

**Auswirkung von IGF-1 auf die Expression onkologisch relevanter  
Gene in einer A64-Speicheldrüsentumorzelllinie**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn**

Svenja Mohr

Essen

2010

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Werner Götz

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Meyer

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.03.2010

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. A. Jäger

Meiner Familie



## Inhaltsverzeichnis

Inhalt	Seite 5
1. Einleitung	Seite 6
2. Fragestellung	Seite 20
3. Material und Methoden	Seite 21
4. Ergebnisse	Seite 31
5. Diskussion	Seite 44
6. Zusammenfassung	Seite 54
7. Literaturverzeichnis	Seite 56
8. Danksagung	Seite 62
9. Lebenslauf	Seite 63

## **Einleitung**

Die eher seltenen Speicheldrüsentumoren haben eine Inzidenz von 2-3 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner pro Jahr. Damit sind weniger als 0,5 Prozent aller bösartigen Tumoren Neoplasien der Speicheldrüsen. Innerhalb der Kopf-Hals-Tumoren haben Neubildungen der Speicheldrüsen eine Prävalenz von 2-3%. Sie gehen in den meisten Fällen von den sechs großen Speicheldrüsen (Glandula parotidea, Glandula submandibularis, Glandula sublingualis) aus, wobei 80% der Tumoren auf die Glandula parotidea entfallen [Machtens 2000; de Vicente-Rodriguez et al. 2006]. Tumoren der kleinen Speicheldrüsen sind weitaus seltener, wohingegen auffällig ist, dass bei Primärtumoren der kleinen Speicheldrüsen häufiger bösartige Tumorentitäten vorherrschen [Reinert und Machtens 2006].

## WHO-Klassifikation

Aufgrund Ihrer großen Heterogenität ist die exakte Diagnosestellung, insbesondere bei phänotypisch verwandten Neoplasien unterschiedlicher Dignität, mitunter sehr schwierig. Die Einteilung der Speicheldrüsentumoren erfolgt histogenetisch, das heißt, jeder Tumor wird dem Gewebe, aus dem er hervorgegangen ist, zugeordnet. Die z. Zt. international gebräuchlichste Einteilung (Tabelle 1) folgt einem Vorschlag der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahr 2005 [Wittekind et al. 2002, 2003, 2005], modifiziert nach Seifert und Sobin (1991).

<b>Adenome</b>	
<i>Pleomorphes Adenom</i> Myoepitheliom (myoepitheliales Adenom) Basalzelladenom <i>Warthin-Tumor (Zystadenolymphom)</i>	Onkozytom (onkozytäres Adenom) kanalikuläres Adenom duktales Papillom Zystadenom (papillär bzw. muzinös)

<b>Karzinome</b>	
<i>Azinuszellkarzinom</i> <i>Mukoepidermoidkarzinom</i> <i>adenoid-zystisches Karzinom</i> niedrigmalignes polymorphes Adenokarzinom epithelial-myoepitheliales Karzinom Basalzell-Adenokarzinom Talgdrüsenkarzinom papilläres Zystadenokarzinom muzinöses Adenokarzinom	onkozytäres Karzinom Speichelgangkarzinom <i>Adenokarzinom-NOS (not otherwise specified)</i> myoepitheliales Karzinom Karzinom aus pleomorphem Adenom (maligner Misch tumor) <i>Plattenepithelkarzinom</i> kleinzelliges Karzinom undifferenziertes Karzinom nicht klassifizierbare Karzinome
<b>nichtepitheliale Tumoren</b> Maligne Lymphome [meistens B-Zell (MALT)-Lymphome niedriger Malignität] Sekundäre Tumoren (Metastasen) Nicht klassifizierbare Tumoren	<b>Tumorähnliche Läsionen</b> Sialadenose Onkozytose nekrotisierende Sialometaplasie benigne lymphoepitheliale Läsion Speicheldrüsenzysten chronische sklerosierende Sialadenitis der Glandula submandibularis (= Küttner-Tumor) zystische lymphoide Hyperplasie bei AIDS

**Tabelle 1** Die derzeit international geltende pathohistologische WHO-Klassifikation der Speicheldrüsentumoren (WHO 2005) wird in der folgenden Tabelle dargestellt; lediglich die kursiv gedruckten Tumoren haben quantitativ eine größere Bedeutung [Seifert und Sobin 1991; Wittekind et al. 2002, 2003, 2005].

## TNM-Klassifikation

Die für die Behandlung und Prognose von Patienten mit bösartigen Speicheldrüsentumoren relevante klinische Einteilung folgt der von der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) vorgeschlagenen TNM-Klassifikation. "T" steht hierbei für die Größe des Primärtumors und seine lokale Ausdehnung, "N" für die lokoregionäre Lymphknotenmetastasierung und "M" für die Fernmetastasierung. Die Beurteilung des Primärtumors erfolgt nach klinischen Gesichtspunkten; wurde die Einteilung der Tumorgöße ergänzend vom Pathologen anhand des eingesandten Operationspräparates durchgeführt ist der TNM-Formel ein kleines "p" vorangestellt. Wurde der Patient vor der definitiven TNM-Klassifikation mit einer adjuvanten oder neoadjuvanten Therapie, wie einer Chemo- oder Bestrahlungstherapie behandelt, wird zusätzlich ein kleines "y" ergänzt [Wittekind et al 2002, 2003, 2005].

pT1	Tumor kleiner als 2 cm und ohne extraparenchymale Ausbreitung
pT2	Tumor größer als 2 cm, aber kleiner als 4 cm und ohne extraparenchymale Ausbreitung
pT3	Tumor größer als 4 cm, aber kleiner als 6 cm und/oder mit extraparenchymaler Ausbreitung (Weichgewebe, Haut, Knochen), ohne Infiltration des N. facialis
pT4	Tumor mit Infiltration der Schädelbasis, des N. facialis und/oder größer als 6 cm

**Tabelle 2** Einteilung der Tumorgöße nach TNM bei Tumoren der großen Speicheldrüsen. Die pN- und pM-Klassifikation erfolgt analog zu den Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Die Tumoren der kleinen Speicheldrüsen werden wie Plattenepithelkarzinome entsprechender Lokalisation klassifiziert.

Für den Chirurgen ist die Therapieplanung durch stark variierende klinische Verläufe und die engen anatomischen Beziehungen zum Nervus facialis, zur Halsnervengefäßscheide und zur Schädelbasis sehr anspruchsvoll. Die Therapie der Wahl ist die operative Tumorentfernung. Diese reicht beispielsweise bei Tumoren der Ohrspeicheldrüse von der konservativen Parotidektomie mit Facialisschonung bis zur radikalen Parotidektomie mit und ohne Rekonstruktion des Gesichtsnerven. Aufgrund des kleinen anatomischen Spielraumes sind der Resektion des Primärtumors und seiner Lokalrezidive jedoch enge Grenzen gesetzt [Lang et al. 2005]. Hohe Rezidivraten von 71% bis 83% werden besonders bei den Speichelgang-, den Mukoepidermoid-, den Azinuszell- und den adenoidzystischen Karzinomen beschrieben, und Spätrezidive mit lymphogener oder hämatogener Fernmetastasierung sind häufig. Die Langzeitprognose bleibt schlecht und kann auch durch eine adjuvante Radiatio nicht wesentlich verbessert werden. Eine Chemotherapie kommt nur in Palliativsituationen zum Einsatz und ist in der Regel nicht spezifisch [Laurie und Licitra 2006].

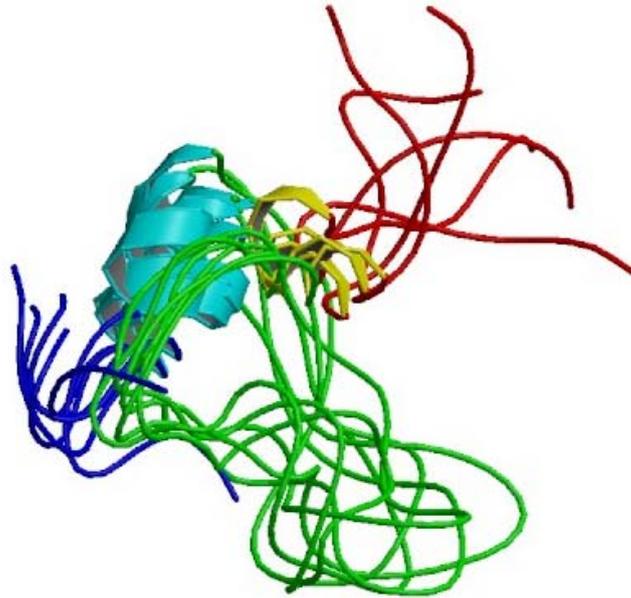
## Genetische Faktoren

Es wird vermutet, dass die Entstehung und Progression von Speicheldrüsentumoren durch zahlreiche genetische und epigenetische Veränderungen bestimmt wird, die aus einem veränderten Genexpressionsmuster der Tumorzellen gegenüber dem Expressionsmuster normaler Zellen resultiert. Bislang konnten in Speicheldrüsen nur wenige Gene oder Genprodukte als tumorassoziiert identifiziert werden, zumal kleine Untersuchungskollektive eine statistische Auswertung erschweren. Dennoch sind im Zusammenhang mit anderen epithelialen Kopf-Hals Tumoren, wie etwa Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, eine Reihe von Genen beschrieben worden, die mit der Entstehung dieser Tumoren in Verbindung stehen könnten [Pantelis et al. 2008; Wenghoefer et al. 2008a, 2008b]. Hierbei handelt es sich um Gene, deren Transkriptionsprodukte den Zellzyklus positiv oder negativ, im Sinne von Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen beeinflussen könnten. In dieser Studie wurden als Zielgene für eine mögliche Beeinflussung durch Insulinlike Growth Factor (IGF)-1 die aus onkologischer Sicht relevanten Gene hBD-1, -2, -3, DEFA1/3 und DEFA4, die S100 Proteine S100A4 und Psoriasin, COX-2, DOC-1, EGF, EGFR, IGFR und Ki-67 ausgewählt, da sie für Speicheldrüsentumoren in diesem Zusammenhang bis dato nicht untersucht wurden. Trotz einer intensiven Literaturrecherche [PubMed NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) Februar 2009; Suchwörter: IGF-1, salivary glands, tumor] fanden sich keine Arbeiten, welche die oben genannten molekularpathologischen Parameter in einer Speicheldrüsentumorzelllinie in einem vergleichbaren Zusammenhang untersucht haben. Die potentielle Rolle der

entsprechenden Gene in der Beeinflussung des Zellzyklus in Kopf-Hals-Tumoren soll im Weiteren kurz beschrieben werden:

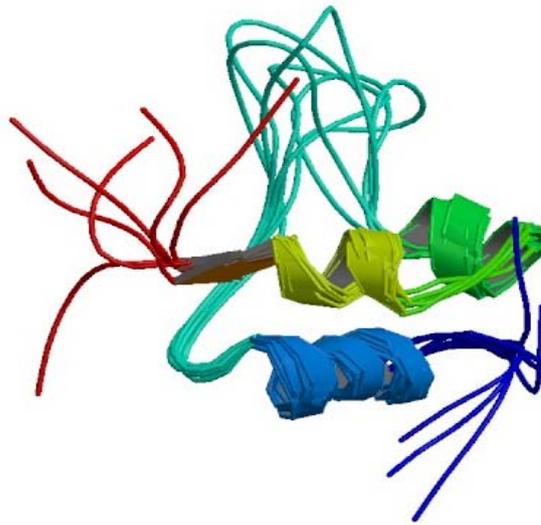
### Das IGF-System

Der aus 79 Aminosäuren bestehende Insulinlike Growth Factor (IGF)-1 besitzt ein Molekulargewicht von 7659 Dalton (Da). IGF-1 wird primär hepatisch synthetisiert und liegt zu 98% an eines seiner 6 Bindungsproteine (IGF-Binding Proteins = IGF-BP) gebunden vor, wobei IGF-BP-3 für 80% der IGF-1 Bindungen verantwortlich ist. Seine biologische Aktivität vermittelt IGF-1 über einen spezifischen Rezeptor (IGFR-1) der von den meisten Zellen des menschlichen Körpers exprimiert wird. IGF-1 induziert über Tyrosinkinase (TK)-abhängige Signaltransduktionswege zelluläres Wachstum und inhibiert den programmierten Zelltod (Apoptose). Daher wurde IGF-1 in letzter Zeit vermehrt mit der Entstehung verschiedenster Tumorentitäten in Verbindung gebracht [Khandwala et al. 2000; Samani et al. 2007; Pollak 2008; Dossus et al. 2008].



**Abbildung 1** zeigt die Raumstruktur des Insulinlike Growth Factors (IGF) -1, Genlocus 12q22-q24.1, NCBI, OMIN 147440 (Online Mendelian Inheritance in Man; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Johns Hopkins University, USA.

IGF-1 hat eine enge Verwandtschaft und Sequenzhomologie mit IGF-2. Wohingegen IGF-1 nur an seinen eigenen Rezeptor (IGFR-1) binden kann, besitzt IGF-2 sowohl Affinität zu IGFR-1 als auch zu einem spezifischen Mannose-6 Phosphat Rezeptor (IGFR-2). Dieser induziert keine eigene Signaltransduktionskaskade, sondern internalisiert IGF-2, sodass eine geringere IGF-2 Menge zur Bindung an IGFR-1 zur Verfügung steht. IGF-1 kann darüber hinaus mit geringerer Affinität als Insulin selbst an zellulären Insulinrezeptoren binden [Khandwala et al. 2000; Pollak 2008].



**Abbildung 2** zeigt die Raumstruktur des Insulinlike Growth Factors (IGF) -2, Genlocus 11p15.5, NCBI, OMIN 147470 (Online Mendelian Inheritance in Man; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Johns Hopkins University, USA.

### Interleukine

Die Interleukine (IL) IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und Tumor Necrosis Factor (TNF) gehören zur Gruppe der Zytokine, die aufgrund ihrer chemotaktischen Eigenschaften an der Initiation, Steuerung und Modulation einer Reihe immunregulatorischer Prozesse beteiligt sind. Während IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  eine pro-inflammatorische Wirkung besitzen, ist IL-10 anti-inflammatorisch [Dunsche et al. 2002]. Über Metabolisierung der vierfach ungesättigten Arachidonsäure zu Prostaglandinen induzieren die beiden Isoformen der Cyclooxygenase (COX), COX-1 und COX-2, Entzündung und Schmerz. Erst in letzter Zeit wurde eine Beteiligung der Cyclooxygenasen an der Entstehung verschiedenster Tumorentitäten postuliert und diskutiert [Zhang et al. 2008].

## Humane Defensine

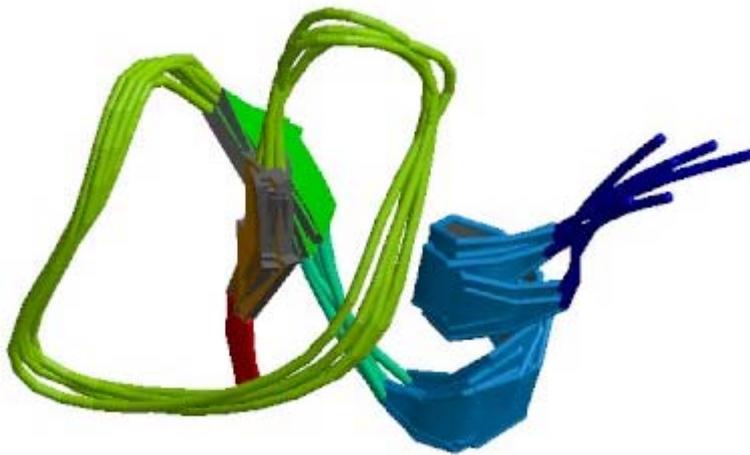
Humane  $\beta$ -Defensine (hBDs) wie hBD-1, -2, -3 sind positiv geladene Proteine mit einem mittleren Molekulargewicht zwischen 3,5 und 6,5 kDa. Aufgrund ihrer positiven Ladung und ihrer Oberflächeneigenschaften können sie die Membranen einer Vielzahl gram-positiver und gram-negativer Bakterien, verschiedene Pilze und Viren desintegrieren und somit einen wichtigen Beitrag zur humoralen Immunabwehr leisten.

Defensine sind in nahezu allen Geweben beschrieben worden, einschließlich in denen der Mundhöhle, des Gastrointestinaltraktes, der Atemwege, des Urogenitaltraktes und der Speicheldrüsen [Dommisch et al. 2005].

Während das ubiquitär exprimierte hBD-1 konstitutiv vorliegt, ist die Genexpression von hBD-2 und -3 durch bakterielle und virale Stoffwechselprodukte, aber auch durch Zytokine wie IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  induzierbar [Dunsche et al. 2002; Froy et al. 2005]. IL-1 $\beta$  ist ebenfalls an der Induktion von COX beteiligt [Furstenberger et al. 2006].

Wohingegen die induzierbaren hBDs-2 und -3 eng mit entzündlichen Vorgängen verbunden sind, scheint hBD-1 eine Rolle in der Karzinogenese epithelialer Tumoren zu spielen: So wurde beispielsweise ein tumorspezifisches Absinken der hBD-1 Expression in 90% der klarzelligen Nierenkarzinome und in 82% der Prostatakarzinome beschrieben [Donald et al. 2003; Sun et al. 2006]. Darüber hinaus wurde eine Reduktion der hBD-1 Expression in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, sowie in pleomorphen Adenomen gezeigt [Wenghoefer et al. 2008; Pantelis et al. 2008], sodass hBD-1 möglicherweise eine Funktion als Chromosom 8p-Tumorsuppressorgen zu haben scheint [Sun et al. 2006].

Analog zu den humanen  $\beta$ -Defensinen sind Alpha-Defensine (DEFA) ebenfalls in einem Gencluster auf Chromosom 8 lokalisiert. Humane Alpha-Defensine finden sich in hoher Konzentration in den Granula neutrophiler Granulozyten und sind an der Opsonierung und Phagozytose bakterieller und viraler Ziele beteiligt. DEFA 1 unterscheidet sich von DEFA 3 lediglich durch eine Aminosäure [Lehrer et al. 1993; Froy et al. 2005].



**Abbildung 3** zeigt die Raumstruktur des humanen  $\beta$ -Defensins (hBD) -1, Genlocus 8p23.1, NCBI, OMIN 602056 (Online Mendelian Inheritance in Man; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Johns Hopkins University, USA.

#### S100A4, S100A7, Doc-1

Das 11,4 kDa große S100A7-Molekül gehört zu der auf Chromosom 1q21.2-q22. lokalisierten S100-Genfamilie. Aufgrund der Tatsache, dass es erstmals aus den Hautläsionen von Patienten mit Schuppenflechte isoliert wurde, wird es auch als Psoriasin bezeichnet. Seine Hauptaufgaben bestehen in der Steuerung von Zellwachstum und Differenzierung der Zellform. S100A7-Genaberrationen wurden auch in oralen Plattenepithelkarzinomen beschrieben. Darüber hinaus werden signifikante

Unterschiede im S100A7-Expressionsmuster zur frühen Unterscheidung invasiver von nicht invasiven Mammakarzinomen postuliert [Watson et al. 1998].

Ähnlich wie S100A7 ist das Kalzium-bindende Protein S100A4 ein Mitglied der S100-Genfamilie. S100A4 beeinflusst die Beweglichkeit, Migration und Invasion verschiedenster Zelltypen. Mutationen des S100A4 Gens, sowie Veränderungen in seinem Expressionsmuster scheinen eine Rolle bei der Metastasierung von Mammakarzinomen zu spielen und sind mit einer herabgesetzten 5-Jahresüberlebensrate dieser Patientinnen vergesellschaftet [Chen et al. 2001].

Das Gen Deleted-in-Oral-Cancer (DOC) -1 wurde zuerst durch LOH (Loss of heterozygosity) -Analysen und deutliche Herabregulation seines Transkriptionsproduktes, p12 CDK2-associating protein 1 (CDK2-AP1), in Kopf-Hals-Tumoren charakterisiert. Die Herabregulation der DOC-1 Expression scheint mit fortgeschrittenen Tumorstadien epithelialer Kopf-Hals-Neoplasien korreliert zu sein und ist quoad vitam als prognostisch ungünstig zu werten [Shintani et al 2001; Peng et al. 2006]. Die DOC-1 Expression wird durch Transforming Growth Factor (TGF) - $\beta$ 1 induziert. TGF-  $\beta$ 1 gilt als hochpotenter Wachstumsinhibitor in vielen Zellarten, einschließlich epithelialer Zellen der Mundschleimhaut. TGF- $\beta$ 1 vermittelte zelluläre Wachstumshemmung könnte eine zusätzliche Rolle in der Modulation der DOC-1 Genexpression in Kopf-Hals Tumoren spielen [Peng et al. 2006].

### EGF, EGFR, Ki-67

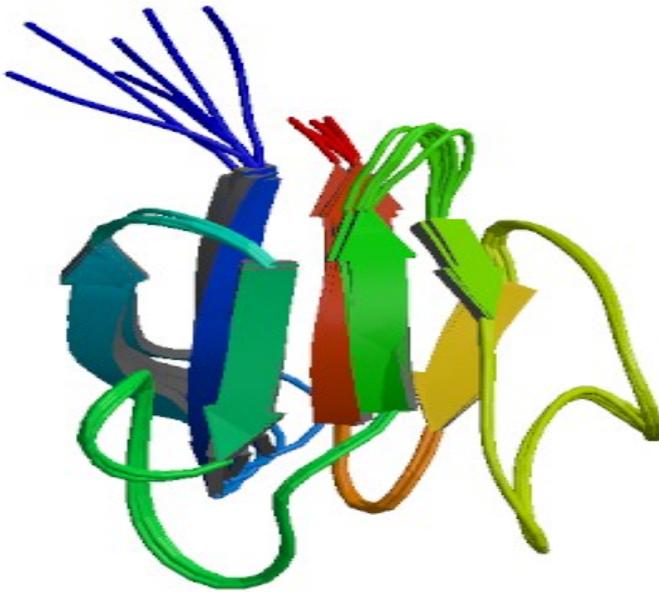
Epidermal Growth Factor (EGF) stimuliert durch Induktion von Mitose Zellteilungsvorgänge in nahezu allen menschlichen Geweben. Die Wirkung von EGF

wird über eine Reihe von transmembranären Glycoproteinrezeptoren vermittelt, von denen bislang vier eng verwandte Subtypen charakterisiert wurden. Diese werden als Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER) 1 bis 4 bezeichnet. Am besten untersucht ist HER-1, der synonym auch als Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) bezeichnet wird. Eine Überexpression von HER-2 ist ein frühes Ereignis bei der Entstehung von Mammakarzinomen, während eine HER-4 Überexpression eher in späteren Stadien der Tumorprogression gefunden wird. Die Überexpression beider Rezeptoren ist mit einer schlechten Prognose verbunden [Bianchi et al. 2006].

Wohingegen Transforming Growth Factor (TGF) - $\beta$ 1 in vielen Zelltypen einschließlich epithelialer Zellen der Mundschleimhaut und der Speicheldrüsen ein potenter Wachstumsinhibitor ist, induziert TGF- $\alpha$  über HER-1 Wachstum [Peng et al. 2006]. TGF- $\beta$ 1 und EGF sind beide an den komplexen interzellulären Regulationsvorgängen der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) beteiligt. Hierbei handelt es sich um eine Umstrukturierung der Gewebearchitektur in unmittelbarer Nachbarschaft invasiver epithelialer Tumorzellen bei der lokalen Tumorprogression und Metastasierung [Wilkins-Port et al. 2007; Tsuji et al. 2008]. So wird TGF- $\alpha$  früh in der Tumorgenese oraler epithelialer Tumoren und im weiteren Verlauf auch im umliegenden Gewebe in der Invasionsfront des Tumors überexprimiert. Eine gleichzeitige Überexpression von TGF- $\alpha$  und EGFR ist in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden als eine isolierte EGFR-Überexpression [Peng et al. 2006; Shintani et al. 2001]. Durch therapeutische Gabe des monoklonalen Antikörpers Cetuximab kann die Bindung von EGF an HER-1 verhindert werden. Cetuximab wird in

der Behandlung von gastrointestinalen und Kopf-Hals Tumoren eingesetzt [Humblet 2004].

Ki-67 ist ein diagnostisch weit verbreiteter Proliferationsmarker und streng mit den aktiven Zellzyklusphasen G1, S, G2 und Mitose verbunden; in der G0-Phase ruhender Zellen ist es nicht nachweisbar. Der das Ki-67 Protein detektierende Antikörper MIB-1 wurde erstmals nach Immunisierung von Mäusen mit den Kernen der Hodgkin-Lymphomzelllinie L428 isoliert. Da diese Experimente in Kiel durchgeführt wurden, und das Ki-67 Antigen zuerst an Position 67 einer 96-Well Mikrotiterplatte gefunden wurde, ergab sich der Name Ki-67. Der Anteil Ki-67 positiver Zellen an der Gesamtzahl der Tumorzellen ergibt den Ki-67 Labelling Index, der wiederum mit der Prognose von beispielsweise Prostata- und Mammakarzinomen korreliert ist [Gerdes et al 1983; Scholzen et al. 2000; Bullwinkel et al. 2006].



**Abbildung 4** zeigt die Raumstruktur des Proliferationsmarkers Ki-67, Genlocus 10q25-qter, NCBI, OMIN 176741 (Online Mendelian Inheritance in Man; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Johns Hopkins University, USA.

## **Fragestellung**

Da bislang, in Ergänzung zu den konventionellen klinischen und histopathologischen Diagnoseverfahren zur Einschätzung des zu erwartenden biologischen Verhaltens eines Speicheldrüsentumors, insbesondere seiner Rezidivwahrscheinlichkeit, keine verlässlichen molekularpathologischen Marker existieren, stellte sich die Frage, ob sich solche molekularpathologischen Marker beschreiben lassen und ob sie sich als verlässlich erweisen würden. Da jedoch bislang keine systematischen Untersuchungen durchgeführt wurden, welche die Genexpression bekannter, onkologisch relevanter Gene mit neueren, in diesem Zusammenhang noch nicht erforschten Genen, wie z.B. den humanen Defensinen, verknüpfen, wurde diese Untersuchung durchgeführt.

Um ein grundlegend besseres Verständnis von möglicherweise in Speicheldrüsentumoren relevanten Tumorsuppressor- und Onkogenen zu erarbeiten, sollte in der vorliegenden Studie, in vitro, in einer A64-Speicheldrüsentumorzelllinie untersucht werden, welchen Einfluss IGF-1 auf das Expressionsmuster der Gene hBD-1, -2, -3, DEFA1/3 und DEFA4, der S100 Proteine S100A4 und Psoriasin, von COX-2, DOC-1, EGF, EGFR, IGFR und Ki-67 hat.

Ergebnisse dieser Studie könnten dazu beitragen, dass sich in Zukunft durch ein verbessertes Verständnis der Molekularpathologie von Speicheldrüsentumoren neben rein diagnostischen Aspekten auch weitergehende therapeutische Optionen in Ergänzung zu den bereits bekannten operativen, adjuvanten und neoadjuvanten Therapieverfahren ergeben könnten.

## **Material und Methoden**

### Zellen

Für die in den Experimenten durchgeführten Stimulationsversuche wurde eine A64-CLS (Adenoma, Submaxillary Gland; Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland)-Zelllinie verwendet. Die A64-Zelllinie wurde in RPMI 1640 und 10% FCS, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### Materialien Zellkultur

Die Kulturschalen und Zellschaber waren von der Fa. Labomedic GmbH, Bonn. Das Zellkulturmedium RPMI 1640, FCS und die Antibiotika Penicillin, Streptomycin und Amphotericin wurden bei PAA Laboratories GmbH, Cölbe erworben. Die verwendete Trypsin-EDTA-Lösung stammt von der Firma Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen. Der Trypsininhibitor wurde von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim geliefert, und das CO<sub>2</sub> stammt von der Firma Linde, Höllriegelskreuth.

### Molekularbiologische Experimente

Alle RNA-Isolationen wurden mit dem „RNeasy Protect Mini Kit“ von Qiagen, Hilden, durchgeführt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „SuperScript™ First-Strand Synthesis System“ von Invitrogen GmbH, Karlsruhe. Als Gerät zur Durchführung der Realtime-RT-PCR wurde ein „iCycler iQ®“ Multicolor Real-Time PCR Detection System

von Bio-Rad verwendet. Als PCR-Mastermix diente „iQ™ SYBR® Green Supermix“ von Bio-Rad (Bio-Rad, München, Deutschland).

### Stimulationsversuche

Die Stimulationsversuche der A64-CLS Zelllinie wurden mit einem rekombinanten humanen IGF-1 der Firma Promokine, Heidelberg durchgeführt. Zur Austestung der optimalen IGF-1 Wirkung auf die A64-CLS Zellen, wurden eine Verdünnungsreihe mit 0,2, 1, 5, 50 und 250 ng/ml sowie ein serumfreies Kulturmedium hergestellt.

Die Quantifizierung der Expression der Zielgene erfolgte nach IGF-1-Stimulation zum Zeitpunkt t 0, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h.

### Durchführung der Experimente

Die A64-CLS Zellen wurden in Kulturschalen (35,0/10 mm) in jeweils 2 ml Kulturmedium/10% FCS/Pen/Strep/Amph zu einer Zelldichte von 80-90% Konfluenz kultiviert. 16 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen auf serumfreies Medium gesetzt.

Pro Versuchsreihe wurden jeweils sechs Zellkulturschalen in einem Zeitversuch angesetzt. Hierzu wurden 6 ml Kulturmedium mit dem zu applizierenden Agens in der entsprechenden Konzentration gemischt. Anschließend wurde 1 ml neues, mit dem Agens versehenes Medium auf die Zellen gegeben. Es folgte die RNA-Extraktion zum Zeitpunkt t 0, nach 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h.

### RNA-Isolierung:

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde nach dem Protokoll der Firma Qiagen (Quiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die auf der Säule gebundene RNA wurde zweimal mit je 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

### cDNA-Synthese

Die Erststrangsynthese der cDNA wurde mit Hilfe des „iScript™ Select cDNA Synthesis Kits“ nach Angaben des Herstellers Bio-Rad (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden 13 µl Gesamt-RNA eingesetzt. Zur cDNA-Synthese wurden oligo(dT)-Primer bzw. Random Primer verwendet.

### PCR-Primersequenzen

Folgende Primer wurden für die PCR Reaktionen verwendet:

#### *β-Aktin*

Vorwärts: 5'-CATGGATGATGATATCGCCGCG-3'

Rückwärts: 5'-ACATGATCTGGGTCATCTTCTGC-3'

#### *IGF-1*

Vorwärts: 5'-CCCACAGGGTATGGCTCCAGC-3'

Rückwärts: 5'-CTACATCCTGTAGTTCTTGTTTCCT-3'

*IGF-R*

Vorwärts: 5'-AGATGTCATGCAAGTGGCCAACA-3'

Rückwärts: 5'-TCATACCATACCTGCGGGCAC-3'

*hBD-1*

Vorwärts: 5'-CATGAGAACTTCCTACCTTCTGC-3'

Rückwärts: 5'-TCACTTGCAGCACTTGGCCTT-3'

*hBD-2*

Vorwärts: 5'-CATGAGGGTCTTGTATCTCCTCT-3'

Rückwärts: 5'-CCTCCTCATGGCTTTTTGCAGC-3'

*hBD-3*

Vorwärts: 5'-GCTATGAGGATCCATTATCTTCTG-3'

Rückwärts: 5'-TTATTTCTTTCTTCGGCAGCATTTTC-3'

*DEFA1/3*

Vorwärts: 5'-P-ATGAGGACCCTCGCCATCCTTGCT-3'

Rückwärts: 5'-P-TCAGCAGCAGAATGCCAGCGTCTTCCC-3'

*DEFA4*

Vorwärts: 5'-P-GTCTGCTCTTGCAGATTAGTATTCTG-3'

Rückwärts: 5'-P-TTAATCGACACGCGTGCAGCAGTAT-3'

*Cox-2*

Vorwärts: 5'-ATTGACCAGAGCAGGCAGAT-3'

Rückwärts: 5'-CAGGATACAGCTCCACAGCA-3'

*Psoriasin*

Vorwärts: 5'-ATGAGCAACACTCAAGCTGAGAGG-3'

Rückwärts: 5'-TCACTGGCTGCCCCCGGAAC-3'

*S100A4*

Vorwärts: 5'-ATGGCGTGCCCTCTGGAGAAGG-3'

Rückwärts: 5'-TCATTTCTTCCTGGGCTGCTTATC-3'

*DOC-1*

Vorwärts: 5'-ATGTCTTACAAACCGAACTTGGCC-3'

Rückwärts: 5'-CTAGGATCTGGCATTCCGTTCC-3'

*EGF*

Vorwärts: 5'-ACAGAATCTCAACACATGCTAGTG-3'

Rückwärts: 5'-CAGAACATAGTTTTCCATCCCCAG-3'

*EGFR/HER-1*

Vorwärts: 5'-CCCAGCAGAGACCCACACTAC-3'

Rückwärts: 5'-TCATGCTCCAATAAATTCAGCTTTT-3'

*Ki67*

Vorwärts: 5'-AAATTCAGACTCCATGTGCCTGAG-3'

Rückwärts: 5'-TCAAATACTTCACTGTCCCTATGAC-3'

Alle Primer wurden manuell, also ohne Computerprogramm, in der entsprechenden Gensequenz bestimmt. Anschliessend sind die Primer auf Sequenzidentität und Spezifität durch die Primersequenzeingabe in das „blastn“-System von ncbi (USA) analysiert worden. Alle Primer waren vollständig identisch mit der mRNA-Sequenz. Alle Primer zeigten keine bzw. vernachlässigbare Kreuzhomologien zu anderen

Realtime (RTq) -PCR:

Die Realtime-quantitative-PCR (RTq-PCR) beruht auf dem Prinzip der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), erlaubt aber zusätzlich die Quantifizierung der synthetisierten DNA-Menge. Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenz-Messungen eines bei der DNA-Synthese eingebauten Fluoreszenzfarbstoffes während des jeweiligen PCR-Zyklus. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu und kann somit in Echtzeit (Realtime) bestimmt werden.

Die Realtime-PCR-Experimente in dieser Arbeit wurden mit dem „icycler“ der Fa. Bio-Rad (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBRGreen verwendet. Jedes durchgeführte Experiment wurde jeweils mit einer Positivkontrolle, einer Negativkontrolle, sowie den cDNA-Proben durchgeführt. Für jedes untersuchte Gen der Studie wurde ein Temperaturoptimum für die entsprechende PCR-Reaktion ermittelt. Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde auf 50 Zyklen limitiert, wodurch

die Detektion eines DNA-Moleküls pro PCR-Ansatz gelang. Ein PCR-Ansatz enthielt das cDNA-Äquivalent von ca. 2000 Zellen; seine Zusammensetzung war wie folgt:

iQ™SYBR® Green Supermix	12,5 µl
H <sub>2</sub> O	11,375 µl
Primer (je 100 pmol/µl)	0,125 µl
cDNA	1,0 µl

Aus dem iQ™SYBR® Green Supermix, H<sub>2</sub>O und den Primern wurde ein Mastermix hergestellt um etwaige Pipettierungenauigkeiten zu minimieren, so dass der einzige Unterschied der PCR-Ansätze die cDNA darstellte.

Zu Beginn der PCR wurde bei 95°C eine Denaturierungsphase von 6 Minuten gewählt, und anschließend mit 50 Zyklen (Denaturierung: 15 Sekunden bei 95°C, Annealing: 30 Sekunden [Temperatur: siehe Tabelle 3], Elongation: 30 Sekunden bei 72°C) die PCR-Reaktion durchgeführt. Die PCR-Bedingungen für die untersuchten Gene sind in Tabelle 3 angegeben.

Gen	Effizienz	Temperatur (°C)
β-Actin	1.84	69
hBD-1	2.07	69
hBD-2	2.05	68
hBD-3	2.06	67
Psoriasin	1.95	69
S100A4	2.08	69
DEFA 1/3	2.17	69
DEFA 4	1.98	69
Cox-2	2.17	63
DOC-1	1.90	65
Ki67	1.91	66
EGF	1.94	66
EGF-R	1.80	65
IGF-1	1.94	65
IGF-R	1.82	65

**Tabelle 3** RTq-PCR-Bedingungen für die jeweils untersuchten Gene und β-Actin als „Housekeeping“ Gen

Die vergleichende Genexpressionsanalyse wurde anhand der ermittelten Ct-Werte und Primereffizienzen nach der von Pfaffl beschriebenen Methode durchgeführt [Pfaffl 2001].

Dabei diente  $\beta$ -Aktin als Standard, zu dem die ermittelten Messwerte der untersuchten Gene per Subtraktion in Beziehung gesetzt wurden ( $\Delta$ Ct-Methode).

### Immunhistochemie

Da die Genprodukte der mittels RTq-PCR untersuchten Gene in der A64-Tumorzelllinie bislang immunhistochemisch noch nicht charakterisiert worden sind, wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen zur Darstellung der codierten Proteine durchgeführt.

Die auf Deckgläser aufgebrauchten A64-CLS-Zellen wurden mit Formalin fixiert und mit Triton X 100 0,1% solubilisiert. Zur orientierenden Beurteilung wurden die Präparate mit Hematoxylin und Eosin (HE) angefärbt und lichtmikroskopisch (Zeiss Axio-Imager A.1, Firma Zeiss, Oberkochen) untersucht. Anschließend wurde jedes der zu untersuchenden Genprodukte immunhistochemisch dargestellt:

Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde durch Inkubation der Präparate mit jeweils 700  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) in 70 ml Methanol unterdrückt.

Vor Inkubation (60 min. bei Raumtemperatur) mit den Primärantikörpern gegen IGF-1 (Firma Biologo, Kronshagen, Deutschland), hBD-1, -2, -3, DEFA1/3, DEFA4 (Firma Quartett GmbH, Berlin, Deutschland), S100A4, Psoriasin, COX-2, DOC-1 (Firma Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), EGF, EGFR, IGFR und Ki-67 (Gentaur, Aachen, Deutschland) wurden unspezifische antigene Determinanten mit herkömmlichem humanem Serum blockiert. Nach erneutem Waschen in TBS-Puffer wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 30 min. mit dem HRP (Horse-Raddish-Peroxidase) –konjugierten Sekundärantikörper überschichtet. Nach abermaligem Waschen (TBS) erfolgte die Inkubation mit Diamino-Benzidin-Tetrachlorid (DAB) als

Substrat für die immunhistochemische Färbereaktion und anschließend die Gegenfärbung mit HE (Hematoxylin/Eosin, Firma Merck Eurolab, Dietikon, Schweiz). Zur Kontrolle der Antikörperspezifität wurden in jedem Ansatz eine Negativkontrolle ohne primären Antikörper sowie eine Positivkontrolle mit sicher positivem Färbeverhalten, mitgeführt.

### Statistische Analyse

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism, Version 4.03 für Windows, GraphPad Software (San Diego, USA) mit dem one-way ANOVA und Bonferroni-Post-Test durchgeführt.  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

## Ergebnisse

### RT-PCR Analysen

Die optimale Wirkung des rekombinanten IGF-1 auf die Zielgene (hBD-1, -2, -3, DEFA1/3, DEFA4, S100A4, Psoriasin, COX-2, DOC-1, EGF, EGFR, IGFR und Ki-67) wurde bei einer Konzentration von 1 ng/ml gefunden, da hier die größten relativen Veränderungen festgestellt wurden. Die Ergebnisse der Stimulationsversuche zur Optimierung der IGF-1-Konzentration sind in den Tabellen 4 bis 9 zusammengefasst. Bei 5,0 ng IGF-1/ml konnte die 24 h Messung nicht durchgeführt werden, da keine intakte RNA nachgewiesen werden konnte; diese Versuchsreihe wurde, da sich eine optimale IGF-1-Wirkung bereits bei 1 ng/ml gezeigt hatte, aus Kostengründen nicht erneut durchgeführt.

Gen/Zeit	t 0	4 h	8 h	1 d	2 d	3 d
hBD-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hBD-2	1	0.0073	0.134	0.072	0.31	0.077
hBD-3	1	0.144	0.71	0.35	0.35	1.23
Psoriasin	1	0.25	4.0	0.66	2.0	2.0
S100A4	1	0.41	0.47	0.54	0.33	0.41
DEFA1/3	1	0.072	0.50	0.47	0.15	0.095
DEFA4	1	0.71	1.74	1.07	3.25	1.74
Cox-2	1	0.66	0.57	3.0	0.93	0.33

Doc-1	1	0.47	1.15	0.54	0.5	0.072
Ki67	1	1.52	1.07	2.30	4.9	2.46
EGF	1	2.83	2.14	1.87	3.03	0.38
IGF-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EGF-R	1	0.53	0.93	0.36	0.36	0.23
IGF-R	1	12.1	4.9	6.1	7.0	7.5

**Tabelle 4** Relative Genexpression von stimulierten vs. unstimulierten A64-Zellen im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin. Die Zellen sind mit **0,2** ng IGF-1/ml stimuliert worden; n.d. = nicht detektierbar.

Gen/Zeit	t 0	4 h	8 h	1 d	2 d	3 d
hBD-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hBD-2	1	0.0146	0.0180	0.095	0.93	4.0
hBD-3	1	0.54	1.23	0.268	4.60	0.00129
Psoriasin	1	0.35	0.38	1.74	1.74	0.71
S100A4	1	0.93	0.57	1.87	0.81	2.14
DEFA1/3	1	0.20	0.23	1.4	0.47	2.46
DEFA4	1	4.9	1.9	2.0	2.46	1.3

Cox-2	1	0.93	0.5	1.5	1.5	3.7
Doc-1	1	0.0028	0.011	0.003	0.003	0.0014
Ki67	1	13.0	8.0	55.7	1.9	84.5
EGF	1	13.9	6.1	22.6	1.6	52.0
IGF-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EGF-R	1	4.6	0.8	21.1	1.3	22.6
IGF-R	1	11.3	10.6	19.7	1.9	27.9

**Tabelle 5** Relative Genexpression von stimulierten vs. unstimulierten A64-Zellen im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin. Die Zellen sind mit **1,0** ng IGF-1/ml stimuliert worden; n.d. = nicht detektierbar.

Gen/Zeit	t 0	4 h	8 h	2 d	3 d
hBD-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hBD-2	1	1.1	0.067	1.4	9.9
hBD-3	1	3.5	1.5	18.4	29.9
Psoriasin	1	4.0	7.0	3.5	1.2
S100A4	1	1.1	0.067	0.4	4.3
DEFA1/3	1	0.23	0.072	0.44	1.5
DEFA4	1	6.5	0.5	2.46	0.76

Cox-2	1	0.71	0.67	1.1	0.57
Doc-1	1	2.1	0.31	13.9	5.3
Ki67	1	2.8	0.66	9.8	13.0
EGF	1	8.0	2.1	2.5	0.6
IGF-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EGF-R	1	0.87	0.38	14.9	1.5
IGF-R	1	8.6	1.5	4.3	3.5

**Tabelle 6** Relative Genexpression von stimulierten vs. unstimulierten A64-Zellen im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin. Die Zellen sind mit **5,0** ng IGF-1/ml stimuliert worden; n.d. = nicht detektierbar.

Gen/Zeit	t 0	4 h	8 h	1 d	2 d	3 d
hBD-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hBD-2	1	0.021	0.0190	0.0063	0.23	0.93
hBD-3	1	0.13	2.6	0.5	1.1	2.46
Psoriasin	1	0.7	0.33	0.2	0.29	0.16
S100A4	1	0.38	1.0	0.1	0.25	3.7
DEFA1/3	1	0.20	1.5	0.3	0.57	0.54

DEFA4	1	1.6	3.2	0.3	0.23	0.38
Cox-2	1	2.6	0.7	2.0	1.1	4.0
Doc-1	1	2.0	1.8	1.7	1.4	1.4
Ki67	1	5.7	34.3	5.7	3.0	4.9
EGF	1	3.7	24.3	5.2	1.4	1.2
IGF-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EGF-R	1	1.9	3.2	1.3	1.1	1.1
IGF-R	1	6.7	36.8	5.3	1.1	2.1

**Tabelle 7** Relative Genexpression von stimulierten vs. unstimulierten A64-Zellen im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin. Die Zellen sind mit **50** ng IGF-1/ml stimuliert worden; n.d. = nicht detektierbar.

Gen/Zeit	t 0	4 h	8 h	1 d	2 d	3 d
hBD-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hBD-2	1	0.0002	0.0030	0.00064	0.0015	0.00098
hBD-3	1	0.0014	0.0013	0.0036	0.0052	0.013
Psoriasin	1	0.036	0.016	0.019	0.013	0.038
S100A4	1	0.38	1.0	0.1	0.25	3.7

DEFA1/3	1	0.09	0.024	0.036	0.0060	0.0018
DEFA4	1	0.12	0.11	0.040	0.125	0.27
Cox-2	1	0.025	0.011	0.047	0.047	0.11
Doc-1	1	0.017	0.041	0.022	0.036	0.047
Ki67	1	0.25	0.4	0.23	0.031	0.41
EGF	1	0.76	0.44	1.0	0.18	0.5
IGF-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EGF-R	1	0.22	0.29	0.76	0.12	0.14
IGF-R	1	0.87	1.1	0.54	0.19	1.2

**Tabelle 8** Relative Genexpression von stimulierten vs. unstimulierten A64-Zellen im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin. Die Zellen sind mit **250** ng IGF-1/ml stimuliert worden; n.d. = nicht detektierbar.

Die Bestimmung der relativen Genexpression nicht-stimulierter A64-CLS-Zellen erfolgte im Vergleich mit dem „Housekeeping-Gen“  $\beta$ -Aktin. Hierbei war auffällig, dass die untersuchte Zelllinie keine nachweisbare hBD-1- und IGF-1-Genexpression aufwies. Die Expression von hBD-2 und -3 war im Vergleich zu  $\beta$ -Aktin stark erniedrigt (hBD-2: 42372-fach, hBD-3: 227.272-fach) und bei DEFA4 an der Nachweiskante (2.222.222-

fach). Die Genexpression von S100A4 entsprach beinahe der von  $\beta$ -Aktin (1,16-fache Reduktion). Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Gen	rel. Expression
hBD-1	n.d.
hBD-2	0.0000236
hBD-3	0.0000044
Psoriasin	0.0001326
S100A4	0.853
DEFA1/3	0.000956
DEFA4	0.00000045
Cox-2	0.00088
Doc-1	0.0359
Ki67	0.0022
EGF	0.000286
IGF-1	n.d.
EGF-R	0.0167
IGF-R	0.000644

**Tabelle 9** Relative Genexpression von nicht-stimulierten A64-Zellen im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin; n.d. = nicht detektierbar.

Nach Bestimmung der optimalen IGF-1 Wirkung auf die A64-CLS-Zelllinie bei 1 ng/ml erfolgte die IGF-1 Stimulation in n=6 Versuchen mit den Messungen der Genexpressionen der jeweiligen Zielgene nach 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h. Die relative Genexpressionsänderung wurde nach Pfaffl berechnet [Pfaffl 2001]. Referenz-Gen war wiederum  $\beta$ -Aktin. Hierbei war auffällig, dass es auch unter Stimulation mit IGF-1 zu keiner nachweisbaren hBD-1 Expression kam. IGF-1 war weiterhin nicht nachweisbar. Die ohnehin stark erniedrigten Expressionen von hBD-2 und -3 wurden nach Stimulation mit IGF-1 weiter gesenkt (hBD-2: 27,8-fach; hBD-3 166,7-fach). Dieser Effekt zeigte sich bis zur 48 h Messung, danach war wiederum ein diskreter Anstieg der hBD-2 und -3 Expression zu verzeichnen. Die anderen Zielgene wurden in ihrer Expression durch IGF-1 Stimulation kaum verändert. Auch der IGF-Rezeptor lies sich in der A64 Zelllinie durch IGF-1 in seinem Expressionsmuster nicht beeinflussen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

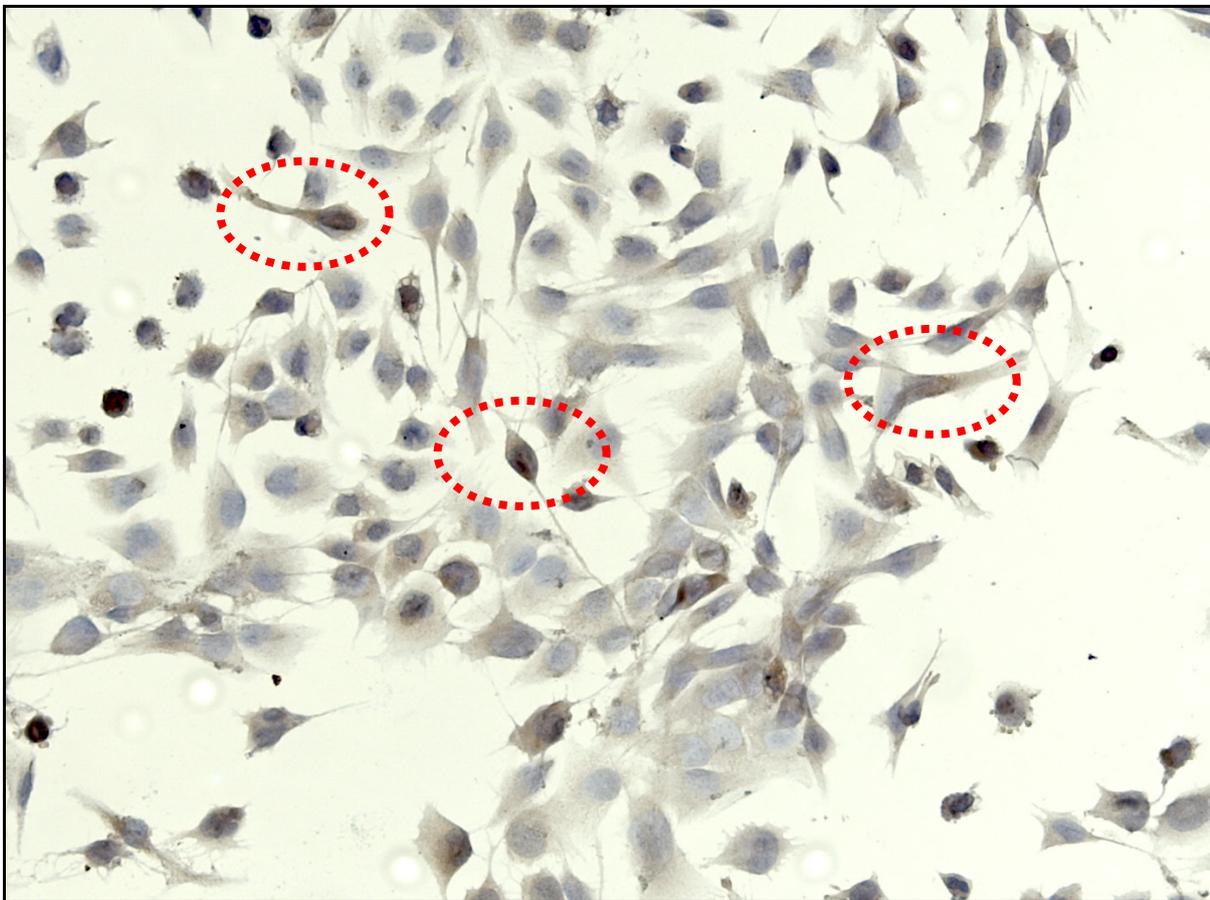
Inkubationszeit	hBD-1	hBD-2	hBD-3	S100A7	S100A4	DEFA1	DEFA4
4 h	n.d.	0.072	0.036	1.32	0.98	0.81	1.11
		$\pm 0.009$	$\pm 0.006$	$\pm 0.56$	$\pm 0.49$	$\pm 0.22$	$\pm 0.59$
8 h	n.d.	0.20	0.041	1.32	1.03	1.52	1.41
		$\pm 0.08$	$\pm 0.005$	$\pm 0.50$	$\pm 0.41$	$\pm 0.63$	$\pm 0.85$
24 h	n.d.	0.97	0.034	4.92	3.03	1.87	2.83
		$\pm 0.19$	$\pm 0.012$	$\pm 0.86$	$\pm 0.95$	$\pm 0.94$	$\pm 0.94$
48 h	n.d.	0.036	0.006	1.11	0.93	0.22	0.33
		$\pm 0.008$	$\pm 0.0005$	$\pm 0.44$	$\pm 0.47$	$\pm 0.036$	$\pm 0.083$
72 h	n.d.	0.177	0.021	3.73	2.0	2.14	1.21
		$\pm 0.045$	$\pm 0.006$	$\pm 0.98$	$\pm 0.3$	$\pm 0.97$	$\pm 0.01$

Inkubationszeit	Doc-1	Ki67	EGF	EGF-R	IGF	IGF-R
4 h	0.76 ±0.19	0.62 ± 0.27	0.72 ± 0.046	0.73 ± 0.39	n.d.	0.54 ±0.42
8 h	1.0 ±0.5	0.84 ± 0.18	0.60 ± 0.26	0.95 ± 0.68	n.d.	0.57 ±0.18
24 h	1.74 ±0.44	1.04 ± 0.42	0.72 ± 0.38	0.79 ±0.45	n.d.	0.97 ±0.58
48 h	0.91 ±0.42	0.90 ± 0.28	1.25 ± 0.70	0.5 ±0.18	n.d.	0.72 ±0.27
72 h	0.88 ±0.44	1.17 ± 0.36	0.60 ± 0.34	0.66 ±0.45	n.d.	0.75 ±0.04

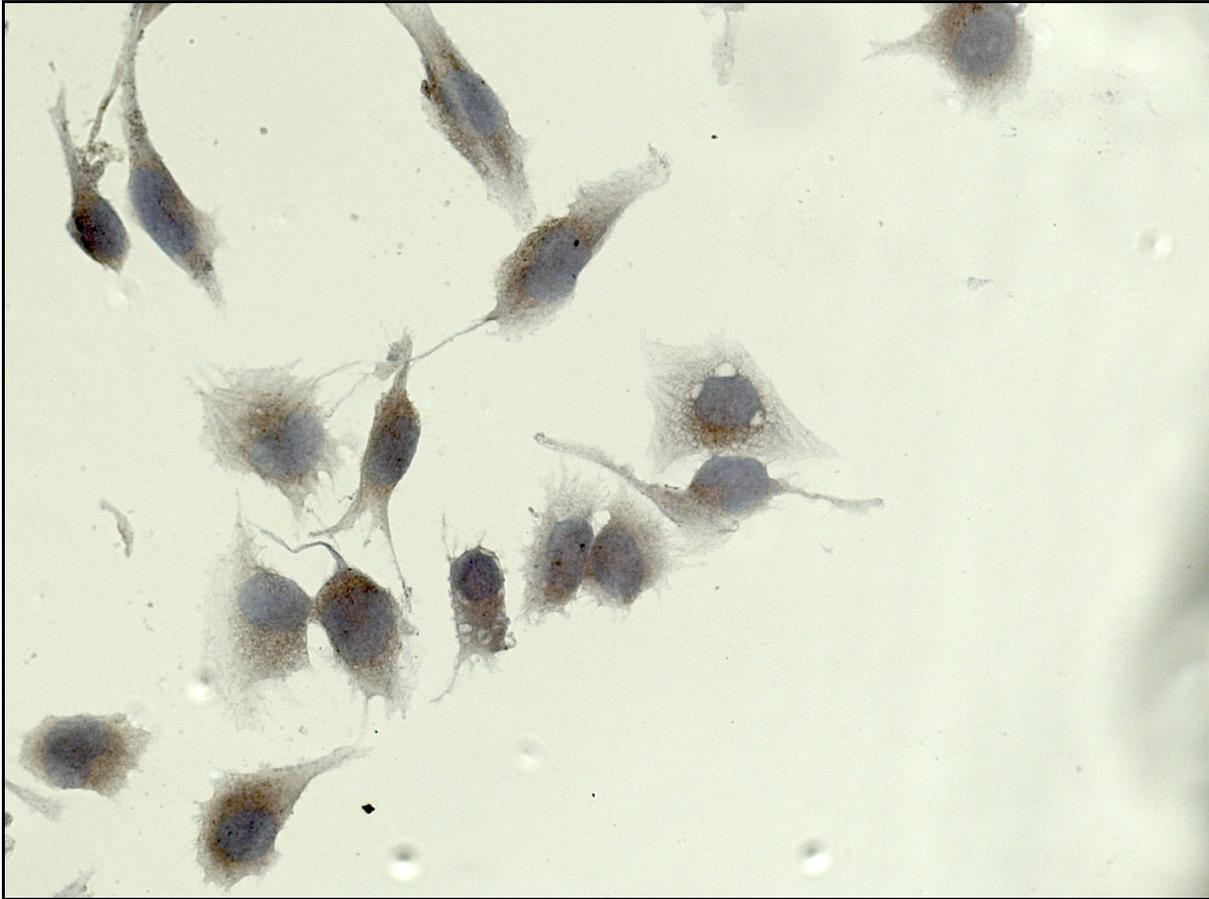
**Tabelle 10** Relative Genexpressionsänderung der A64-CLS-Zellen nach Stimulation mit 1 ng/ml IGF-1 (n=6); n.d. = nicht detektierbar. **Gelb** unterlegt = statistisch im Vergleich zur Kontrolle signifikante Genexpressionsänderungen ( $p \leq 0,001$ ).

## Immunhistochemie

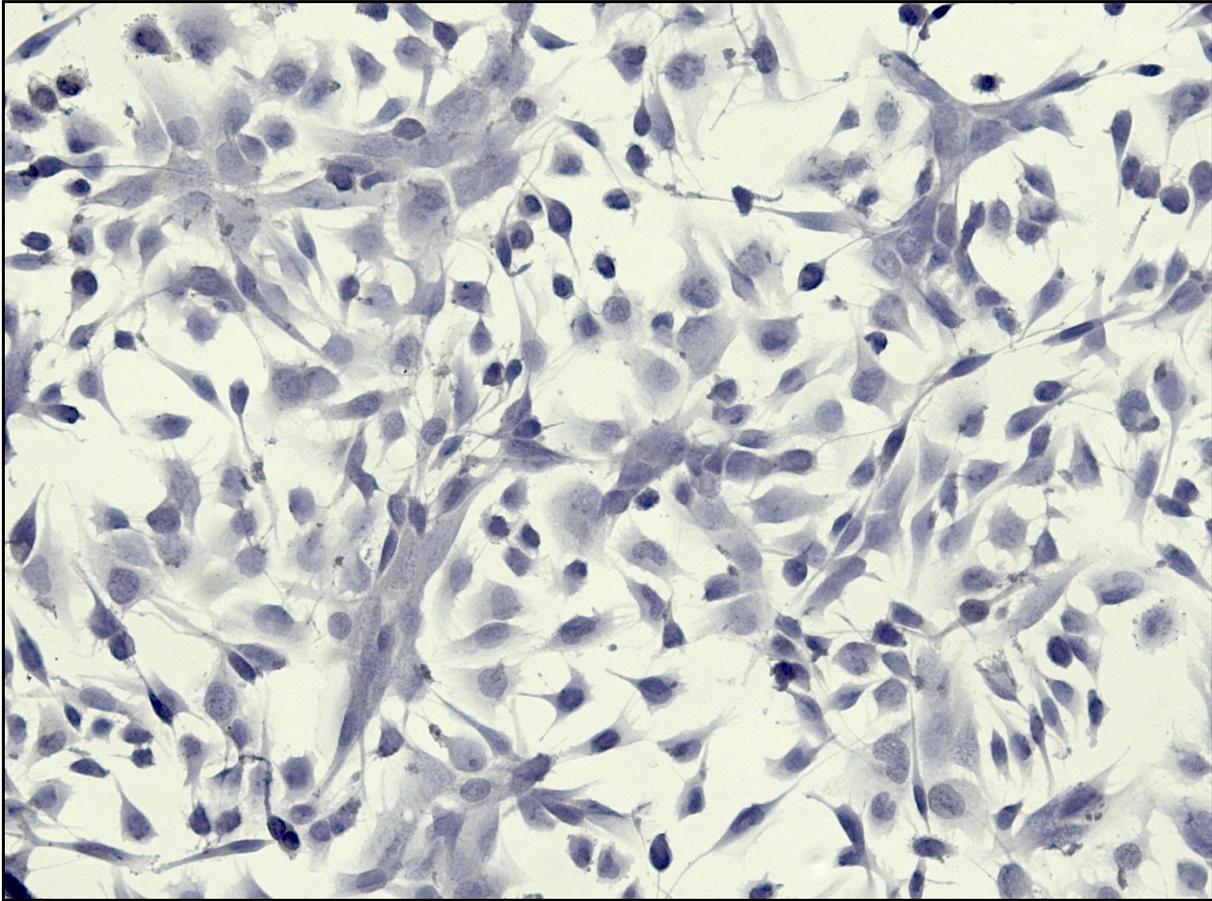
Die Genprodukte aller mittels RT-PCR analysierten Gene, außer hBD-1 und IGF-1 konnten immunhistochemisch in den A64-CLS-Zellen dargestellt werden. Die Abbildungen 5 und 6 zeigen exemplarisch die immunhistochemischen Färbungen für IGFR nach Stimulation mit IGF-1. Die Abbildungen 7 und 8 zeigen, dass sich immunhistochemisch kein hBD-1 Genprodukt nachweisen ließ.



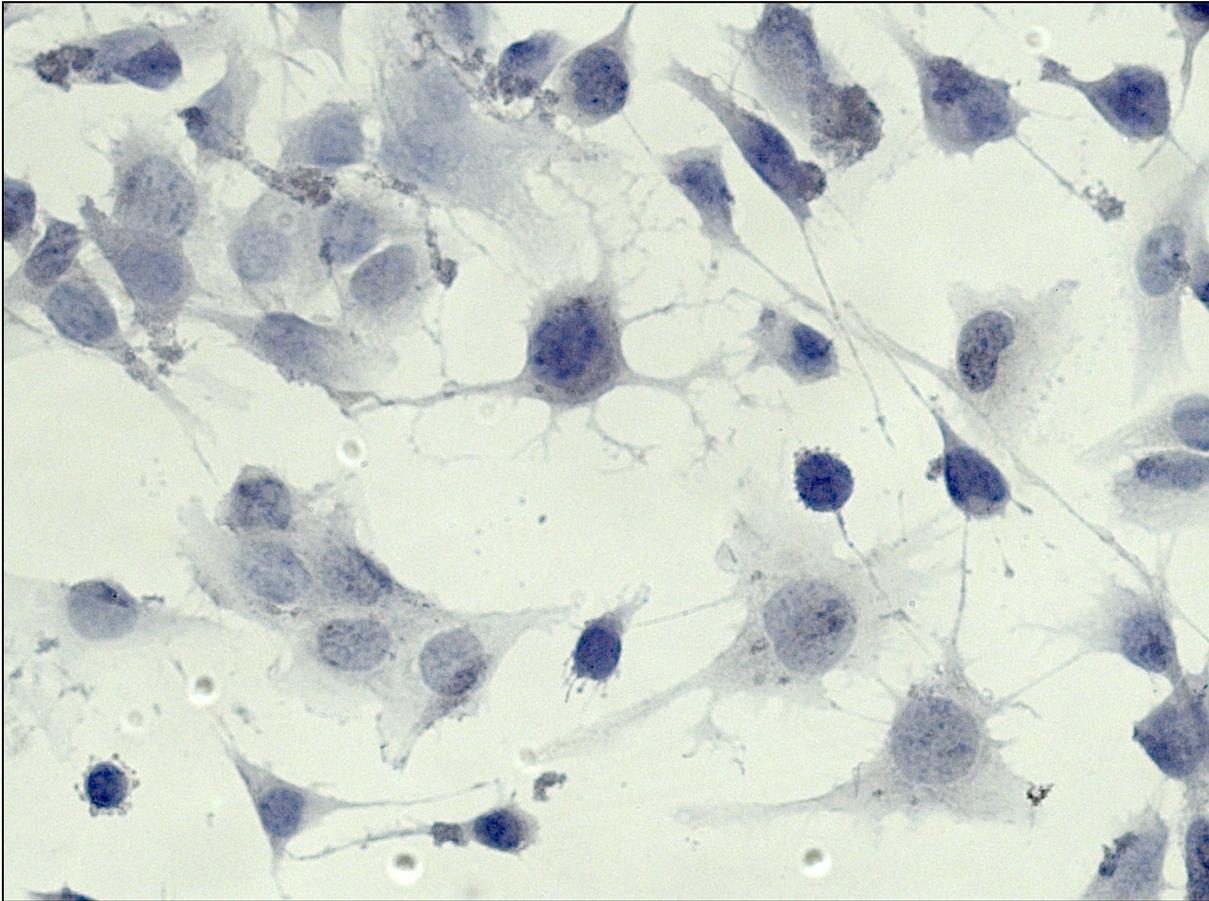
**Abbildung 5** zeigt die spezifische zytoplasmatische immunhistochemische Darstellung von IGFR (exemplarisch: rote Markierung an drei Zellen) in den A64-CLS-Zellen vor Stimulation mit IGF-1 (Vergrößerung: 20-fach, A64-CLS-Zellen auf Deckgläser aufgebracht und mit Formalin fixiert).



**Abbildung 6** zeigt die immunhistochemische Darstellung von IGFR in den A64-CLS-Zellen vor Stimulation mit IGF-1 als vergrößerten Bildausschnitt (Vergrößerung: 40-fach, A64-CLS-Zellen auf Deckgläser aufgebracht und mit Formalin fixiert).



**Abbildung 7** zeigt die immunhistochemische Darstellung der hBD-1 defizienten A64-CLS-Zellen (Vergrößerung: 20-fach, A64-CLS-Zellen auf Deckgläser aufgebracht und mit Formalin fixiert).



**Abbildung 8** zeigt die immunhistochemische Darstellung der hBD-1 defizienten A64-CLS-Zellen (Vergrößerung: 40-fach, A64-CLS-Zellen auf Deckgläser aufgebracht und mit Formalin fixiert).

## Diskussion

Tumoren der Speicheldrüse stellen eine inhomogene Gruppe verschiedener gutartiger und bösartiger Läsionen der kleinen und großen Speicheldrüsen dar, deren primär operative Therapie von Hals-Nasen-Ohrenärzten und Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen, bei Rezidiven oder inoperablen Tumoren zusätzlich, oder in erster Linie, von Onkologen und Strahlentherapeuten durchgeführt wird. Die Risikoabschätzung eines Speicheldrüsentumors erfolgt nach entsprechenden histomorphologischen Parametern, gegebenenfalls ergänzt durch spezielle immunhistochemische Untersuchungen. Es existieren bislang keine verlässlichen molekularpathologischen Marker in Ergänzung zu den konventionellen klinischen und histologischen Mitteln zur Einschätzung des zu erwartenden biologischen Verhaltens der Tumoren, insbesondere ihrer Rezidivwahrscheinlichkeit. Darüber hinaus wurden bis jetzt kaum systematische Untersuchungen durchgeführt, welche die Genexpression bekannter, onkologisch relevanter Gene mit neueren, in diesem Zusammenhang noch nicht erforschten Genen verknüpfen, um so ein besseres Verständnis der Molekularpathologie dieser Kopf-Hals-Tumoren zu erreichen. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Auswirkung von IGF-1 auf die Expression der Tumorsuppressor- und Onkogene hBD-1, -2, -3, DEFA1/3 und DEFA4, der S100 Proteine S100A4 und Psoriasin, COX-2, DOC-1, EGF, EGFR, IGFR und Ki-67.

Da IGF-1 in vitro und in vivo sowohl eine anti-apoptotische als auch eine pro-mitotische Potenz zu besitzen scheint [Dossus und Kaaks 2008], wurde es in der vorliegenden Studie zur Stimulation einer A64-CLS-Speicheldrüsentumorzelllinie verwendet. In der Literatur wurde eine erhöhte IGF-1-Expression in verschiedenen

Tumorentitäten, wie Kolonkarzinomen, Mammakarzinomen und Bronchialkarzinomen gefunden [Carboni et al. 2005]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von freiem IGF-1 im Blut mit dem Risiko zur Entwicklung eines Mammakarzinoms bei Frauen, bzw. eines Prostatakarzinoms bei Männern korreliert zu sein scheint [Dossus und Kaaks 2008; Carboni et al 2005; Chan et al. 1998, Hankinson et al. 1998]. Wohingegen die oben genannten Tumorentitäten relativ gut untersucht sind, gibt es zur Rolle von IGF-1 in Speicheldrüsentumoren bislang keine Daten.

Bei der untersuchten A64-CLS-Zelllinie (Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland) handelt es sich um immortalisierte Zellen eines Adenokarzinoms der Glandula submandibularis eines 63-jährigen Europäers. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die untersuchte A64-Zelllinie IGF-1-defizient ist (Tabelle 9). Dieses Ergebnis ist insoweit interessant, weil es im Gegensatz zu der erhöhten IGF-1-Expression steht, die in anderen Studien in verschiedenen Tumorentitäten (Colon, Mamma, Prostata, etc.) gefunden wurde [Dossus und Kaaks 2008; Carboni et al 2005; Chan et al. 1998; Hankinson et al. 1998}. Dieser Umstand macht die A64-CLS-Zelllinie zu einem idealen Modell für die Untersuchung der Wirkung von IGF-1 auf Tumorzellen, da die Stimulation durch das exogen in die Zellkultur eingebrachte IGF-1 keiner intrazellulären IGF-1-Regulation/Gegenregulation unterliegt, welche das Ergebnis beeinflussen könnte. Darüber hinaus war bemerkenswert, dass sich in den IGF-1-defizienten Zellen auch durch die Stimulation mit IGF-1 keine signifikante Veränderung der IGF-Rezeptor-Expression erreichen ließ (Tabelle 10). Hierbei wäre jedoch zu diskutieren, ob Proliferation und mitogene Aktivität in der untersuchten A64-CLS-Zelllinie nicht unabhängig von dem oben beschriebenen, bekannten Aktivierungsweg zur IGF-

Induktion ist (siehe Einleitung), sondern in Tumoren über eine bislang noch nicht beschriebene, alternative Signaltransduktionskaskade verläuft.

Carboni et al. konnten in einem Mausmodell mit iatrogen überstimuliertem IGF-Rezeptor Adenokarzinome der Speicheldrüsen induzieren. Anschließend konnte die Tumorausbreitung dieser Speicheldrüsentumoren durch Inhibition der Tyrosin-Kinase am IGF-Rezeptor verhindert werden [Carboni et al. 2005]. Diese Ergebnisse stehen allerdings im Gegensatz zu dargestellten Beobachtungen in der A64-CLS-Zelllinie: hier konnte durch Stimulation mit IGF-1 keine erhöhte Proliferation, gemessen durch Expression des Proliferationsmarkers Ki67, erreicht werden (Tabelle 10). Hierzu ist zu bemerken, dass zwar bei den Vorversuchen zur Bestimmung der optimalen IGF-1-Konzentration bei 1 ng eine Genexpressionserhöhung der Zielgene Ki67, EGF, EGFR und IGFR nachweisbar war (Tabelle 5), diese jedoch bei den Hauptversuchen mit n=6 Versuchen/Zielgen statistisch nicht mehr signifikant war.

Daher scheinen Proliferationsaktivierung und Verlust der Zellzykluskontrolle in der untersuchten Zelllinie über einen alternativen Mechanismus als die von Carboni et al. (2005) zugrunde gelegte IGF-Signaltransduktionskaskade abzulaufen. Welche Gene hierbei im Einzelnen beteiligt sind konnte mit dem Design der vorliegenden Studie nicht beantwortet werden. Mutmaßlich könnten hBD-2 und -3, gegebenenfalls als Antagonistenpaar, beteiligt sein. Aus dem in dieser Studie dargestellten Expressionsmuster und Ergebnissen aus der aktuellen Literatur [Pantelist et al. 2008; Sun et al. 2006; Wenghoefer et al. 2008a und b] käme dabei hBD-3 eine proliferationsfördernde und hBD-1 eine proliferationshemmende Rolle zu.

In diesem Zusammenhang war auffällig, dass analog zu der IGF-1-Defizienz auch hBD-1 in der A64-Zelllinie nicht nachweisbar war (Tabelle 9). Humane Defensine

wurden zunächst nur im Zusammenhang mit der lokalen Infektabwehr exponierter Stellen des menschlichen Körpers (Mundhöhle, Nasen-Rachen-Raum, Urogenitaltrakt, etc) beschrieben, wo ihre Transkriptionsprodukte aufgrund ihrer positiven Ladung und Oberflächeneigenschaften die Membranen verschiedener Pilze, Bakterien und Viren desintegrieren können [Dommisch et al. 2005]. Erst Untersuchungen an Nierenzellkarzinomen und Prostatakarzinomen führten zu der Hypothese, dass es sich bei dem ubiquitären, durch entzündliche Stimuli nicht induzierbaren hBD-1 um ein Tumorsuppressorgen handeln könnte [Donald et al. 2003; Sun et al. 2006]. Diese Ergebnisse führten dann zur Untersuchung der hBD-1-Genexpression in Kopf-Hals-Tumoren. Auch hier zeigte sich, analog zur Reduktion der hBD-1-Genexpression in Tumoren des Urogenitaltraktes, ebenfalls eine deutliche Reduktion von hBD-1 in Plattenepithelkarzinomen der Mundschleimhaut [Wenghoefer et al. 2008] und in Speicheldrüsentumoren [Pantelis et al. 2008]. Die mögliche Funktion von hBD-1 als Tumorsuppressorgen wird nun durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weiter unterstützt, da die untersuchte A64-Zelllinie nicht nur eine reduzierte hBD-1-Genexpression, wie in den untersuchten Kopf-Hals-Tumoren aufweist, sondern komplett hBD-1-defizient ist.

Weiterhin bemerkenswert war, dass die Genexpressionen der induzierbaren Defensine hBD-2 und -3 im Vergleich mit der Expression des „Housekeeping-Gens“  $\beta$ -Actin in den A64-Zellen ebenfalls stark erniedrigt war (Tabelle 9). Wurden diese beiden Defensine auch in neueren Untersuchungen eher in Zusammenhang mit der humoralen Infektabwehr gesehen [Dommisch et al. 2005; Pantelis et al. 2008; Wenghoefer et al. 2008], scheint sich in der vorliegenden Arbeit ein Hinweis zu ergeben, dass auch diese beiden Gene an der Onkogenese von Speicheldrüsentumoren beteiligt sein könnten.

Für diese Hypothese spricht, dass es unter Stimulation mit IGF-1 zu einem weiteren Abfall der hBD-2- und -3-Expression kam (hBD-2: 27,8-fach; hBD-3 166,7-fach), wohingegen die anderen Zielgene durch die IGF-1-Stimulation in Ihrem Expressionsmuster nicht oder nicht signifikant verändert wurden. Der Abfall der hBD-2- und -3-Expression ist hierbei jedoch nicht linear (Tabelle 10). Dies könnte durch eine Gegenregulation dieser Gene durch entsprechende andere Gene und bislang nicht bekannte Regelkreise erfolgt sein. So findet man 24 h nach IGF-1 Stimulation von hBD-2 den geringsten und statistisch nicht mehr signifikanten Abfall der Genexpression, gleichzeitig aber eine geringe (jedoch auch nicht signifikante) Genexpressionserhöhung von S100A7. Zwar ist anhand dieser sehr begrenzten Daten ein solcher Zusammenhang rein spekulativ, verdeutlicht aber als Beispiel wie sich verschiedene Gene regulierend beeinflussen könnten.

Es stellt sich also die Frage, ob hBD-2 und -3 nicht über ihre Funktion in der humoralen Infektabwehr hinaus auch eine Aufgabe in der Kontrolle des Zellzyklus wahrnehmen. Dabei sollte in weiteren Versuchen untersucht werden, ob die Beeinflussung des Zellzyklus von Tumorzellen ausschließlich durch hBD-1 erfolgt, oder aber ob das Expressionsmuster aller drei Gene bei der Onkogenese verschiedener Kopf-Hals-Tumorentitäten von Bedeutung ist und wenn dies der Fall sein sollte, wie sie sich gegenseitig beeinflussen.

Während also die Rolle der  $\beta$ -Defensine in letzter Zeit auch im Zusammenhang mit der Tumorentstehung und Ausbreitung verschiedener Tumorentitäten untersucht wird, gibt es im Hinblick auf den Einfluss der humanen  $\alpha$ -Defensine auf die Tumorentstehung bislang noch keine Daten. In der vorliegenden Arbeit fiel allerdings auf, dass die relative Genexpression beider untersuchten Defensine (DEFA1/3 und

DEFA4) in den nicht stimulierten A64-CLS-Zellen im Vergleich mit  $\beta$ -Actin analog zu den hBDs erniedrigt war. Während DEFA1/3 1046-fach erniedrigt war, fand sich für DEFA4 eine Erniedrigung um das 2.222.222-fache (Tabelle 9). Da die  $\alpha$ -Defensine ebenfalls in einem Gencluster auf Chromosom 8 lokalisiert sind und entsprechende Verwandtschaft zu den hBDs aufweisen [Lehrer et al. 1993, Froy et al. 2005], könnte auch für sie eine Rolle in der Tumorentstehung angenommen werden. Nach Stimulation mit IGF-1 zeigte sich allerdings nicht wie bei hBD-2 und -3 ein weiterer deutlicher Abfall der Genexpression, sondern wie bei den anderen untersuchten Zielgenen (.S100A4, Psoriasin, COX-2, DOC-1, EGF, EGFR, IGFR und Ki-67) ein von IGF-1 weitestgehend unabhängiges Expressionsmuster (Tabelle 10).

Eine niedrige Ausgangs-Genexpression konnte also für alle untersuchten Defensine gezeigt werden, es findet sich jedoch nur bei hBD-2 und -3 eine Abhängigkeit von IGF-1, möglicherweise über einen bislang unbekanntem Regelkreis. Da die A64-CLS-Zellen jedoch für hBD-1 defizient waren, wäre eine interessante Fragestellung, ob in einer Zelllinie mit intaktem hBD-1 die hBD-1-Genexpression durch IGF-1 beeinflusst werden kann. Diese Frage ist deshalb interessant, weil sich vor allem für hBD-1 in der Literatur Hinweise finden, dass das ubiquitär exprimierte, nicht induzierbare Gen ein Tumorsuppressorgen sein könnte [Donald et al. 2003; Sun et al. 2006; Pantelis et al. 2008; Wenghoefer et al. 2008a und 2008b].

Eine Herabregulation von DOC-1 wird häufig in fortgeschrittenen Stadien verschiedener Kop-Hals-Tumoren gefunden und wird in der Literatur mit einer ungünstigen Prognose für die Patienten in Verbindung gebracht [Shintani et al 2001; Peng et al. 2006]. In der vorliegenden Studie fand sich kein kompletter Ausfall der DOC-1-Genexpression, wie im Fall von hBD-1 und IGF-1. Verglichen mit der starken

Erniedrigung von z. B. DEFA4 war der Ausgangswert von DOC-1 in den nicht stimulierten A64-CLS-Zellen nicht stark herabgesetzt (Tabelle 9). Nach Stimulation mit IGF-1 fand sich auch keine nennenswerte Veränderung der DOC-1-Genexpression (Tabelle 10), sodass DOC-1 in der A64-CLS-Zelllinie keine onkogene Bedeutung zu haben scheint. Es finden sich z. Z. in der Literatur auch keine Arbeiten, die über einen totalen oder subtotalen DOC-1-Ausfall in Speicheldrüsentumoren berichten. DOC-1 scheint eher eine Relevanz in Plattenepithelkarzinomen der Mundschleimhaut zu haben [Shintani et al. 2001 und 2002].

Eine Überexpression von EGF und EGFR wird in einer Reihe von bösartigen epithelialen Tumoren gefunden und ist ebenfalls mit einer schlechten Prognose verbunden [Bianchi et al. 2006; Katori et al. 2007]. In pleomorphen Adenomen der Speicheldrüsen scheint eine EGFR-Überexpression ein frühes Ereignis bei der malignen Transformation in ein Adenokarzinom zu sein [Katori et al. 2007]. In der vorliegenden Arbeit fand sich keine EGF- oder EGFR-Überexpression, weder vor, noch nach Stimulation mit IGF-1 (Tabelle 9 und 10). Daher ist davon auszugehen, dass beide Gene in der untersuchten Adenokarzinomzelllinie keine Relevanz zu haben scheinen. Falls die EGFR-Überexpression ein frühes Ereignis in der Malignisierung von Speicheldrüsenzellen darstellen sollte [Katori et al. 2007], könnte es sein, dass sich in den Zellen eines manifesten Karzinoms ein anderes Expressionsmuster für beide Gene findet, und stattdessen andere Gene die sukzessive Malignisierung der Tumorzellen begünstigen.

Beobachtungen zu einer möglichen Relevanz der S100-Proteine Psoriasin und S100A4 in der Onkogenese von Kopf-Hals-Tumoren stammen vornehmlich aus Arbeiten über Mammakarzinome [Watson et al. 1998; Chen et al. 2001]. Die Überlegung bei Auswahl

dieser Gene war, dass aufgrund der Drüsenstruktur der Speicheldrüsengewebe ähnliche molekularpathologische Veränderungen zu beobachten sein könnten, wie in Tumoren der Brustdrüse. Diese Vermutung konnte in der A64-CLS-Tumorzelllinie allerdings nicht bestätigt werden.

Eine ähnliche Überlegung hatte zur Auswahl von COX-2 als Zielgen für IGF-1 geführt: In der Literatur sind Veränderungen der COX-2-Genexpression mit der Mortalität von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren in Verbindung gebracht worden [Zhang et al. 2008]. Allerdings handelte es sich bei den Literaturangaben in erster Linie um Studien anhand von Plattenepithelkarzinomen des oropharyngealen Bereichs. Diese verfügen wahrscheinlich ähnlich wie die oben genannten Mammakarzinome über eine andere Molekularpathologie als die untersuchten Speicheldrüsentumorzellen, da es sich um Tumoren handelt, die histogenetisch einem anderen Ursprungsgewebe zuzuordnen sind. Es ist zwar bekannt, dass in den großen Speicheldrüsen auch Plattenepithelkarzinome als Primärtumoren, ausgehend von den Epithelien der Drüsenausführungsgänge, entstehen können, aber die untersuchten A64-Zellen stammen aus einem Adenokarzinom, sind also histogenetisch der Drüse selbst zuzuordnen.

In welchem Maße die Quantifizierung verschiedener Gene in Speicheldrüsentumoren als Gradmesser für deren Potential zur malignen Progression sowie für ihre Rezidiv- und Metastasierungswahrscheinlichkeit eine Rolle spielen wird, müssen weiterführende Studien zeigen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass in Zukunft sich ständig verbessernde und kostengünstigere molekularbiologische Untersuchungsmethoden anhand einer Auswahl bestimmter relevanter Zielgene, prognostische Aussagen über das mögliche Verhalten eines Tumors zulassen würden. Auf diese Art und Weise könnten die

konventionellen klinischen und pathologischen Untersuchungsmethoden zur Risikoabschätzung von Speicheldrüsentumoren sinnvoll erweitert werden. Konkret könnte das bedeuten, dass für jede Tumorentität eine Gruppe von relevanten Genen festgelegt wird, die in entsprechenden Studien ihre Assoziation mit der Prognose der Patienten unter Beweis gestellt haben. Auf der ersten Stufe würde dann das klinische Staging stehen, gefolgt von der histopathologischen Aufarbeitung des Tumorgewebes anhand von konventionellen und immunhistochemischen Färbemethoden. Zusätzlich würde dann aus dem Tumorgewebe ein genetisches Profil anhand der für diese Tumorentität relevanten Gene erstellt. Somit würden sich die Werkzeuge zur Prognoseabschätzung eines Patienten dann aus klinischer Untersuchung, Bildgebung, gegebenenfalls entsprechenden nuklearmedizinischen Untersuchungsmethoden, histopathologischer Untersuchung und molekularpathologischer Untersuchung zusammensetzen. Gerade die molekularpathologische Untersuchung könnte zu einer Verbesserung der individuellen Risikoabschätzung führen.

Weiterhin könnten sich neben rein diagnostischen Aspekten auch therapeutische Optionen ergeben, etwa durch immunmodulatorische Therapiekonzepte in Ergänzung zu den konventionellen Chemo- und Bestrahlungstherapien. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang beispielsweise die Therapie mit rekombinanten Defensinen. Dies könnte ähnlich wie bei den z. Z. gebräuchlichen Antikörpern, z.B. gegen EGFR (Cetuximab®), wo zunächst ein Nachweis der entsprechenden Oberflächendeterminante im Tumorgewebe erfolgt, so durchgeführt werden, dass zuerst ein individuelles Profil über- oder unterexprimierter Gene erstellt wird. In einem zweiten Schritt könnte dann eine therapeutische Expressionseinstellung der entsprechenden Gene, z.B. durch gezielte Transkriptionshemmung bei überexprimierten Onkogenen bzw.

Transkriptionsaktivierung oder Therapie mit dem rekombinanten Transkriptionsprodukt bei unterexprimierten Tumorsuppressorgenen, erfolgen.

Damit diese Therapien jedoch erfolgreich in die Klinik eingebracht werden können, muss zuerst ein deutlich tiefer gehendes Verständnis der komplizierten molekularpathologischen Zusammenhänge in Speicheldrüsentumoren gegeben sein.

## Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es in vitro, in einer Speicheldrüsentumorzelllinie die Expression der onkogenetisch relevanten Gene hBD-1, -2, -3, DEFA1/3, DEFA4, S100A4, Psoriasin, COX-2, DOC-1, EGF, EGFR, IGFR und Ki-67 vor und nach Stimulation mit IGF-1 zu untersuchen, um auf diese Weise ein besseres Verständnis der Zusammenhänge verschiedener, bisher in Speicheldrüsentumoren kaum untersuchter Tumorsuppressor- und Onkogene zu erarbeiten.

Die Untersuchungen erfolgten an der kommerziell erhältlichen A64-CLS-Zelllinie, die aus dem Adenokarzinom der Glandula submandibularis eines 63-jährigen Patienten stammt. Die Untersuchung der Expression der Zielgene erfolgte nach Stimulation mit rekombinantem IGF-1 nach 0 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h mit dem „iCycler“. Als „Housekeeping Gen“ diente  $\beta$ -Actin. Die Darstellung der Genprodukte erfolgte immunhistochemisch nach Inkubation mit entsprechenden Primärantikörpern gegen die Genprodukte der oben genannten Zielgene, über Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper.

Die A64-Zelllinie war defizient für hBD-1 und IGF-1. Es zeigte sich bereits vor Stimulation mit IGF-1 im Vergleich zu  $\beta$ -Actin eine stark erniedrigte Genexpression der Defensine, insbesondere von DEFA4. Nach IGF-1-Stimulation fielen hBD-2 und -3 weiter ab, wohingegen DEFA1/3 und DEFA4 nicht beeinflusst wurden. Es war keine auffällige Veränderung des Expressionsmuster der anderen Zielgene nach IGF-1-Stimulation nachweisbar.

Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit kann man schlussfolgern, dass sich aufgrund ihrer IGF-1 Defizienz die A64-CLS-Zelllinie ideal für Stimationsversuche mit exogen eingebrachtem IGF-1 eignet.

Weiterhin steht aufgrund ihrer zusätzlichen hBD-1-Defizienz mit der A64-CLS-Zelllinie ein ideales Modell für die Untersuchung der Rolle von hBD-1 in der Onkogenese von Speicheldrüsentumoren zur Verfügung.

Darüber hinaus unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen die These, dass humane Defensine über ihre Funktion in der lokalen Infektabwehr hinaus eine Funktion in der Onkogenese von Speicheldrüsentumoren zu haben scheinen. Dies trifft insbesondere für hBD-1 zu; die Funktion von hBD-2, -3, DEFA1/3 und DEFA4 ist in diesem Zusammenhang noch unklar. IGF-1 trägt möglicherweise über eine bislang nicht bekannte Signaltransduktionskaskade zur Steuerung der  $\beta$ -Defensine bei; dies konnte in dieser Studie jedoch aufgrund der hBD-1-Defizienz der A64-CLS-Zelllinien nur für hBD-2 und -3 gezeigt werden.

## Literaturverzeichnis

Bianchi S, Palli D, Falchetti M, Saieva C, Masala G, Mancini B, Lupi R, Noviello C, Omerovic J, Paglierani M, Vezzosi V, Alimandi M, Mariani-Costantini R, Ottini L. ErbB-receptors expression and survival in breast carcinoma: a 15-year follow-up study. *J Cell Physiol* 2006; 206: 702-708

Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 2006; 206: 624–635

Carboni JM, Lee AV, Hadsell DL, Rowley BR, Lee FY, Bol DK, Camuso AE, Gottardis M, Greer AF, Ho CP, Hurlburt W, Li A, Saulnier M, Velaparthi U, Wang C, Wen ML, Westhouse RA, Wittman M, Zimmermann K, Rupnow BA, Wong TW. Tumor development by transgenic expression of a constitutively active insulin-like growth factor I receptor. *Cancer Res* 2005; 65: 3781-3781

Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, Hennekens CH, Pollak M. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 1998; 279: 563-566

Chen H, Fernig DG, Rudland PS, Sparks A, Wilkinson MC, Barraclough R. Binding to intracellular targets of the metastasis-inducing protein, S100A4 (p9Ka). *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 1212-1217

de Vicente-Rodriguez JC, Fresno-Forcelledo MF, Gonzalez-Garcia M, Aguilar-Andrea C. Sebaceous adenoma of the parotid gland. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: 446-448

Domisch H, Acil Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human  $\beta$ -defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 186-190

Domisch H, Steglich M, Eberhard J, Winter J, Jepsen S. Phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor LY 294002 blocks Streptococcus mutans-induced interleukin (IL)-6 and IL-8 gene expression in odontoblast-like cells. *Int Endod J*. 2008; 41: 763-771

Donald CD, Sun CQ, Lim SD, Macoska J, Cohen C, Amin MB, Young AN, Ganz TA, Marshall FF, Petros JA. Cancer-specific loss of  $\beta$ -defensin 1 in renal and prostatic carcinomas. *Lab Invest* 2003; 83: 501-505

Dossus L, Kaaks, Best R. Nutrition, metabolic factors and cancer risk. *Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22: 551-571

Dunsche A, Acil Y, Domisch H, Siebert R, Schroder JM, Jepsen S. The novel human  $\beta$ -defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 121-124

Froy O. Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways. *Cell Microbiol* 2005; 7: 1387-1397

Furstenberger G, Krieg P, Muller-Decker K, Habenicht AJ. What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? *Int J Cancer* 2006; 119: 2247-2254

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20

Götz W, Lehmann TS, Appel TR, Rath-Deschner B, Dettmeyer R, Luder HU, Reich RH, Jäger A. Distribution of insulin-like growth factors in condylar hyperplasia. *Ann Anat* 2007; 189: 347-349

Götz W, Kunert D, Zhang D, Kawarizadeh A, Lossdörfer S, Jäger A. Insulin-like growth factor system components in the periodontium during tooth root resorption and early repair processes in the rat. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 318-327

Götz W, Heinen M, Lossdörfer S, Jäger A. Immunohistochemical localization of components of the insulin-like growth factor system in human permanent teeth. *Arch Oral Biol* 2006; 51: 387-395

Götz W, Lossdörfer S, Krüger U, Braumann B, Jäger A. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-II and its binding protein-6 in human epithelial cells of Malassez. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 26-33

Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 1998; 351: 1393-1396

Reinert S, Machtens E. Speicheldrüsenerkrankungen. In: Horch HH, HRSG. Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie: Praxis der Zahnheilkunde. München – Jena: Urban & Fischer, 2006: 642-668

Humblet Y. Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5: 1621-1633

Katori H, Nozawa A, Tsukuda M. Expression of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor- $\alpha$  and Ki-67 in relationship to malignant transformation of pleomorphic adenoma. *Acta Otolaryngol* 2007; 127: 1207-1213

Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000; 21: 215-244

Lang S, Rotter N, Lorenzen A, Ihrler S, Eckel R, Holzel D, Rasp G, Wollenberg B, Sommer K. Salivary gland carcinomas. 1. Epidemiology, etiology, malignancy criteria, prognostic parameters and classification. *HNO* 2005; 53: 817-826

Laurie SA, Licitra L: Systemic therapy in the palliative management of advanced salivary gland cancers. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2673-2678

Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 105-128

Machtens E. Speicheldrüsenerkrankungen. *Mund Kiefer Gesichts Chir* 2000; 4: 401–413

Pantelis A, Wenghoefer M, Haas S, Merkelbach-Bruse S, Pantelis D, Jepsen S, Bootz F, Winter J. Down regulation and nuclear localization of human  $\beta$ -defensin-1 in pleomorphic adenomas of salivary glands. *Oral Oncol* 2009; 45: 526-530

Peng H, Shintani S, Kim Y, Wong DT. Loss of p12CDK2-AP1 expression in human oral squamous cell carcinoma with disrupted transforming growth factor-  $\beta$ -Smad signaling pathway. *Neoplasia* 2006; 8: 1028-1036

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 2002-2007

Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 915-928

Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* 2007; 28: 20-47

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311–322

Seifert G, Sobin LH. The World Health Organization's Histological Classification of Salivary Gland Tumors. *Cancer* 1992; 70: 379-385

Shintani S, Mihara M, Terakado N, Nakahara Y, Matsumura T, Kohno Y, Ohyama H, McBride J, Kent R, Todd R, Tsuji T, Wong DT. Reduction of p12DOC-1 expression is a negative prognostic indicator in patients with surgically resected oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2776-2782

Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T, Wong DT. Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Oral Oncol* 2002; 38: 235-243

Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golarz C, Parrish AB, Almekinder T, He J, Ho SM, Svoboda P, Pohl J, Marshall FF, Petros JA. Human  $\beta$ -Defensin-1, a Potential Chromosome 8p Tumor Suppressor: Control of Transcription and Induction of Apoptosis in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 8542-8549

Tsuji T, Ibaragi S, Shima K, Hu MG, Katsurano M, Sasaki A, Hu GF. Epithelial mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer Res.* 2008; 68: 10377-10386

Watson PH, Leygue ER, Murphy LC. Psoriasin (S100A7). *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 567-571

Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Götz W, Reich R, Bergé S, Martini M, Allam JP, Jepsen S, Merkelbach-Bruse S, Fischer HP, Novak N, Winter J. Nuclear hBD-1 accumulation in malignant salivary gland tumours. *BMC Cancer* 2008; 8: 290

Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Reich R, Martini M, Allam JP, Novak N, Bergé S, Jepsen S, Winter J. Decreased gene expression of human  $\beta$ -defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; 37: 660-663

Wilkins-Port CE, Higgins PJ. Regulation of extracellular matrix remodeling following transforming growth factor- $\beta$ 1/epidermal growth factor-stimulated epithelial-mesenchymal transition in human premalignant keratinocytes. *Cells Tissues Organs* 2007; 185: 116-122

Wittekind CH, Meyer HJ, Bootz F. UICC: TNM Klassifikation maligner Tumoren. 6. Auflage. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 2002

Wittekind CH, Klimpfinger, Sobin ML. UICC: TNM Atlas. Illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren. 5. Auflage. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 2005

Wittekind CH, Hutter RVP, Henson DE. UICC: TNM Supplement. A Commentary on Uniform Use. 3. Auflage. New York: Wiley & Sons, 2003

Zhang S, Du Y, Tao J, Wu Y, Chen N. Expression of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 and their significance in human oral mucosae, dysplasias and squamous cell carcinomas. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2008; 70: 242-248

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. W. Götz danke ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie die hervorragende Betreuung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Winter für die ausgezeichnete technische Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Ausarbeitung und Durchführung der Experimente. Ohne Ihn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Frau Dr. T. Nadjafi möchte ich ganz herzlich für die Hilfe bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen danken.

Namentlich Frau Dr. Annette Pantelis möchte ich dafür danken, dass sie mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Meinem Freund Dr. Dr. Matthias Wenghoefer sage ich besonderen Dank für seine tägliche sowohl fachliche als auch außerfachliche Hilfe, sein Interesse und sein Verständnis.