten sich nach ICI-Administration nicht im gleichen Maße in hemidesmosomalen Strukturen einfanden, wie die $\alpha 6$ -Integrinuntereinheiten. Es waren lediglich ansatzweise polarisierte basale Cluster erkennbar. Eventuell hätte auch hier eine längere Behandlungszeit geholfen, eine ausgeprägtere Reformierung von Hemidesmosomen zu induzieren.

Vor dem Hintergrund, dass ICI in den 14C-Zellen die Transkription von $\beta 1$ -mRNA erhöht (Helmstaedter 2006), ist die Dissoziation des $\alpha 6\beta 4$ -Integrins denkbar. Die Integrinkette $\alpha 6$ kann sowohl mit $\beta 4$ als auch mit $\beta 1$ Heterodimere bilden. Eine Verschiebung von $\alpha 6\beta 4$ zu $\alpha 6\beta 1$ hat nachhaltigen Einfluss auf das Zellverhalten, z.B. durch den Austausch des extrazellulären Liganden, Formierung anderer Adhäsionskomplexe und Modulationen in der Ausbildung von Motilitätsstrukturen (Dogic et al. 1998; Nishiuchi et al. 2003).

Vielfach wird $\alpha 6\beta 1$ mit vermehrter Migration und Invasion in Zusammenhang gebracht, da es die Transkription des angiogenesefördernden VEGF (vascular endothelial growth factor) stimuliert (Chung und Mercurio 2004) und möglicherweise die Bindung an Laminin-ummantelte Strukturen, wie Gefäße und Nerven, unterstützt (Cortesina et al. 1995; Davis et al. 2001). Orale PECA-Zellen nutzen $\alpha 6\beta 1$ zur Migration an Laminin-1 (Zhang et al. 1996). Da ICI hingegen die Adhäsion von 14C an Laminin-1 reduziert (Nelson et al. 2008), ist die Heterodimerisierung von $\alpha 6\beta 1$ und die damit verbundene Zunahme der Malignität unwahrscheinlich.

Die Dissoziation von $\alpha 6\beta 4$ -Integrin kann durch verminderte Zell-Matrix-Interaktion zu einer Ablösung der Zellen von der Unterlage führen. Dies könnte im programmierten Zelltod – der Apoptose – enden. Für Brustkrebs ist bereits die apoptoseinduzierende Wirkung von ICI nachgewiesen (Ellis et al. 1997), indem ICI die Synthese apoptosesupprimierender zytoplasmatischer Proteine aus der bcl-2-Familie hemmt (Diel et al. 1999). Über eine Modulation der Signalkaskaden kann ICI somit die Funktion und Expression der Integrine verändern und die Apoptose fördern. In Versuchen zur Apoptoseinduktion und Integrinexpression lässt sich diese Möglichkeit austesten.

Auf der Zelllinie 14B waren immunfluoreszenzmikroskopisch nach Zusatz von ICI keine Änderungen der Integrinketten $\alpha 6$ und $\beta 4$ sichtbar. Allerdings veränderte sich die Anordnung von $\alpha 3$ und $\beta 1$: Während sie in unbehandelten 14B-Zellen hauptsächlich punktförmig in Fokaladhäsionen an der Zellmembran und auf den langen Zellausläufern vorkamen, verteilten sich $\alpha 3$ und $\beta 1$ nach der ICI-Behandlung bandförmig an den Zell-Zell-Grenzen. Die Pseudopodien zeigten kaum noch positive $\alpha 3$ - und $\beta 1$ -Signale. Die mit ICI behandelten Zellen bildeten einen ortsständigen Zellverband. In der Tat übernimmt das Integrin $\alpha 3\beta 1$ -Integrin sehr

widersprüchliche Aufgaben in der Zellorganisation. Es repräsentiert neben dem Integrin $\alpha 6 \beta 4$ den einzigen Laminin-5-Liganden in der Basalmembran. Wenn sich $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin in Fokaladhäsionen an Laminin-5 heftet, entwickeln die Zellen einen migratorischen Phänotyp. Verschiebt sich $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin an die Zell-Zell-Grenzen, übernehmen $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin-haltige Hemidesmosomen die Adhäsionen an die Basalmembran, was eher dem Phänotyp einer „ruhenden Zelle“ entspricht. Das Integrin $\alpha 3 \beta 1$ trägt somit je nach Funktionszustand und extrazellulärem Liganden sowohl zur Zelladhäsion als auch zur Zellwanderung bei (Abbildung 5.1) (Kawano et al. 2001; Giannelli et al. 2002; Choma et al. 2004).

ICI könnte also das Tumorverhalten beeinflussen, indem es Lageänderungen und eine Dissoziation der Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\alpha 6$ und $\beta 4$ induziert. Hier sind weitere Studien mit Doppelfärbungen sinnvoll, um einen Transfer der Integrine $\alpha 6 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 4$, $\alpha 3 \beta 1$ und $\alpha 2 \beta 1$ aufzudecken (Garzino-Demo et al. 1998; Guo und Giancotti 2004). Von Interesse sind zudem Studien, die klären, inwiefern ICI die Produktion von Matrixkomponenten moduliert.

In der Zelllinie 14A induzierte ICI keine Änderungen in der Integrinexpression. Gleiche Ergebnisse lieferten die Versuche zur Integrintranskription mittels Northern Blot und zur Integrinquantifizierung mittels Flowzytometrie. Die 14A-Zellen exprimieren hauptsächlich den ER β (Nelson et al. 2008). Eventuell wurden die für 14B- und 14C-Zellen beschriebenen ICI-induzierten Integrinveränderungen über den ER α vermittelt. Ursprünglich wurde angenommen, dass ICI den ER α vollständig blockiert (Osborne et al. 2000). Jedoch konnte gezeigt werden, dass ICI am ER α die Transkription verschiedener Gene stimuliert, die das Zellverhalten beeinflussen (Wang et al. 2004). Dies könnte erklären, warum ICI in den ER α -positiven Zelllinien 14B und 14C mehr Integrinvariationen hervorruft als in den ER α -negativen 14A-Zellen.

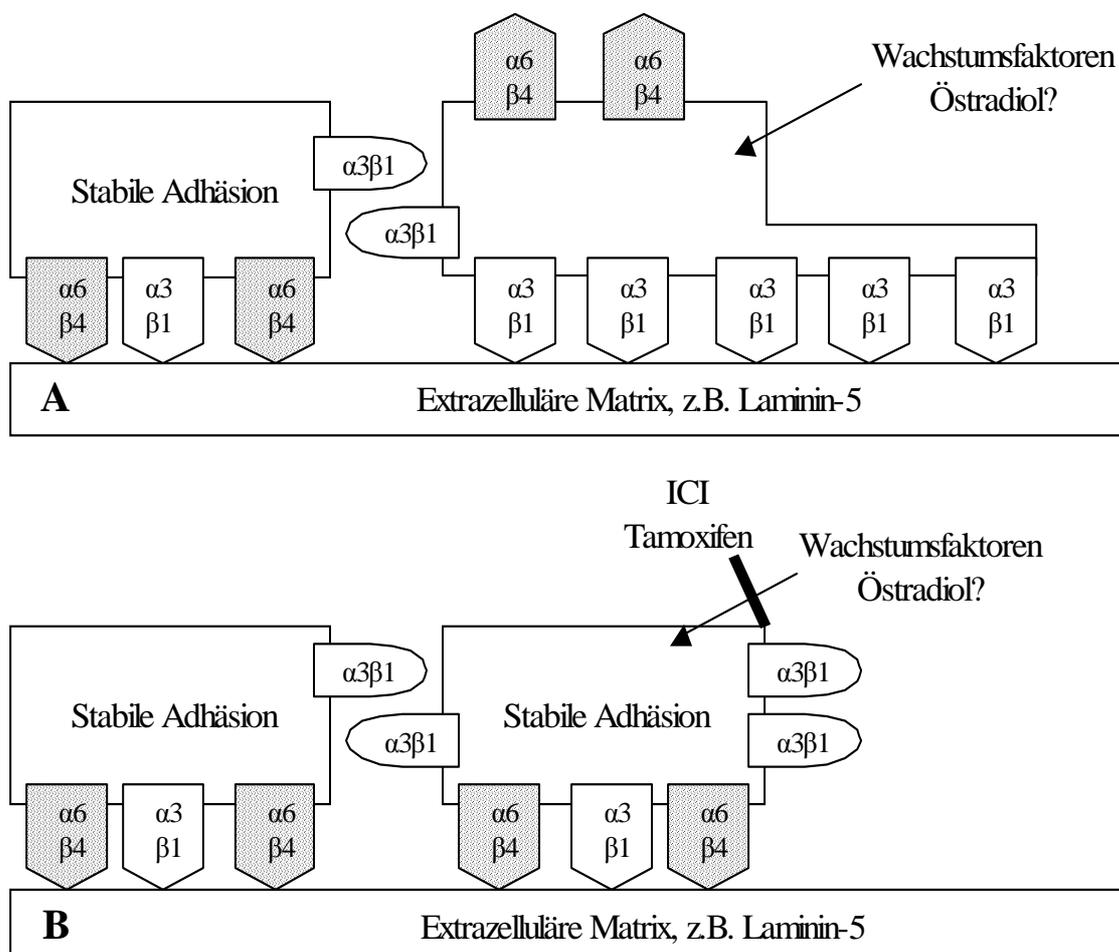


Abbildung 5.1: Modell für die Rolle von $\alpha3\beta1$ -Integrin in 14B und 14C während der Migration. (A) In migrierenden Keratinozyten ordnet sich $\alpha3\beta1$ -Integrin in Fokaladhäsionen an und steuert die Bildung und Bewegung der Zellausläufer. (B) Bei Migrationshemmung (eventuell durch ICI oder Tamoxifen) verlagert sich $\alpha3\beta1$ -Integrin an die Zell-Zell-Grenzen und stabilisiert den Zellverband. (In Anlehnung an Choma et al. 2004)

5.3.3 Tamoxifen

In 14B verlagerten sich nach Tamoxifenapplikation die Integrinketten $\alpha3$ und $\beta1$ von den Fokaladhäsionen und Pseudopodien an die Zell-Zell-Grenzen. Die Veränderungen ähnelten den bei ICI beschriebenen Verschiebungen von $\alpha3$ und $\beta1$. Möglicherweise waren ähnliche Regulationsmechanismen beteiligt, da ICI und Tamoxifen beide den Östrogenrezeptor blockieren. Allerdings hemmt ICI östrogene Wirkungen komplett (Osborne et al. 2004),

wohingegen Tamoxifen ein partieller Östrogenrezeptorantagonist ist und über den ER α zum Teil östrogene Wirkungen vermittelt (Paech et al. 1997; Kim et al. 2007).

Parallel war nach Tamoxifen-Administration die Transkription der β 1-Integrinuntereinheit auf den 14B-Zellen herabgesetzt. Ebenso verminderte Östradiol die β 1-mRNA-Level (Nelson et al. 2008). Da dieser Effekt nur bei der ER α -positiven Zelllinie 14B auftrat, schienen Östradiol und Tamoxifen östrogenagonistisch die Wirkung über den ER α zu vermitteln. Eine wichtige Aufgabe des ER β liegt in der Modulation des ER α (Paech et al. 1997; Howell 2006). Daher schien die Anwesenheit des ER β vor der Transkriptionsminderung von β 1 zu schützen, denn bei den ER β -haltigen Zelllinien 14A und 14C führte die Behandlung mit Östrogen und Tamoxifen zu keinerlei Veränderungen der Integrine auf Transkriptions- und Proteinebene.

Alternativ wäre die Beteiligung von membranären Rezeptoren möglich, welche Steroiden schnelle, nicht-genomische Effekte erlauben. Diese vermitteln u. a. eine ER-unabhängige agonistische Wirkung von ICI und Tamoxifen (Thomas et al. 2005).

Eventuell war in den 14B-Zellen die Herunterregulierung der β 1-Integrin-mRNA verantwortlich für die veränderte α 3- und β 1-Distribution unter Tamoxifen. Gleichzeitig zeigte die Flowzytometrie eine signifikante α 3-Abnahme nach Tamoxifenbehandlung (Nelson et al. 2008). In Plattenepithelkarzinomen der Vulva vermindert eine β 1-Reduktion die α 3-Expression. Dies mag damit zusammenhängen, dass α 3 ohne seinen Heterodimerisierungspartner β 1 instabil wird (Brockbank et al. 2005). Die Verschiebung von α 3 und β 1 aus den Zellausläufern an die Zell-Zell-Grenzen könnte im fehlenden Nachschub des α 3 β 1-Integrins begründet sein. Ob dies Ausdruck einer verminderten Migrationsfreude bzw. Malignität ist, müssen weitere Untersuchungen klären.

5.3.4 Divergente Integrinexpression unter hormoneller Modulation

Unter Zugabe von Östrogen, ICI und Tamoxifen veränderten sich die Integrinmuster der Zelllinien 14A, 14B und 14C. Dies ließ einen Einfluss hormoneller Regulationsmechanismen auf oPECA vermuten. Allerdings variierten die Integrinalterationen erheblich zwischen den Zelllinien, was in ihrem unterschiedlichen Phänotyp begründet liegen mag.

Dies wird durch die abweichenden klinischen Beobachtungen zur Wirkung von Östrogen im Mundbodenbereich bestätigt: Einige Untersucher fanden zytologisch fassbare Veränderungen an der Mundschleimhaut während des weiblichen Zyklus (Freitag et al. 1971) und hyperplastische Zahnfleischveränderungen bei jeder fünften bis siebten schwangeren Frau (Beck 1977). Lokale

Östradiol-Präparate sollen die Proliferation von atrophischer Mundschleimhaut anregen (Felgentreff et al. 1980). Andere Studien konnten keine Effekte von Östrogen auf die Mundschleimhaut (Pisanty et al. 1975) und keine zyklusabhängigen Mundschleimhautveränderungen nachweisen (Leimola-Virtanen et al. 1997).

Ein Zusammenhang mit dem Östrogenrezeptorstatus ist möglich. Die drei untersuchten Zelllinien weisen einen unterschiedlichen Gehalt an ER α und ER β auf (Nelson et al. 2007). Aus der Existenz zweier verschiedener Östrogenrezeptoren lassen sich die mitunter widersprüchlichen pharmakologischen Wirkungen von Östrogenantagonisten in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Konzentration erklären (Kuiper und Gustafsson 1997). Dieses Modell belegt eindrucksvoll, dass selbst Rezidive eines Ausgangstumors eine divergente ER-Expression und unterschiedliche Reaktionsweisen auf Hormonbehandlung aufweisen. Somit ist es sinnvoll, bei Versuchen mit selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMS) den Östrogenrezeptorstatus auf den Zelllinien zu berücksichtigen.

Auch in der Literatur werden die Wirkungen der Antiöstrogene widersprüchlich beurteilt. Selbst bei Studien zur Wirkung von Antiöstrogenen an der gleichen Zelllinie MCF-7 unterscheiden sich die Ergebnisse hinsichtlich der Fähigkeit, Apoptose zu induzieren. Daher werden mehrere co-existierende Signalverarbeitungswege angenommen, die durch Antiöstrogene aus bisher ungeklärter Ursache in Gang gesetzt werden. Von Bedeutung sind eventuell unterschiedliche Phänotypen einer Zellart (Diel et al. 1999) sowie co-regulierende Proteine, die in Assoziation mit dem Östrogenrezeptor divergierende Antworten auslösen (Kuiper et al. 1998).

Beispielsweise wird durch eine Interaktion des EGF-Rezeptors mit dem ER die MAPK stimuliert, was die Proliferation von Karzinomzellen fördert (Fan et al. 2007). Karzinome der Mundschleimhaut besitzen EGF-Rezeptoren (Hiraishi et al. 2006). So könnten in vivo Östrogen und seine Antagonisten über die Modulation von Wachstumsfaktoren orale Tumorzellen beeinflussen.

Zusätzlich könnte das Wachstumsstadium der Zellen eine Rolle spielen. Dieser Einfluss sollte in dieser Arbeit weitestgehend ausgeschaltet werden, indem Präparate mit einer Passage zwischen 10 und 15 sowie einer vergleichbaren Zelldichte zwischen 80% und 90% Anwendung fanden.

Für eine direkte Wirkung von Steroidhormonen auf eine Zelle ist die Expression von hochaffinen Rezeptoren notwendig. Die Gebärmutter, die ein typisches Östrogenzielgewebe ist, sowie Brusttumorzellen enthalten einige Tausend hochaffine Östrogenrezeptoren pro Zelle. Immunhistochemisch steht der Nachweis von Östrogenrezeptoren auf der Mundschleimhaut aus. Daher ist ungeklärt, ob Östrogen und seine Antagonisten trotz des Vorkommens von

Östrogenrezeptor-mRNA von der Mundschleimhaut in relevanter Höhe gebunden werden, denn die Bestätigung von Östrogenrezeptor-mRNA garantiert nicht zwangsläufig die Translation in das Protein (Leimola-Virtanen et al. 2000). Mit der Entdeckung von non-genomischen Steroidwirkungen über Membranrezeptoren eröffnen sich weitere Möglichkeiten, wie östrogene Wirkungen moduliert werden können (Thomas et al. 2005). Die geschilderten Integrinveränderungen unter ICI und Tamoxifen deuten grundsätzlich darauf hin, dass die untersuchten Zelllinien östrogenen Regulationsmechanismen unterliegen.

Versuche an Zellkulturen erlauben erste Aussagen über das Verhalten von Tumorzellen aufgrund der standardisierten Versuchsbedingungen und der besseren Verfügbarkeit gegenüber physiologischem Gewebe aus Mundbodentumoren. Vergleiche der ursprünglichen Tumorzellen in vivo mit den Langzeitzelllinien in vitro ergeben keine wesentlichen Abweichungen bezüglich der Tumoreigenschaften. Daher besteht Grund zu der Annahme, dass die beobachtete Integrinausprägung auf den Zelllinien den in vivo-Verhältnissen entsprechen (Lansford et al. 1999). Wie aber anhand der Kooperation zwischen dem ER und dem EGF-Rezeptor geschildert, bildet in höheren Organismen nicht die einzelne Zelle, sondern das Gewebe eine Funktionseinheit. Alterationen der Integrinexpression unter hormoneller Modulation könnten im Tierexperiment sichtbar werden. Die in vitro beschriebenen Integrinveränderungen unter hormoneller Modulation zeigen, dass SERMs Tumoren des Mundbodens beeinflussen. Insbesondere ICI führt zu verschiedenen Integrinalterationen. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob sich diese Effekte bei der Behandlung von Mundbodentumoren nutzen lassen. Dabei sollten längere Behandlungszeiten und die Abhängigkeit vom ER-Status Berücksichtigung finden.

6 Zusammenfassung

Integrine sind Adhäsionsproteine in der Membran von Zellen, die intrazellulär an das Zytoskelett und extrazellulär an die Matrixkomponenten binden. Indem sie sich an der Zelladhäsion und Signalübertragung beteiligen, nehmen sie Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen und damit auf eine geordnete Funktion im Gewebeverband. Maligne Tumoren sind durch unbegrenztes Wachstum, Migration und Invasion gekennzeichnet. Auch daran beteiligen sich die Integrine, indem ihre Expressionsmuster in den Tumorzellen abgewandelt sind. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob Östradiol und seine Antagonisten ICI 182,780 (ICI) und Tamoxifen die Integrinexpression verändern und auf diese Weise das Tumorverhalten beeinflussen können.

Hierzu wurden die Ausprägung und Modulationsmöglichkeiten der Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ auf drei rezidivierenden Zelllinien des Mundbodens UM-SCC-14A (14A), UM-SCC-14B (14B) und UM-SCC-14C (14C) unter dem Immunfluoreszenzmikroskop untersucht.

Die Integrinketten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ traten hauptsächlich an den Zell-Zell-Grenzen auf. Auf den 14B-Zellen waren sie zusätzlich in Fokaladhäsionen und an der Membran von Pseudopodien zu beobachten. Die Integrinketten $\alpha 6$ und $\beta 4$ kamen basal und in Zellausläufern zur Darstellung. Dabei waren $\alpha 6$ und $\beta 4$ auf den 14A und 14C-Zellen diffus-basal verteilt, während die Integrinketten auf den 14B-Zellen in hemidesmosomalen Strukturen polarisiert waren.

Die Behandlung mit ICI führte auf der Zelllinie 14C zu einer Polarisierung der Integrinkette $\alpha 6$ in hemidesmosomalen Strukturen.

Unter dem Einfluss von 5 μM Tamoxifen und ICI ergab sich auf den 14B-Zellen eine Umverteilung von $\alpha 3$ und $\beta 1$ von den Fokaladhäsionen zu den Zell-Zell-Grenzen.

Aus den durchgeführten Versuchen ergaben sich folgende Schlussfolgerungen:

1. Die hormonelle Behandlung von Karzinomzellen des Mundbodens kann zu Alterationen der Integrinmuster der Integrine $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ führen.
2. Die Integrinexpression ist durch ICI und Tamoxifen variierbar. Dies könnte ein Mechanismus für die tumorhemmende Wirkung der Antiöstrogene sein.
3. Die Alteration der Oberflächenexpression korrelierte nicht mit einer im Rahmen einer weiteren Dissertation gefundenen Veränderung der Transkription.
4. Höhere Konzentrationen der Antiöstrogene (5 μM) führten zu ausgeprägteren Änderungen in der Integrinexpression.

Weiterführende Untersuchungen zur Wirkung antiöstrogener Agenzien in oPECA sollten ein besonderes Augenmerk auf den Östrogenrezeptorstatus der Tumorzellen und den Einsatz hochdosierter Antiöstrogene richten.

7 Literaturverzeichnis

Abercrombie M, Heaysman J, Pegrum SM: The locomotion of fibroblasts in culture. *Exp Cell Res* 1971, 67:359-67.

Albelda SM: Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 1993, 68:4-17.

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

Baker SE, Hopkinson SB, Fitchmun M, et al.: Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J Cell Sci* 1996, 109:2509-20.

Beck L: Gynäkologische und perinatologische Fragen im Zusammenhang mit der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde. *Dtsch Zahnärztl Z* 1977, 32:660-3.

Berndt A, Hyckel P, Könnecker A, Kosmehl H: Dreidimensionales In-vitro-Invasionsmodell für orale Plattenepithelkarzinome. *Mund Kiefer GesichtsChir* 1998, 2:256-60.

Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS: Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83:2496-500.

Borradori L, Koch PJ, Niessen CM, Erkeland S, van Leusden MR, Sonnenberg A: The localization of bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in hemidesmosomes is mediated by its cytoplasmic domain and seems to be regulated by the beta4 integrin subunit. *J Cell Biol* 1997, 136:1333-47.

Borradori L, Sonnenberg A: Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* 1999, 112:411-8.

Brakebusch C, Fässler R: beta 1 integrin function in vivo: adhesion, migration and more. *Cancer Metastasis Rev* 2005, 24:403-11.

Brockbank EC, Bridges J, Marshall CJ, Sahai E: Integrin beta1 is required for the invasive behaviour but not proliferation of squamous cell carcinoma cells in vivo. *Br J Cancer* 2005, 92:102-12.

Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C: Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 1988, 4:487-525.

Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M, Zhong C: Focal adhesion assembly. *Trends Cell Biol* 1997, 7:342-7.S 5

Carey TE, Wolf GT, Hsu S, Poore J, Peterson K, McClatchey KD: Expression of A9 antigen and loss of blood group antigens as determinants of survival in patients with head and neck squamous carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1987, 96:221-30.

- Carey TE, Laurikainen L, Ptok A, et al.: Culture conditions affect expression of the alpha 6 beta 4 integrin associated with aggressive behavior in head and neck cancer. *Adv Exp Med Biol* 1992, 320:69-79.
- Carey TE: Head and neck tumor cell lines. In: Hay RJ, Park J-G, Gazdar A, eds: Atlas of human tumor cell lines. London: Academic Press, Inc., 1994:79-120.
- Carter WG, Wayner E, Bouchard TS, Kaur P: The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J Cell Biol* 1990, 110:1387-404.
- Cavallaro U, Christofori G: Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004, 4:1130-2.
- Chattopadhyay N, Wang Z, Ashman LK, Brady-Kalnay SM, Kreidberg JA: alpha3beta1 integrin-CD151, a component of the cadherin-catenin complex, regulates PTPmu expression and cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 2003, 163:1351-62.
- Chia S, Gradishar W, Mauriac L, et al.: Double-blind, randomized placebo controlled trial of fulvestrant compared with exemestane after prior nonsteroidal aromatase inhibitor therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive, advanced breast cancer: results from EFACT. *J Clin Oncol* 2008, 26:1664-70.
- Chodniewicz D, Klemke RL: Guiding cell migration through directed extension and stabilization of pseudopodia. *Exp Cell Res* 2004, 301:31-7.
- Choma DP, Pumiglia K, DiPersio CM: Integrin alpha3beta1 directs the stabilization of a polarized lamellipodium in epithelial cells through activation of Rac1. *J Cell Sci* 2004, 117:3947-59.
- Christensen ME: The EGF receptor system in head and neck carcinomas and normal tissues. Immunohistochemical and quantitative studies. *Dan Med Bull* 1998, 45:121-34.
- Chung J, Mercurio AM: Contributions of the alpha6 integrins to breast carcinoma survival and progression. *Mol Cells* 2004, 17:203-9.
- Cortesina G, Sacchi M, Bussi M, et al.: Integrin expression in head and neck cancers. *Acta Otolaryngol* 1995, 115:328-30.
- Dabrowska M, Palka J, Wolczynski S, Pietruczuk M, Osada J: Potential role of beta 1 integrin and collagen biosynthesis in estrogen-dependent reduction of apoptosis in tamoxifen-treated breast cancer cells. *Gynecol Obstet Invest* 2001, 51:248-53.
- Davis TL, Cress AE, Dalkin BL, Nagle RB: Unique expression pattern of the alpha6beta4 integrin and laminin-5 in human prostate carcinoma. *Prostate* 2001, 46:240-8.
- Dhandapani KM, Wade FM, Mahesh VB, Brann DW: Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17 β -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology* 2005, 146:2749-59.

- Diel P, Smolnikar K, Michna H: The pure antiestrogen ICI 182780 is more effective in the induction of apoptosis and down regulation of BCL-2 than tamoxifen in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 1999, 58:87-97.
- Dogic D, Rousselle P, Aumailley M: Cell adhesion to laminin 1 or 5 induces isoform-specific clustering of integrins and other focal adhesion components. *J Cell Sci* 1998, 111:793-802.
- Downer CS, Watt FM, Speight PM: Loss of alpha 6 and beta 4 integrin subunits coincides with loss of basement membrane components in oral squamous cell carcinomas. *J Pathol* 1993, 171:183-90.
- Dyce OH, Ziober AF, Weber RS, et al.: Integrins in head and neck squamous cell carcinoma invasion. *Laryngoscope* 2002, 112:2025-32.
- Ellis PA, Sacconi-Jotti G, Clarke R, et al.: Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1997, 72:608-13.
- Fan P, Wang J, Santen RJ, Yue W: Long-term treatment with tamoxifen facilitates translocation of estrogen receptor alpha out of the nucleus and enhances its interaction with EGFR in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 2007, 67:1352-60.
- Felgentreff K, Itrich G, Breuel H, Schubert R: Zur Frage der Reaktivierung atrophischer Mundschleimhaut durch lokale Applikation von Östradiol-17beta. *Zahn-, Mund- u. Kieferheilkd.* 1980, 68:135-9.
- Forabosco A, Crisuolo M, Coukos G, et al.: Efficacy of hormone replacement therapy in postmenopausal women with oral discomfort. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992, 73:570-4.
- Frasor J, Stossi F, Danes JM, Komm B, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS: Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells. *Cancer Res* 2004, 64:1522-33.
- Freitag V, Rindt W, Volz-Kinzler U: Über die Wirkung von Ovulationshemmern auf rezidivierende Aphthen der Mundschleimhaut. *Dtsch Zahnärztl Z* 1971, 26:826-9.
- Frisch SM, Ruoslahti E: Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 1997, 9:701-6.
- Furr BJ, Jordan VC: The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther* 1984, 25:127-205.
- Garzino-Demo P, Carrozzo M, Trusolino L, Savoia P, Gandolfo S, Marchisio PC: Altered expression of alpha 6 integrin subunit in oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant lesions. *Oral Oncol* 1998, 34:204-10.
- Gelmann EP: Tamoxifen for the treatment of malignancies other than breast and endometrial carcinoma. *Semin Oncol* 1997, 24:S1-65-S1-70.
- Geuijen CA, Sonnenberg A: Dynamics of the alpha6beta4 integrin in keratinocytes. *Mol Biol Cell* 2002, 13:3845-58.

Ghosh S, Munshi HG, Sen R, et al.: Loss of adhesion-regulated proteinase production is correlated with invasive activity in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002, 95:2524-33.

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

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

Gilcrease MZ, Zhou X, Welch K: Adhesion-independent alpha6beta4 integrin clustering is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Res* 2004, 64:7395-8.

Gonzales M, Haan K, Baker SE, et al.: A cell signal pathway involving laminin-5, alpha3beta1 integrin, and mitogen-activated protein kinase can regulate epithelial cell proliferation. *Mol Biol Cell* 1999, 10:259-70.

Grossmann J: Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis-anoikis". *Apoptosis* 2002, 7:247-60.

Guarino M, Rubino B, Ballabio G: The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 2007, 39:305-18.

Guo W, Giancotti FG: Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5:816-26.

Hansen RK, Bissell MJ: Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocrin-Related Cancer* 2000, 7:95-113.

Helmstaedter V: Der Einfluss von 17-beta-Estradiol, Tamoxifen und ICI 182,780 (Faslodex) auf die mRNA-Expression der Integrinuntereinheiten alpha6, beta1 und beta4 in den Plattenepithelkarzinomzelllinien UM-SCC 14A, 14B und 14C. Berlin: Medizinische Fakultät der Charité 2006, S. 37.

Herman B: *Fluorescence Microscopy*. 2. Ed. Edited by Leonard J. Oxford: Bios Scientific, 1998:1-25.

Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Negoro K, Fujita S: Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res* 2006, 12:87-91.

Hoffmann TK, Bojar H, Eckel J, et al.: Effects of tamoxifen on human squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Anticancer Drugs* 2002, 13:521-31.

Hood JD, Cheresch DA: Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:91-100.

Horwitz AF: *Integrine*. Spektrum der Wissenschaft 1998, 1:86-94.

Howell A: Pure oestrogen antagonists for the treatment of advanced breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006, 13:689-706.

- Howell A, Robertson JF, Quaresma Albano J, et al.: Fulvestrant, formerly ICI 182,780, is as effective as anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing after prior endocrine treatment. *J Clin Oncol* 2002, 20:3396-403.
- Hutcheson IR, Knowlden JM, Madden TA, et al.: Oestrogen receptor-mediated modulation of the EGFR/MAPK pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 2003, 81:81-93.
- Hynes RO: Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992, 69:11-25.
- Iype T, Jayasree K, Sudhakaran PR: Modulation of alpha2beta1 integrin changes during mammary gland development by beta-oestradiol. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1499:232-41.
- Izzard CS, Lochner LR: Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci* 1976, 21:129-59.
- Janes SM, Watt FM: New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2006, 6:175-83.
- Jin H, Varner J: Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer* 2004, 90:561-5.
- Jones J, Sugiyama M, Watt FM, Speight PM: Integrin expression in normal, hyperplastic, dysplastic and malignant oral epithelium. *J Pathol* 1993, 169:235-43.
- Jones JL, Royall JE, Critchley DR, Walker RA: Modulation of myoepithelial-associated alpha6beta4 integrin in a breast cancer cell line alters invasive potential. *Exp Cell Res* 1997, 235:325-33.
- Jordan VC: Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell* 2004, 5:207-13.
- Karim-Kos HE, de Vries E, Soerjomataram I, Lemmens V, Siesling S, Coebergh JW: Recent trends of cancer in Europe: A combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *Eur J Cancer* 2008, 44:1345-89.
- Kawahara E, Tokuda R, Nakanishi I: Migratory phenotypes of HSC-3 squamous carcinoma cell line induced by EGF and PMA: relevance to migration of loosening of adhesion and vinculin-associated focal contacts with prominent filopodia. *Cell Biol Int* 1999, 23:163-74.
- Kawano K, Katak SS, Murai M, Yao CC, Kramer RH: Integrin alpha3beta1 engagement disrupts intercellular adhesion. *Exp Cell Res* 2001, 262:180-96.
- Kim LT, Yamada KM: Evidence that beta1 integrins in keratinocyte cell-cell junctions are not in the ligand-occupied conformation. *J Invest Dermatol* 1997, 108:876-80.
- Kim MJ, Lee JH, Kim YK, Myoung H, Yun PY: The role of tamoxifen in combination with cisplatin on oral squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 2007, 245:284-92.
- Kimmel KA, Carey TE: Altered Expression in squamous carcinoma cells of an orientation restricted epithelial antigen detected by monoclonal antibody A9. *Cancer Res* 1986, 46:3614-23.

- Kosmehl H, Berndt A, Strassburger S, et al.: Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999, 81:1071-9.
- Kramer RH, Shen X, Zhou H: Tumor cell invasion and survival in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2005, 24:35-45.
- Krause CJ, Carey TE, Ott RW, Hurbis C, McClatchey KD, Regezi JA: Human squamous cell carcinoma: Establishment and characterization of new permanent cell lines. *Arch Otolaryngol* 1981, 107:703-10.
- Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI, 2006:20-3.
- Kreidberg JA: Functions of alpha3beta1 integrin. *Curr Opin Cell Biol* 2000, 12:548-53.
- Kuiper GG, Gustafsson JA: The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* 1997, 410:87-90.
- Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA: The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 1998, 19:253-86.
- Kumagai Y, Monma K, Kawada K: Magnifying chromoendoscopy of the esophagus: in-vivo pathological diagnosis using an endocytoscopy system. *Endoscopy* 2004, 36:590-4.
- Lansford CC, Grenman R, Bier H, et al.: Head and neck cancers. In: Masters JRW, Palsson B, eds: *Human Cell Culture Vol. II*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1999:185-255.
- Larjava H, Peltonen J, Akiyama SK, et al.: Novel function for beta 1 integrins in keratinocyte cell-cell interactions. *J Cell Biol* 1990, 110:803-15.
- Leimola-Virtanen R, Pennanen R, Syrjänen K, Syrjänen S: Estrogen response in buccal mucosa - a cytological and immunohistological assay. *Maturitas* 1997, 27:41-5.
- Leimola-Virtanen R, Salo T, Toikkanen S, Pulkkinen J, Syrjänen S: Expression of estrogen receptor (ER) in oral mucosa and salivary glands. *Maturitas* 2000, 36:131-7.
- Lindl T, Bauer J: *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. 3. Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer, 1994.
- Litjens SH, de Pereda JM, Sonnenberg A: Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends Cell Biol* 2006, 16:376-83.
- Lyons AJ, Jones J: Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007, 36:671-9.
- Mandlekar S, Kong AN: Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 2001, 6:469-77.

- Marchisio PC, Bondanza S, Cremona O, Chancedda R, De Luca M: Polarized expression of integrin receptors (alpha 6 beta 4, alpha 2 beta 1, alpha 3 beta 1, and alpha v beta 5) and their relationship with the cytoskeleton and basement membrane matrix in cultured human keratinocytes. *J Cell Biol* 1991, 112:761-73.
- Mercurio AM, Rabinovitz I: Towards a mechanistic understanding of tumor invasion - lessons from the alpha6beta 4 integrin. *Semin Cancer Biol* 2001, 11:129-41.
- Miyamoto S, Akiyama SK, Yamada KM: Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* 1995, 267:883-5.
- Moreno-Cuevas JE, Sirbasku DA: Estrogen mitogenic action. III. is phenol red a "red herring"? *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2000, 36:447-64.
- Nelson K, Helmstaedter V, Lage H: The influence of tamoxifen on growth behavior and cell-cell adhesion in OSCC in vitro. *Oral Oncol* 2007, 43:720-7.
- Nelson K, Helmstaedter V, Moreau C, Lage H: Estradiol, tamoxifen and ICI 182,780 alter alpha3 and beta1 integrin expression and laminin-1 adhesion in oral squamous cell carcinoma cell cultures. *Oral Oncol* 2008, 44:94-9.
- Niessen CM, van der Raaij-Helmer MH, Hulsman EH, van der Neut R, Jonkman MF, Sonnenberg A: Deficiency of the integrin beta 4 subunit in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia: consequences for hemidesmosome formation and adhesion properties. *J Cell Sci* 1996, 109:1695-706.
- Ning Y, Buranda T, Hudson LG: Activated epidermal growth factor receptor induces integrin alpha2 internalization via caveolae/raft-dependent endocytic pathway. *J Biol Chem* 2007, 282:6380-7.
- Nishiuchi R, Murayama O, Fujiwara H, et al.: 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)* 2003, 134:497-504.
- Noll S, Schaub-Kuhnen S: *Praxis der Immunhistochemie*. 1. Aufl. Edited by Höfler H, Müller K-M. München, Jena: Urban & Fischer, 2000:97.
- Osborne CK, Zhao H, Fuqua SA: Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Oncol* 2000, 18:3172-86.
- Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI: Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer* 2004, 90 Suppl 1:S2-6.
- Owens DM, Romero MR, Gardner C, Watt FM: Suprabasal alpha6beta4 integrin expression in epidermis results in enhanced tumorigenesis and disruption of TGFbeta signalling. *J Cell Sci* 2003, 116:3783-91.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, et al.: Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 1997, 277:1508-10.

- Park SH, Cheung LW, Wong AS, Leung PC: Estrogen Regulates Snail and Slug in the Downregulation of E-Cadherin and Induces Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells through Estrogen Receptor Alpha. *Mol Endocrinol*. 2008, 2008 Jun 11. [Epub ahead of print].
- Pisanty S, Rafaely B, Polishuk WZ: The effect of steroid hormones on buccal mucosa of menopausal women. *Oral Surg* 1975, 40:346-53.
- Preiß J, Dornoff W, Hagemann FG, Schmieder A: *Kopf-Hals-Tumoren*. 10. Aufl. München, Bern, Wien, New York: W. Zuckschwerdt Verlag, 2000:106-10.
- Pschyrembel *Klinisches Wörterbuch*. 258. Aufl. bearbeitet von der Wörterbuch-Redaktion des Verlags unter Leitung von H. Hildebrandt. Berlin, New York: Walter de Gruyter, 1998:1149.
- Rabbani G, Benzil D, Wallam MN, et al.: Combination therapy with thalidomide, temozolomide and tamoxifen improves quality of life in patients with malignant astrocytomas. *Anticancer Res* 2007, 27:2729-36.
- Rabinovitz I, Mercurio AM: 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* 1997, 139:1873-84.
- Ricci E, Cavalot AL, Sanvito F, et al.: Differential expression and topography of adhesion molecules in laryngeal and oropharyngeal carcinomas. *Acta Otolaryngol* 2002, 122:234-40.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al.: Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003, 302:1704-9.
- Rosenberg Zand RS, Grass L, Magklara A, Jenkins DJA, Diamandis EP: Is ICI 182,780 an antiprogesterin in addition to being an antiestrogen? *Breast Cancer Res Treat* 2000, 60:1-8.
- Santoro MM, Gaudino G, Marchisio PC: The MSP receptor regulates alpha6beta4 and alpha3beta1 integrins via 14-3-3 proteins in keratinocyte migration. *Dev Cell* 2003, 5:257-71.
- Schoenwaelder SM, Burridge K: Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1999, 11:274-86.
- Scully C, Porter S: Oral cancer. *West J Med* 2001, 174:348-51.
- Scully C, Felix DH: Oral medicine - update for the dental practitioner oral cancer. *Br Dent J* 2006, 200:13-7.
- Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH-F, Toker A, Mercurio AM: Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the $\alpha 6 \beta 4$ integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 1997, 91:949-60.
- Shield K, Riley C, Quinn MA, Rice GE, Ackland ML, Ahmed N: Alpha2beta1 integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis. *J Carcinog* 2007, 6:11.
- Shinohara M, Nakamura S, Sasaki M, et al.: Expression of integrins in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Correlations with tumor invasion and metastasis. *Am J Clin Pathol* 1999, 111:75-88.

- Shintani Y, Fukumoto Y, Chaika N, Svoboda R, Wheelock MJ, Johnson KR: Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. *J Cell Biol* 2008, 180:1277-89.
- Sterk LM, Geuijen CA, Oomen LC, Calafat J, Janssen H, Sonnenberg A: The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J Cell Biol* 2000, 149:969-82.
- Sugiyama M, Speight PM, Prime SS, Watt FM: Comparison of integrin expression and terminal differentiation capacity in cell lines derived from oral squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 1993, 14:2171-6.
- Sun H, Santoro SA, Zutter MM: Downstream events in mammary gland morphogenesis mediated by reexpression of the alpha2beta1 integrin: the role of the alpha6 and beta4 integrin subunits. *Cancer Res* 1998, 58:2224-33.
- Takkunen M, Grenman R, Hukkanen M, Korhonen M, Garcia de Herreros A, Virtanen I: Snail-dependent and -independent epithelial-mesenchymal transition in oral squamous carcinoma cells. *J Histochem Cytochem* 2006, 54:1263-75.
- Tavassoli M, Soltaninia J, Rudnicka J, Mashanyare D, Johnson N, Gäken J: Tamoxifen inhibits the growth of head and neck cancer cells and sensitizes these cells to cisplatin induced-apoptosis: role of TGF-beta1. *Carcinogenesis* 2002, 23:1569-75.
- Thomas GJ, Jones J, Speight PM: Integrins and oral cancer. *Oral Oncol* 1997, 33:381-8.
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J: Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 2005, 146:624-32.
- Thorup AK, Reibel J, Schiodt M, et al.: Can alterations in integrin and laminin-5 expression be used as markers of malignancy? *APMIS* 1998, 106:1170-80.
- Tuomela T, Miettinen P, Viinikka L, Perheentupa J: Estrogen-androgen antagonism in the regulation of epidermal growth factor in mouse submandibular salivary gland and kidneys. *Life Sci* 1990, 47:1925-32.
- Ueki H, Yaoita H: *Dermato-Immunhistochemie: Atlas und Handbuch für Klinik und Praxis*. Edited by Laaff H. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1991:11-20.
- van der Flier A, Sonnenberg A: Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 2001, 305:285-98.
- Van Waes C, Surh DM, Chen Z, et al.: Increase in suprabasilar integrin adhesion molecule expression in human epidermal neoplasms accompanies increased proliferation occurring with immortalization and tumor progression. *Cancer Res* 1995, 55:5434-44.
- Virolainen E, Vanharanta R, Carey TE: Steroid hormone receptors in human squamous carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1984, 33:19-25.

- Wang MM, Traystman RJ, Hurn PD, Liu T: Non-classical regulation of estrogen receptor-alpha by ICI182,780. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, 92:51-62.
- Wilhelmsen K, Litjens SH, Kuikman I, Margadant C, van Rheenen J, Sonnenberg A: Serine phosphorylation of the integrin beta4 subunit is necessary for epidermal growth factor receptor induced hemidesmosome disruption. *Mol Biol Cell* 2007, 18:3512-22.
- Witkowski CM, Bowden GT, Nagle RB, Cress AE: Altered surface expression and increased turnover of the alpha6beta4 integrin in an undifferentiated carcinoma. *Carcinogenesis* 2000, 21:323-30.
- Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ: Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1692:103-19.
- Xiaoming H, Haiqiang M, Manquan D, et al.: Examination of nasopharyngeal epithelium with contact endoscopy. *Acta Otolaryngol* 2001, 121:98-102.
- Yu X, Miyamoto S, Mekada E: Integrin $\alpha 2\beta 1$ -dependent EGF receptor activation at cell-cell contact sites. *J Cell Sci* 2000, 113:2139-47.
- Zahir N, Lakins JN, Russell A, et al.: Autocrine laminin-5 ligates alpha6beta4 integrin and activates RAC and NFkappaB to mediate anchorage-independent survival of mammary tumors. *J Cell Biol* 2003, 163:1397-407.
- Zhang K, Kim JP, Woodlea DT, Waleh NS, Chen YQ, Kramer RH: Restricted expression and function of laminin 1-binding integrins in normal and malignant oral mucosal keratinocytes. *Cell Adhes Commun* 1996, 4:159-74.
- Zhou H, Kramer RH: Integrin engagement differentially modulates epithelial cell motility by RhoA/ROCK and PAK1. *J Biol Chem* 2005, 280:10624-35.

Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Dr. Nelson für die Überlassung dieses Themas, die ausdauernde Betreuung und die wertvollen Hinweise danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. B. Hoffmeister danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut zu forschen.

Frau Kruse-Boitschenko danke ich für die erfrischende Zusammenarbeit und ihre stetige Hilfestellung bei labortechnischen Fragestellungen.

Herrn Haffner danke ich für die Entwicklung der Fotos und die Bereitstellung seines Diascanners.

Frau Maskan und Frau Lemmer danke ich aufrichtig für die Vorarbeiten zur Layoutlegung.

Ganz herzlich danke ich meiner Mutter, mir diesen Weg ermöglicht und mich jederzeit unterstützt zu haben.

Danken möchte ich auch meinen Schwestern und Freunden für die motivierenden Worte, die Anregungen und die Nachsicht in der Terminplanung.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meinem Mann, der mir unermüdlich zur Seite stand, mich anspornte, inspirierte und mir den Rücken freihielt. Zu guter Letzt danke ich meiner Tochter für die Geduld und ihr bezauberndes Lächeln.

Publikation

Nelson K, Helmstaedter V, Moreau C, Lage H: Estradiol, tamoxifen and ICI 182,780 alter alpha3 and beta1 integrin expression and laminin-1 adhesion in oral squamous cell carcinoma cell cultures. *Oral Oncol* 2008, 44:94-9.

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Cynthia Moreau, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: ‚Modulation der Integrinexpression auf Zelllinien humaner Plattenepithelkarzinome des Mundbodens durch Östradiol, ICI 182,780 und Tamoxifen‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift