

Aus der Klinik und Poliklinik für
Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische
Operationen
der Universität Würzburg
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Dr. h.c. R. Hagen



Untersuchungen zum Einfluss von Wundsekret auf Zellvermehrung,
Chemoresistenzentwicklung, Zellzyklus und die Induktion einer Epithelial-
mesenchymalen Transition in Tumorzellen von Kopf und Hals

Inaugural-Dissertation

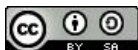
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Rafael Eiter

aus München

Würzburg, August 2022



Referent: Univ.-Prof. Dr. Norbert Kleinsasser, MHBA
Korreferent: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2023

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Wundheilung	2
1.2	Wundsekret.....	4
1.3	Epithelial-mesenchymale Transition.....	5
1.4	Zellzyklus	7
1.5	Tumore von Kopf und Hals.....	7
1.6	Fragestellung der Arbeit.....	9
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Ethikvotum	10
2.2	Versuchsaufbau	11
2.3	Verbrauchsmaterialien.....	11
2.4	Flüssigkeiten, Chemikalien, Nährmedien.....	13
2.5	Laborgeräte und Software	15
2.6	Patientinnen- und Patientenkollektiv und Gewinnung des Wundsekretes	16
2.7	Zellkulturlinien.....	17
2.8	Zellzahlmessung.....	18
2.9	Proliferationsassay zur Analyse des Zellwachstums.....	18
2.10	Dotblot zur Analyse der Zytokinzusammensetzung des Wundsekrets	19
2.11	Fluorescence-activated Cell Scanning zur Zellzyklusanalyse und zur Untersuchung der Apoptoserate	21
2.11.1	Durchflusszytometrie	21
2.11.2	Zellzyklusanalyse	22
2.11.3	Annexin-V-Apoptosemessung zu Bestimmung der Zellvitalität	23

2.12	Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von Markern einer epithelial-mesenchymalen Transition.....	25
2.12.1	Grundlagen	25
2.12.2	Real-Time PCR	26
2.12.3	Real-Time Reverse Transkriptase PCR.....	26
2.13	Spheroïd-Migrationsanalyse zur Untersuchung der Ausbreitung der Zellen.....	30
2.14	Beobachtung der Zellmorphologie	31
2.15	Datenauswertung	32
2.15.1	Graphische Darstellung der Ergebnisse.....	32
2.15.2	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Auswirkung des Wundsekrets auf die Proliferationsrate der Tumorzellen.....	35
3.2	Zusammensetzung der Zytokine im Wundsekret	37
3.3	Einfluss des Wundsekrets auf den Zellzyklus der Tumorzellen	38
3.4	Auswirkung des Wundsekrets auf die Sensibilität der Tumorzellen gegenüber Cisplatin	40
3.5	Expression von Markern einer epithelial-mesenchymalen Transition in Tumorzellen nach Behandlung mit Wundsekret	42
3.6	Auswirkung des Wundsekrets auf die Migrationsneigung der Tumorzellen.....	46
3.7	Beeinflussung der Zellmorphologie der Tumorzellen durch Wundsekret.....	47
3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	48
4	Diskussion.....	50
4.1	Zusammensetzung des Wundsekrets.....	50
4.2	Veränderte Proliferation der Tumorzellen in Abhängigkeit von der Wundsekret-Konzentration.....	51

4.2.1	Einfluss von IL-6 auf die Proliferation der Tumorzellen	52
4.2.2	Einfluss von IL-8 auf die Proliferation der Tumorzellen	53
4.2.3	Einfluss von CCL 5/RANTES auf die Proliferation der Tumorzellen.....	54
4.2.4	Einfluss von CCL 2/MCP 1 auf die Proliferation der Tumorzellen.....	55
4.2.5	Einfluss von Leptin auf die Proliferation der Tumorzellen.....	56
4.3	Induktion einer Chemoresistenz der Tumorzellen gegenüber Cisplatin durch Wundsekret.....	56
4.3.1	Cisplatin und seine Wirkweise	57
4.3.2	Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Cisplatin	57
4.4	Auswirkungen des Wundsekrets auf den Zellzyklus der Tumorzellen.....	59
4.5	Verstärkte Migration der Tumorzellen in die Umgebung nach Wundsekret-Behandlung	60
4.6	Induktion einer epithelial-mesenchymalen Transition in Tumorzellen durch Wundsekret.....	62
4.6.1	Einfluss von IL-6 auf die Induktion einer EMT in Tumorzellen	63
4.6.2	Einfluss von CCL 2/MCP 1 auf die Induktion einer EMT in Tumorzellen.....	64
4.6.3	Einfluss von IL-8 auf die Induktion einer EMT in Tumorzellen	65
4.6.4	Einfluss von CCL 5/RANTES auf die Induktion einer EMT in Tumorzellen.....	66
4.6.5	Einfluss von Leptin auf die Induktion einer EMT in Tumorzellen.....	66
4.6.6	Auslösung eines Phänotyp-Switchs in Tumorzellen durch WS	66
4.6.7	Schlussfolgerung EMT	67
4.7	Unterschiede der Zusammensetzung von Wundsekret _{Tag1} und Wundsekret _{Tag2}	70
4.8	Vergleich der Auswirkungen von Behandlung der Tumorzellen mit Wundsekret _{Tag1} und Wundsekret _{Tag2}	71
4.9	Interindividualität der Patientinnen und Patienten	71
4.10	Untersuchungen an Tumorzellen in vitro	73
4.11	Unterschiede zwischen den Zelllinien.....	73
4.12	Limitierungen der Aussagekraft der Ergebnisse	73
4.13	Ausblick auf potenzielle neue Therapieansätze	75

4.14	Ausblick auf zukünftige mögliche Fragestellungen	76
5	Zusammenfassung	77
6	Literaturverzeichnis	80

Appendix

I	Abkürzungsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Ergebnistabellen	
	IV.A Proliferationsassay	
	IV.B Zellzyklus	
	IV.C Chemoresistenz Apoptose	
	IV.D PCR	
	IV.E Spheroid	
V	Patientinnen und Patienten	
VI	Danksagung	
VII	Lebenslauf	
VIII	Publikation	

1 Einleitung

Karzinome von Kopf und Hals sind eine heterogene Gruppe maligner Tumore, die mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 51% bei Männern und 61% bei Frauen eine seit Jahren stagnierend schlechte Prognose aufweisen (Barnes 2016). Verantwortlich hierfür ist insbesondere eine frühe, lokoregionär lymphogene Metastasierung (Jerjes et al. 2010). Es ist deshalb von großem wissenschaftlichen Interesse, diese Tumoren genauer zu untersuchen, ein besseres Verständnis über die Tumorbiologie zu erlangen und daraus neue Therapieansätze abzuleiten.

Der wesentliche Therapieansatz neben der Radiochemotherapie ist die chirurgische Entfernung des Tumors (Johnson et al. 2020). Bei dieser bedeutet eine R0-Resektion eines Karzinoms eine Entfernung des Tumors im Ganzen, ohne dass mikroskopisches Tumorrestgewebe im Körper zurückbleibt (Henne-Bruns 2012). Leider ist es aus verschiedenen Gründen nicht immer möglich, das Tumorbett komplett frei von Tumorzellen zurückzulassen. Einerseits können sich im histologischen Präparat positive, also von Tumorzellen befallene Ränder zeigen. Dies bedeutet, dass nicht garantiert werden kann, dass der Tumor komplett entfernt worden ist. Karzinome können zudem Mikrometastasen in der direkten Umgebung des Tumors bilden, die makroskopisch im Rahmen der Operation vom Operateur nicht identifiziert werden können. Diese verbleiben somit in der Umgebung, auch wenn versucht wird, diesem Problem mittels eines Sicherheitsabstands um das sichtbare Tumorgewebe zu begegnen. Bei zwar makroskopisch nicht mehr sichtbarem, histologisch jedoch vorhandenem Resttumor liegt die Situation einer sog. R1-Resektion vor (Henne-Bruns 2012). Eine R1-Resektion geht mit einem höheren lokoregionären Rezidivrisiko und einer schlechteren Prognose einher (Kurita et al. 2010). Andererseits kann das Karzinom aufgrund seiner Infiltration der Umgebung oder Größe nicht resezierbar sein, sodass nur eine sogenannte Tumorenukleation durchgeführt werden kann. Es wird ein Großteil des Tumors entfernt, während ein makroskopisch sichtbarer Anteil im Körper belassen wird, um essenzielle anatomische Strukturen nicht durch die Operation zu verletzen bzw. entfernen zu müssen. Dies nennt man eine R2-Resektion (Henne-Bruns 2012). In beiden oben beschriebenen Fällen befinden sich also postoperativ Karzinomzellen im Körper.

Durch die Operationswunde wird die Wundheilung in Gang gesetzt. Diese stellt einen komplexen Prozess dar, der auf einem Zusammenspiel verschiedener Flüssigkeiten, Signalstoffe und Zellen basiert (Broughton et al. 2006). Hieraus bildet sich eine Flüssigkeit, das Wundsekret (WS). Dieses kann in der Wunde mit Tumorzellen in Kontakt kommen und diese beeinflussen.

Die Zusammensetzung der Zytokine dieses WS ist bereits untersucht worden. Yager et al. beschreiben in ihrem Review hohe Konzentrationen an Interleukin 6 und 8 (IL-6/IL-8), Epithelial Growth Factor (EGF), CC-Chemokinligand 2 (CCL 2), CC-Chemokinligand 5 (CCL 5) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)(Yager et al. 2007). Die jeweiligen Effekte der einzelnen Zytokine auf Tumorzellen sind bereits beforscht:

So ist beispielsweise gezeigt worden, dass durch IL-6 die Proliferationsrate von Tumorzellen gesteigert wird (Yadav et al. 2011). Dieselben Beobachtungen sind bei IL-8 gemacht worden (Liu et al. 2016). IL-6 ist außerdem als ein Zytokin identifiziert worden, das in Tumorzellen eine Chemoresistenz gegen gewisse Chemotherapeutika induzieren kann (Yadav et al. 2011). Zusätzlich wurde sowohl für IL-6 als auch IL-8 die Fähigkeit nachgewiesen, eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zu induzieren (Yu et al. 2009). Auch eine verstärkte Tendenz der Tumorzellen aggressiv und invasiv zu wachsen, ist nach Behandlung mit IL-6 beobachtet worden (Xie et al. 2004).

Es erscheint hier besonders interessant, Versuche mit postoperativ direkt aus der Wunde gewonnenem WS durchzuführen. Um die Veränderungen der Zusammensetzung des WS und dessen Auswirkung auf seine Effekte zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der zeitliche Faktor berücksichtigt und zwischen WS von Tag 1 und WS von Tag 2 unterschieden.

1.1 Wundheilung

Wundheilung ist ein Überbegriff für alle Prozesse, die in einer Wunde nach der Verletzung des Gewebes einsetzen, um den Defekt wieder zu reparieren und die Gewebsintegrität wiederherzustellen. Es ist ein komplexer, in mehrere Phasen eingeteilter Prozess. Diese sind die Hämostase, Entzündungs-, Proliferations- und Remodellierungsphase. Sie verlaufen teilweise überlappend (Broughton et al. 2006). Bei Entstehen einer Wunde tritt Blut aus, das bei Kontakt mit den Wundrändern gerinnt und den Gefäßdefekt provisorisch verschließt. Die hier verletzten Gefäße reagieren sofort mit

einer transienten Vasokonstriktion. Thrombozyten lagern sich an den verletzten Gefäßwänden ab und bilden ein Aggregat, das nach Aktivierung der Gerinnungskaskade um ein Fibrinnetzwerk erweitert wird und damit ein organisiertes Netzwerk bildet. Diese Struktur dient in den folgenden Schritten als Matrix. Nach ca. zehn Minuten kommt es zu einer Vasodilatation mit konsekutiver Hautrötung und -erwärmung. Sie wird durch aus dem verletzten Gewebe freigesetzte Prostaglandine, Histamin aus Mastzellen und weitere vasodilatatorisch wirksame Botenstoffe hervorgerufen. Durch eine vermehrte Permeabilität der Gefäße tritt Flüssigkeit aus dem Blut in die Umgebung aus und bildet ein Wundödem. Es folgt die Entzündungsphase, die durch eine chemotaktische Anlockung von Leukozyten initiiert wird (Wild et al. 2007). In der Folge kommt es zur Einwanderung von überwiegend neutrophilen Granulozyten und anschließend von Makrophagen. Diese sind verantwortlich für den Abbau des avitalen Gewebes, von Bakterien und potenziellem Fremdmaterial. Die Makrophagen spielen eine besondere Rolle, da sie neben der Wundreinigung auch eine Vielzahl an Zytokinen und Wachstumsfaktoren ausschütten. Hierzu gehören unter anderem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), IL-6, TNF- α , Transforming Growth Factor Beta (TGF- β), Chemokinligand 1 (CXCL 1/GRO) und Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Behm et al. 2012; Licitra et al. 2011; Ratliff 2008). Diese bewirken ein vermehrtes Einwandern und eine vermehrte Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen (Bodnar 2015). Unter hypoxischen Verhältnissen und bei saurem pH-Wert im Wundmilieu in der mittlerweile abgedichteten Wunde kommt es zu einer zusätzlichen Stimulation der Angiogenese und der Fibroblasten. Am 3. Tag nach der Verletzung setzt die ca. 2 Wochen dauernde Granulationsphase ein, im Rahmen derer es zu einer weiteren Einwanderung von Makrophagen, Fibroblasten und Myofibroblasten kommt. Diese Zellen wandern entlang der Extrazellulärmatrix (ECM) und strukturieren diese um, indem sie die ECM mittels Matrixmetalloproteasen (MMP) abbauen und ein anschließendes Auffüllen mit frischem Gewebe ermöglichen (Wild et al. 2007). Nach ca. 4 bis 5 Tagen beginnt diese Proliferationsphase, die mit dem Einsprossen von Gefäßen in den entstandenen Defekt (Laplanche et al. 2001) und der Vermehrung von Bindegewebe einhergeht, wobei v. a. Typ-3-Kollagen und Adhäsionsmatrixproteine wie Fibronectin eine wichtige Rolle spielen. Bereits in der Frühphase der Wundheilung setzt leicht versetzt der Prozess der Wundkontraktion ein, der eine Annäherung der ursprünglichen Wundränder bewirkt.

Umgesetzt wird dies durch ein komplexes Zusammenspiel von Myofibroblasten, ECM und Zytokinen. Myofibroblasten sind über kontraktile Aktinfilamente in der Lage, sich zusammenzuziehen und damit das Volumen der ECM zu verringern. In der letzten Phase der Wundheilung, der Remodellierungsphase, wird das entstandene Granulationsgewebe langfristig durch Narbengewebe ersetzt. Gleichzeitig wird das provisorische Typ-3-Kollagen durch MMP abgebaut und stabileres Typ-1-Kollagen durch Fibroblasten neu gebildet und vernetzt. Diese Phase kann je nach Wundgröße bis zu 2 Jahre dauern. Am Ende liegt eine blasse, gefäßarme Narbe mit großer Reißfestigkeit vor (Wild et al. 2007). Den proteinabbauenden Enzymen und Zellen kommt des Weiteren eine wichtige Rolle in der Verhinderung einer Wundinfektion zu, da sie potenziell vorhandene Bakterien abbauen (Spear 2012).

1.2 Wundsekret

Das Wundsekret (WS) ist eine Mischung aus Blut und von Entzündungszellen sezernierten Flüssigkeiten, die eine Vielzahl an den oben genannten Zytokinen und Immunzellen enthält (Abramovitch et al. 1999).

Gewonnen werden kann dieses Wundsekret über die Redon-Drainagen, die im Rahmen einer Operation in das OP-Gebiet subkutan eingelegt werden und unter Sog Teile des entstehenden Sekretes ableiten. Dies soll eine Ansammlung von überschüssigem Sekret verhindern und die Abheilung der Wunde unterstützen (Fay 1987). Wichtig ist hierbei eine Differenzierung von chronischem WS und akutem WS. Diese weisen eine unterschiedliche Zusammensetzung auf und haben *in vitro* entgegengesetzte Effekte. Während WS aus akuten Wunden eine Steigerung der Zellproliferation bewirkt (Katz et al. 1991; Yager et al. 2007), wurde beschrieben, dass chronisches WS die Zellproliferation von Fibroblasten und Endothelzellen senkt (Bucalo et al. 1993). Die Zusammensetzungen der WS wurden bereits ausführlich erforscht (Katz et al. 1991; Kondo et al. 1996; Ratliff 2008; Yager et al. 2007). Unterschiede zwischen chronischen und akuten Wunden zeigen sich v. a. in den Konzentrationen von IL-6, IL-8 und TNF- α . In chronischen, schlecht heilenden Wunden zeigten sich stark erhöhte Konzentrationen insbesondere von TNF- α , wie es Henry et al. in ihrem Review zusammengefasst haben (Henry et al. 2003; Trengove et al. 2000).

Die Dynamik der Zusammensetzung des WS war ebenfalls bereits Objekt vieler Untersuchungen. So wurde im Falle von IL-6, IL-8 und TNF- α ein rascher Abfall der Sekretion innerhalb der ersten Tage nachgewiesen. Auch CCL 2/MCP und CCL 5/regulated on Activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) wiesen eine ähnliche Dynamik mit einem etwas schwächeren Abfall auf (Ridiandries et al. 2018).

1.3 Epithelial-mesenchymale Transition

Die EMT ist als Übergang von Zellen vom epithelialen zum mesenchymalen Zellstatus definiert (Klymkowsky et al. 2009). Es gibt 3 Arten der EMT. Typ 1 ist ein essenzieller Vorgang in der Organogenese, da er durch den Wechsel von epitheliale zu einem mesenchymalen Status der Zellen deren Einwanderung im Rahmen der embryonalen Entwicklung ermöglicht. Hieran schließt sich dann im Zielgewebe entweder das Verbleiben der Zellen als Mesenchym in Organen oder der Schritt zurück zum epithelialen Status an, der analog zur EMT eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET) genannt wird, wie Larue et al. in ihrem Review ausführen (Larue et al. 2005). Außerdem gibt es den Typ 2, der bei der Gewebereparatur und in der Pathogenese von Organ-Fibrosen eine Rolle spielt. Bei der Gewebereparatur ist ein Einwachsen von Zellen und eine gesteigerte Angiogenese notwendig, um die Wunde zu schließen und ein Zusammenwachsen des Gewebes zu ermöglichen. Organische Fibrosen können im Zuge von chronischen Entzündungen entstehen, bei denen Zytokine wie TGF- β eine EMT von Epithelzellen und das Auswandern dieser als mesenchymale Zellen in das Organ bewirken, wo sie Bindegewebe produzieren können. Der Typ 3, der bei der Tumorprogression und Metastasierung eine Rolle spielt, ist Thema der vorliegenden Arbeit (Kalluri et al. 2009). Die EMT führt zu drei großen Veränderungen an den Tumorzellen. Erstens verändert sich die Zellmorphologie: der Zellverband wechselt von einem pflastersteinartigen, einzelligen Epithel mit apikal-basaler Polarität hin zu spindelförmigen Mesenchymzellen mit Pseudopodien oder Filopodien. Der Kontakt der Zellen untereinander nimmt ab und die Zellen werden mobiler und gewinnen an Invasivität. Zweitens kommt es zu Veränderungen am Zytoskelett, die sich durch einen Verlust von epithelialen Oberflächenmarkern, darunter E-Cadherin, Claudin 3, 4 und 7, α -Catenin und γ -Catenin, und einer vermehrten Expression von mesenchymalen Markern wie Vimentin, β -Catenin, N-Cadherin und Fibronectin äußern und so den Klassenwechsel

der Zellen anzeigen (Scanlon et al. 2013). Drittens gibt es funktionelle Veränderungen: Es findet vermehrt Angiogenese statt und die Proteaseaktivität ist erhöht, wodurch den Zellen eine stärkere Invasion durch die Extrazellulärmatrix ermöglicht wird. Außerdem verringert sich die Apoptoserate der Zellen, wie Kalluri et al. in ihrem Review erklären (Kalluri et al. 2009).

Epitheliale Tumorzellen können durch Zytokine zu einer EMT stimuliert werden (Scanlon et al. 2013). Dies bedeutet wie oben beschrieben einen Wechsel vom epithelialen zum mesenchymalen Status mit verringertem Zellkontakt, vermehrter Motilität und Invasivität.

Die involvierten Signalwege und Transkriptionsfaktoren lassen sich in drei Gruppen einteilen. Die Zinkfinger-Proteine Snail und Slug (Cano et al. 2000), die 2-handed Zinkfinger (homeodomain proteins), zu denen Zinc Finger Enhancer-Box (E-box)-binding Homeobox 1 (ZEB 1) und ZEB 2 gehören und die basischen Helix-Loop-Helix-Proteine Twist 1, Twist 2, E12/E47 und Transcription Factor 3 (Tcf 3). Mittlerweile wurden bereits mindestens 11 verschiedene Signalwege gefunden, die die EMT regulieren. Lamouille et al. beschreiben hierbei die starke Aktivierung des Akt-Gens als Schlüsselschritt, das β -Catenin und Snail aktiviert und somit für die Induktion der EMT sorgt (Lamouille et al. 2014).

Ausgelöst werden diese Signalwege durch entzündliche Mediatoren, also Zytokine, Chemokine und MMPs. Die stärksten Induktoren sind hierbei der transforming growth factor β (TGF β), IL-6, IL-8 und EGF (Fernando et al. 2011; Lo et al. 2007; Sullivan et al. 2009).

Die gefundenen Signalwege und Mediatoren könnten zukünftige Angriffspunkte für spezifische Therapien darstellen, wobei die EZH2 H3k27-Methyltransferase bereits in laufenden Studien untersucht wird. Ziel dieser Therapieansätze ist es, die EMT zu inhibieren, um die vermehrte Invasivität und Metastasierungsfähigkeit zu reduzieren. Ein Nachteil ist dabei allerdings die beidseitige Richtung der EMT. Es besteht laut Craene et al. und Du et al. die Gefahr, durch die Aktivierung bzw. Hemmung einzelner Auslöser oder Effektoren der EMT diese sogar anzustoßen und somit den entgegengesetzten Effekt zu bewirken (Craene et al. 2013; Du et al. 2016).

Ergänzend zu den oben genannten Vorgängen spielen auch epigenetische Veränderungen wie Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Phosphorylierung eine Rolle.

Beispielsweise wird E-Cadherin im Zuge der EMT durch die Histon-Deacetylasen HDAC 1 und 2 und Sirt 1 hypermethyliert und dadurch stillgelegt (Kalluri et al. 2009).

1.4 Zellzyklus

Der Zellzyklus besteht aus einer Abfolge von Phasen, die Zellen bei der Zellteilung durchlaufen. Nach Ablauf eines Zyklus erfolgt entweder eine erneute Zellteilung oder ein Übergang in einen Ruhezustand. Eingeteilt wird der Zellzyklus in die Interphase und die Mitose. Die Interphase ist weiter unterteilt in G1-Phase, S-Phase und G2-Phase. Die G1-Phase definiert die Zeit zwischen Mitose und S-Phase und dient der Synthese von Proteinen für die anstehende Replikation der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und der Größenzunahme der Zelle. Sie dauert ca. elf Stunden und ist damit die längste Phase des Zellzyklus. Nach Durchlaufen der G1-Phase hat die Zelle noch einen diploiden Chromosomensatz. Die anschließende S-Phase dient wiederum der DNA-Replikation und dauert ca. acht Stunden. Am Ende dieser Phase ist die Zelle tetraploid: jedes Chromosom besteht also aus zwei Schwesterchromatiden. Es folgt nun die G2-Phase, die den Übergang zur Mitose darstellt. Die Zelle bereitet sich auf die Mitose vor, indem sie Proteine synthetisiert, die für die eigentliche Zellteilung notwendig sind, wie die zum Spindelapparat gehörigen Proteine. Diese Phase dauert etwa vier Stunden. Anschließend kommt es zur eigentlichen Zellteilung, der M-Phase bzw. Mitose. Die verdoppelten Chromatiden werden im Rahmen der Segregation auf die beiden Tochterzellen verteilt. Darauf folgt die Zytokinese, bei der die beiden Zellen voneinander getrennt werden. Von allen Phasen ist diese die kürzeste mit einer Dauer von ca. einer Stunde. Insgesamt ergibt sich also eine Gesamtdauer des Zellzyklus von 24 Stunden. Der Prozess des Zellzyklus wird durch Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen, die durch die Zykline phosphoryliert werden, reguliert (Cooper 2000).

1.5 Tumore von Kopf und Hals

Tumoren von Kopf und Hals werden nach ihrer Lokalisation und Häufigkeit eingeteilt u. a. in Larynx-, Pharynx-, Mundhöhlen- und Mundbodenkarzinome eingeteilt. Seltener kommen andere Lokalisationen vor. Differenziert nach Entitäten ist das Plattenepithelkarzinom mit 90 % der häufigste histologische Typ. In seltenen Fällen

treten Adenokarzinome und andere Tumorarten wie Sarkome auf (Guntinas-Lichius et al. 2021).

Die jährliche Inzidenz in Deutschland beträgt bei den Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals 23,2 Fälle/100.000 Einwohnern bei Männern und 7,2 Fälle /100.000 Einwohnern bei Frauen. Sie liegen bei Männern mit einem Anteil von 3,7 % auf dem neunten Rang der häufigsten Tumorlokalisationen. Bei den Frauen haben sie einen Anteil von 1,6 % und liegen damit auf dem 15. Rang (Robert Koch-Institut 2017; Wienecke et al. 2019).

Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Männern 51 % und bei Frauen 61 %. Die 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei Männern bei 39 % und bei Frauen bei 50 %. Sowohl die Inzidenz als auch die Sterberaten für diese Tumoren haben sich in den letzten Jahren kaum verändert, womit die Diagnose eines Karzinoms von Kopf und Hals mit einer schlechten Prognose verbunden ist (Barnes 2016).

Gemeinsame Risikofaktoren der Karzinome von Kopf und sind der Nikotinabusus und der regelmäßige Genuss von hochprozentigem Alkohol. Des Weiteren ist das Auftreten eines Nasopharynx-Karzinoms mit einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus und das Auftreten eines Oropharynxkarzinom mit einer Infektion mit Humanen Papillomaviren assoziiert (Lechner et al. 2022). Das Larynxkarzinom kann unter anderem durch Asbestfasern verursacht werden und damit als Berufskrankheit anerkannt werden. Ein begünstigender Faktor bei der Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen stellt schlechte Mundhygiene dar (Guntinas-Lichius et al. 2021; Preiß et al. 2010). Die kurativen Grundpfeiler der Therapie von Karzinomen von Kopf und Hals sind die operative Entfernung des Tumors, ggf. mit adjuvanter Radiochemotherapie oder die primäre Radiochemotherapie. In einer palliativen Situation wird eine Chemotherapie angewendet. Im Rahmen des operativen Ansatzes erfolgt möglichst die Entfernung im Gesunden und eine Halslymphknotenausräumung mit Entfernung der zervikalen Lymphknoten. Die Therapie kann bei Therapieresistenz seit einigen Jahren durch eine Immuntherapie ergänzt werden. Hierfür stehen aktuell der Anti-EGFR-Antikörper Cetuximab und Anti-PD-1-Antikörper wie Nivolumab zur Verfügung (Guntinas-Lichius et al. 2021; Vasiliadou et al. 2021). Es befinden sich aktuell einige neue Immuntherapien in fortgeschrittenen Stadien, sodass hier von einem stark vergrößerten Angebot in den nächsten Jahren gerechnet werden kann, wie Trivedi et al. zusammenfassen (Trivedi et

al. 2021). Chemotherapeutisch werden Platin-Derivate wie Cisplatin oder Carboplatin sowohl im palliativen Setting als auch als Radiosensitizer eingesetzt. Sie erhöhen die Wirksamkeit einer folgenden Strahlentherapie. Alternativ kommen das Pyrimidinanalogon 5-Fluoruracil und die Taxane Paclitaxel und Docetaxel zum Einsatz (Reiß 2009).

1.6 Fragestellung der Arbeit

Die Effekte einzelner Bestandteile des WS auf Plattenepithelkarzinomzelllinien von Kopf und Hals konnten eindeutig gezeigt werden (Lindgren et al. 2016; Yadav et al. 2011). Es kam zu einer vermehrten Zellteilung, gesteigerter Invasivität der Zellen und zur Induktion einer Chemoresistenz gegen bestimmte Chemotherapeutika. Ferner wurde bereits nachgewiesen, dass bei Patientinnen und Patienten nach einer Halslymphknoten-ausräumung gewonnenes WS die soeben geschilderten Effekte auf Karzinomzelllinien von Kopf und Hals *in vitro* hat (Scherzad et al. 2019; Scherzed et al. 2011). In diesen Arbeiten wurde nach Ziehen der Redon-Drainage das gesamte WS entnommen und dessen Effekt auf die Zellen untersucht. Es lag also eine Flüssigkeit vor, die sich über ca. 48 Stunden gebildet hatte. Die Wundheilung ist allerdings ein sehr dynamischer Prozess (Broughton et al. 2006). In dessen Verlauf kommt es zu einem Wandel der Zytokin- und Zellzusammensetzung bzw. einem Abfall der Zytokinkonzentrationen. Daher stellt sich die Frage, inwiefern diese potenziell unterschiedlichen Level an Signalstoffen auch unterschiedlich starke Effekte in den Tumorzellen hervorrufen.

Um diese Frage zu beantworten, wurden für diese Arbeit die Redon-Drainagen 24 Stunden nach der Operation gewechselt. So konnte der innerhalb der ersten 24 Stunden gebildete Teil des Sekretes gewonnen werden (im Folgenden WS_{Tag1} genannt). Der zweite Teil wurde nach weiteren 24 Stunden gewonnen und spiegelt die Zusammensetzung des WS von Stunde 25 bis 48 postoperativ wider (im Folgenden WS_{Tag2} genannt). Für die Untersuchungen wurden dann 2 Tumorzelllinien von Kopf und Hals *in vitro* mit WS von 10 Patientinnen und Patienten inkubiert, um zu untersuchen, welche Effekte die Sekrete jeweils auf die Tumorzellen haben:

Wie beeinflussen WS_{Tag1} und WS_{Tag2} das Wachstum der Tumorzellen? Welchen Einfluss haben WS_{Tag1} und WS_{Tag2} auf die Phasenverteilung des Zellzyklus und eine mögliche Induktion einer Chemoresistenz gegen Cisplatin? Lösen WS_{Tag1} und WS_{Tag2} eine EMT in

den Tumorzellen aus? Wie entwickelt sich die Zellmorphologie der Tumorzellen nach Behandlung mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} . Wie unterscheiden sich die Ergebnisse der Behandlung mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} ?

2 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde das WS von 10 Patientinnen und Patienten am 1. und 2. postoperativen Tag gewonnen und dessen Zytokin-Zusammensetzung im Dotblot-Assay untersucht. Tumorzelllinien von Kopf und Hals wurden mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} behandelt und die Effekte des WS auf die Zellen untersucht.

Analysiert wurde der Einfluss des WS auf die Zellproliferation in unterschiedlichen WS-Konzentrationen, um die ideale WS-Konzentration für die weiteren Versuche zu bestimmen. Mit dieser Konzentration wurde der Effekt des WS auf die Phasenverteilung des Zellzyklus und die Apoptoserate von Tumorzellen unter Behandlung mit Cisplatin im Annexin-Apoptose-Assay mittels Durchflusszytometrie im Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) überprüft. In der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die Expression von Markern einer EMT analysiert. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen auf Veränderungen der Zellmorphologie untersucht. Zum Abschluss erfolgte ein Vergleich der Auswirkungen von WS_{Tag1} mit denen von WS_{Tag2} . Eine graphische Darstellung der Versuchsabläufe zeigt Abbildung 2.1.

2.1 Ethikvotum

Vor Verwendung des Wundsekretes erfolgte eine ärztliche Aufklärung der Patientinnen und Patienten über die Versuche und die wissenschaftliche Verwendung des WS mit schriftlicher Zustimmung zur Studienteilnahme. Die Untersuchungen wurden gemäß der Genehmigung durch die Ethikkommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Aktenzeichen 116/17, durchgeführt.

2.2 Versuchsaufbau

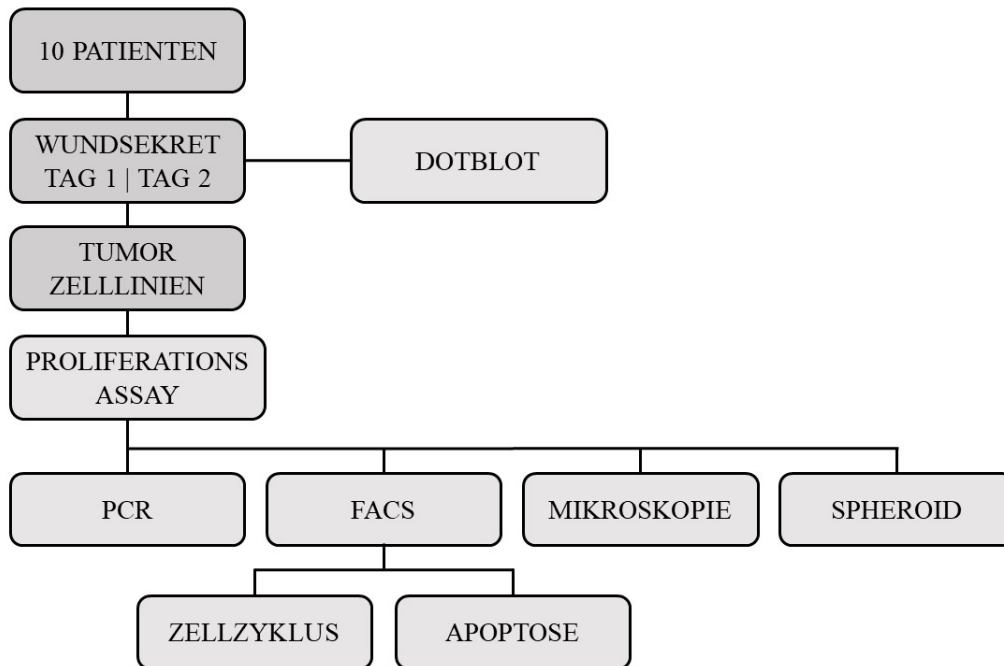


Abbildung 2.1: Darstellung des Versuchsaufbaus

Nach Gewinnung des WS von 10 Patienten erfolgte die exemplarische Analyse der Zytokin-Zusammensetzung von WS_{Tag1} und WS_{Tag2} eines Patienten mittels Dot blot-Assay. Anschließend wurden Tumorzelllinien mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} behandelt und die verschiedenen Effekte auf die Zellen untersucht. Es folgten ein Proliferationsassay zur WS-Konzentrationsbestimmung und mit dieser eine Zellzyklus-Analyse und nach Cisplatin-Behandlung ein Annexin-Apoptose-Assay per FACS, eine PCR-Untersuchung auf Marker einer EMT, Untersuchung der Zellmorphologie unter dem Mikroskop und eine Beobachtung der Zellen im Spheroid-Modell.

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1: Verwendete Verbrauchsmaterialien

(1, 5, 10, 25 ml) Einmalpipetten	Corning Incorporated-Life Sciences, New York City, NY. USA
1,5 ml Collection Tubes	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
15 ml und 50 ml Cellstar Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
175 cm ² Cellstar Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

2 ml Eppendorfggefäß	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
4-Well Inkubationswells	RayBiotech Life, Norcross, GA. USA
5 ml Eppendorfggefäß	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
50 ml Leucosep Separationsröhrchen mit Trennscheibe	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well PCR-Platten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
CASY-Cups (Zellcountergefäße)	Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland
Cellstar Zellkulturplatte mit 12 Vertiefungen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Costar Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen mit abgerundetem Boden	Corning Incorporated-Life Sciences, New York City, NY. USA
Deckgläser (24 mm x 32 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Filtropur S Steril-Filter 45 µm Filtropur S	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Flow Cytometry Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Human Cytokine Antibody Array C3 Membranen	RayBiotech Life, Norcross, GA. USA
Human Cytokine Array C3	RayBiotech Life, Norcross, GA. USA
Objektträger (ca. 76 mm x 26 mm; cut edges, frosted end)	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Photometerküvetten UVette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, 0,5-10 µl	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen, 200 µl und 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,5 ml und 2 ml	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht,

	Deutschland
RNase-free DNase Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Spin Columns	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.4 Flüssigkeiten, Chemikalien, Nährmedien

Tabelle 2.2: Verwendete Flüssigkeiten, Chemikalien und Nährmedien

0,25 % Trypsin EDTA 1X	Gibco®, life technologies™ GmbH, Darmstadt, Deutschland
10X Annexin V Binding Buffer	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
1X Blocking Buffer	RayBiotech Life, Norcross, GA, USA
20X Wash Buffer I	RayBiotech Life, Norcross, GA, USA
20X Wash Buffer II	RayBiotech Life, Norcross, GA, USA
2X Cell Lysis Buffer	RayBiotech Life, Norcross, GA, USA
70% Ethanol	J.T. Baker, Griesheim, Deutschland
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
APC Annexin V	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Biotinylated Antibody Cocktail	RayBiotech Life, Norcross, GA, USA
Buffer RDD	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Buffer RLT	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Buffer RPE	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Buffer RW1	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
CASY-Ton	Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland
CDH1 Taq Man Gene Expression Assay Hs01023894_m1	Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA
CDH2 Taq Man Gene Expression Assay Hs00983056_m1	Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA
Destilliertes Wasser	Eigenproduktion
Detection Buffer C	RayBiotech Life, Norcross, GA, USA

MATERIAL UND METHODEN

Detection Buffer D	RayBiotech Life, Norcross, GA, USA
DNase I, RNase-Free	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Extracellular Matrix Gel MaxGel™ ECM	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetales Kalbsserum (FCS)	Linaris Biologische Produkte, Wertheim, Deutschland
GAPDH Taq Man Gene Expression Assay Hs02758991_g1	Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA
Horseradish Peroxidase (HRP)- konjugiertes Streptavidin	RayBiotech Life, Norcross, GA, USA
PBS 10X (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
PI/RNase Staining Buffer	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Propidium Iodid Staining Solution	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Quantiscript RT Buffer, 5x	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNase-Free Water	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)-Medium 1640	Biochrom, Berlin, Deutschland
RT Primer Mix	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Separationsmedium	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
SNAI 1 Taq Man Gene Expression Assay Hs00195591_m1	Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA
TaqMan Gene Expression Assay Applied	Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA
TaqMan Gene Expression Mastermix	Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA
TWIST Taq Man Gene Expression Assay Hs01675818_s1	Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA

VIMentin Taq Man Gene Expression Assay Hs00958111_m1	Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA
--	---

2.5 Laborgeräte und Software

Tabelle 2.3: Verwendete Laborgeräte und Software

Accu-jet® pro, Akku-Pipettierhilfe	Accu-jet® Brand GmbH, Wertheim
BD FACS Canto™II Flow Cytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
CASY TT Zellzähler	Roche Innovatis Ag, Bielefeld, Deutschland
CO ₂ -Inkubator CB 210	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Excel 16 Tabellenkalkulationssoftware	Microsoft, Redmond, WA, USA
FACS DIVA-Programm	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Forschungsmikroskop, DMI 4000 B	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Graphpad Prism Statistiksoftware	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
HERAsafe Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Bildbearbeitungssoftware ImageJ	Open Source
Lab Dancer Vario Vortexgerät	IKA GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Laborwasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Leica Application Suite, LAS V4.8	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Lichtmikroskop DMIL LED	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Schüttelinkubator	Rose Scientific Ltd., Edmonton, AB, Kanada
Spektralphotometer BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

StepOne and StepOnePlus Software v2.3	Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA
Step-One™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA
Vakuumpumpe	AEG Electrolux, Stockholm, Schweden

2.6 Patientinnen- und Patientenkollektiv und Gewinnung des Wundsekretes

Das Wundsekret wurde von 10 Patientinnen und Patienten gewonnen, die sich einer Halslymphknotenausräumung im Rahmen der operativen Therapie von Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals unterzogen hatten. Die Patientinnen und Patienten waren zwischen 51 und 88 Jahre alt, wobei das Durchschnittsalter bei 67,3 Jahren lag. Die Patientinnen- und Patientengruppe bestand aus zwei Frau und acht Männern. Die Patientinnen und Patienten wurden im Vorfeld über die Studie aufgeklärt und die schriftliche Einverständnis lag vor. Eine Auflistung mit Alter und Geschlecht der Patientinnen und Patienten befindet sich in der Appendix.

Die während der Operation eingelegten Redon-Drainagen fördern im Anschluss an die Operation das entstandene Wundsekret und verbleibende Blutreste. Die Redon-Flaschen wurden 24 Stunden nach der Operation gewechselt, ohne belüftet zu werden. Dasselbe wurde nach weiteren 24 Stunden durchgeführt. Laborarbeiten erfolgten an der HERAsafe Sicherheitswerkbank (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Das gewonnene Sekret wurde in 50 ml Cellstar Tubes (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt und bei 500 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit der Eppendorf Zentrifuge 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. So wurden die verschiedenen Phasen des Wundsekrets getrennt. Um übrig gebliebene Zellen zu entfernen, wurde das WS ein weiteres Mal wie oben beschrieben zentrifugiert. Hierfür wurden 50 ml-Separationsröhrchen mit Trennscheibe (Greiner Bio-One GmbH) und Separationsmedium verwendet, in denen das WS für 30 Sekunden bei 1000-facher Fallbeschleunigung (g) mit der Eppendorf Zentrifuge 5810 R zentrifugiert wurde. Danach wurde das überstehende klare Plasma mittels Filtropul Steril-Filtern mit 45 Mikrometer (µm) Porengröße (Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht, Deutschland) gefiltert. Das Ziel war, ein Serum des Wundsekretes zu

erzeugen, in dem potenziell vorhandene Botenstoffe verblieben sind. Anschließend wurde das WS bei -20 Grad Celsius in 50 ml Cellstar Tubes im Gefrierschrank eingefroren, die später für die durchzuführenden Versuche nach langsamem Auftauen bis auf Raumtemperatur im Laborwasserbad (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) wiederverwendet wurden.

2.7 Zellkulturlinien

Für die Versuche wurden 2 Tumorzelllinien von Kopf und Hals, FaDu und HLaC78, verwendet. FaDu-Zellen sind seit 1972 etablierte Plattenepithelkarzinom-Tumorzellen aus dem Hypopharynx, die aus einer Probeentnahme bei einem neudiagnostiziertem Hypopharynxkarzinom-Patienten gewonnen wurden (Rangan 1972). Die Tumorzellen der HLaC78-Zelllinie wurden 1979 etabliert und stellen Plattenepithelkarzinomzellen des Larynx dar. Hierfür wurden isolierte Tumorzellen in eine immundefiziente Maus transplantiert, woraufhin sich ein histologisch dem Ausgangskarzinom entsprechender Tumor bildete (Zenner et al. 1979).

Die Tumorzelllinien wurden in 175 cm² Cellstar Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH) mit jeweils 10 ml Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)-Medium 1640 (Biochrom, Berlin, Deutschland) kultiviert. Es wurden hierfür 5×10^5 Zellen in den Kulturflaschen mit 5 ml Einmalpipetten (Corning Incorporated-Life Sciences) ausgesät und die Flaschen bei 37 Grad Celsius und einer Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Konzentration von 5 % für ca. 3 Tage im CO₂-Inkubator CB 210 (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) bebrütet. Bei einer Zelldichte von ca. 80 % wurden die Zellen abgelöst und passagiert. Zum Passagieren der Zellen wurde das alte RPMI-Medium 1640 abpipettiert und die Flasche mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) 10 X (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) gewaschen. Daraufhin wurden 2 ml 0,25 % Trypsin EDTA 1X (Gibco®, life technologies™ GmbH, Darmstadt, Deutschland) auf die Zellen pipettiert und die Zellkulturflasche für ca. 3 Minuten bei 37 Grad Celsius im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend wurde unter dem Lichtmikroskop DMIL LED (Leica, Heerbrugg, Schweiz) kontrolliert, ob sich die Zellen abgelöst haben. Die Enzymwirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 8 ml RPMI-Medium 1640 mit 10 % fetalem Kalbsserum (FCS) (Linaris Biologische Produkte, Wertheim, Deutschland) abgestoppt. Nach Resuspendieren der Zellsuspension erfolgte die Überführung in 15 ml Cellstar Tubes. Es

wurden nach Zellzählung zwei neue Zellkulturflaschen mit je 5×10^5 Zellen ausgesät. Die restlichen Zellen wurden für die jeweils durchgeführten Versuche abgezweigt.

2.8 Zellzahlmessung

Die Zellzahlen der abgelösten Zellen wurden mit dem CASY TT Zellzähler (Roche Innovatis Ag, Bielefeld, Deutschland), einem Zellzählgerät, ermittelt. Das Casy misst im Durchflussprinzip (OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG. 2018). In ein 15 ml Cellstar Tube mit 10 ml CASYton (Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland), einem isotonischen Puffer, werden 50 μ l Zellsuspension hinzugefügt. Nun wird mittels einer Pumpe die möglichst gleichmäßig suspendierte Lösung durch die Messpore in eine Messkapillare gezogen. Wenn ein Partikel die Messpore passiert, kommt es zu einem elektrischen Puls, der als Count gemessen wird. Es werden 1 Million Messungen pro Sekunde durchgeführt, sodass eine genaue Aussage über die Zellzahl getroffen werden kann. Es wird auch die vermehrte Durchlässigkeit von Membranen detektiert, wie sie bei toten Zellen vorliegt. So kann die Vitalität der Zellen in derselben Messung bestimmt werden. Bei einer Vitalität von über 90 % wurden die Zellen weiterverwendet (Cano et al. 2000).

2.9 Proliferationsassay zur Analyse des Zellwachstums

Der Proliferationsassay wurde exemplarisch mit WS_{Tag1} von einem der Patienten durchgeführt. HLaC78- und FaDu-Zellen wurden in Cellstar Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen (Greiner Bio-One GmbH) zu jeweils 3×10^4 Zellen ausgesät. Sie wurden über 24 Stunden mit 3 ml RPMI-Medium 1640 mit 10 % FCS behandelt. Dann wurde bei allen Wells das Medium gewechselt, wobei eine Kontrolle wieder mit reinem RPMI-Medium 1640 behandelt wurde. Die anderen Wells wurden mit Mischungen aus RPMI-Medium 1640 und filtriertem WS in den Konzentrationen 1 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % und 100 % versetzt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation im CO₂-Inkubator CB 210 wurden die Zellen abgelöst, indem sie nach Absaugen des Mediums und Waschen mit 2 ml PBS 10X mit 1 ml 0,25 % Trypsin EDTA 1X für 3 Minuten im CO₂-Inkubator CB 210 behandelt wurden. Nach dem Versetzen mit 2 ml RPMI-Medium 1640 mit 10 % FCS und Resuspendieren mit der Pipette wurde das Zell-

Medium-Gemisch in 5 ml-Eppendorf-Gefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) übertragen. Nun erfolgte die Messung der Zellzahl und -vitalität am Casy Cell Counter. Durch diesen Versuch wurde die Konzentration an WS im Medium ermittelt, die die stärkste Proliferationssteigerung der Zellen bewirkt und mit der danach die übrigen Untersuchungen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse werden in 3.1 dargestellt. Eine tabellarische Darstellung der Einzelwerte befindet sich in der Appendix.

2.10 Dotblot zur Analyse der Zytokinzusammensetzung des Wundsekrets

Der in dieser Arbeit verwendete Dotblot ist ein Sandwich-Assay, der eine besonders sensitive Form des semiquantitativen Immunoassays darstellt. Das Grundprinzip ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Ein Antikörper bindet spezifisch an das zugehörige Antigen. Diese Bindung kann über verschiedene Mechanismen detektierbar gemacht werden, wie z. B. über die Kopplung an Radionuklide, Enzyme oder Fluoreszenzfarbstoffe. Es werden 2 Antikörper benötigt, wovon einer fest an eine stabile Membran oder ein ähnliches Material gebunden ist und der andere einen Detektionsantikörper darstellt. Die zu untersuchende Lösung wird auf die Membran mit den befestigten Antikörpern aufgetragen, sodass die gesuchten Antigene an diese Antikörper binden können. Daraufhin wird die überschüssige Flüssigkeit abgespült und eine Lösung mit löslichen Antikörpern auf die Membran gegeben. Diese Antikörper sind möglichst monoklonal und wie oben beschrieben mit einem Marker wie einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Enzym versehen. Je mehr Antigen in der zu untersuchenden Probe enthalten ist, desto stärker ist auch das Detektionssignal. Dieses sensible Verfahren lässt auch eine Semiquantifizierung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu. (Luttmann et al. 2014)

In der vorliegenden Arbeit wurde der Dotblot benutzt, um Zytokine aus dem Wundsekret nachzuweisen und zu quantifizieren. Dieses bedient sich einer Nitrozellulose-Membran, an der die Antikörper befestigt sind und biotinylierten Detektionsantikörpern, die eine Chemilumineszenz-Reaktion hervorrufen und so über einen Röntgenfilm visualisiert werden. Das verwendete System ist der Human Cytokine Antibody Array C3-Immunoassay (RayBiotech Life, Norcross, GA, USA), mithilfe dessen Flüssigkeiten auf 42 humane Proteine untersucht werden können.

Tabelle 2.4: Tabelle der Zytokine des Dotblot-Assays

Tabellarische Darstellung der Dots des Human Cytokine Antibody Array C3-Immunoassays.

Es erfolgt die Darstellung im Sinne von Duplets aus jeweils 2 Dots, die einem Protein zugeordnet sind.

Zudem bestehen Positivkontrollen POS und Negativkontrollen NEG.

	A	B	C	D	E	F	G
1	POS	POS	NEG	NEG	ENA-78 (CXCL5)	GCSF	GM-CSF
2							
3	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8 (CXCL8)
4							
5	MCP-1 (CCL2)	MCP-2 (CCL8)	MCP-3 (CCL7)	M-CSF	MDC (CCL22)	MIG (CXCL9)	MIP-1 delta
6							
7	TNF alpha	TNF beta	EGF	IGF-1	Angiogenin	OSM	TPO
8							

	H	I	J	K	L
1	GRO a/b/g	GRO alpha (CXCL1)	I-309 (TCA 3/CCL1)	IL-1 alpha (IL-1 F1)	IL-1 beta (IL-1 F2)
2					
3	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN- gamma
4					
5	RANTES (CCL5)	SCF	SDF-1	TARC (CCL17)	TGF beta 1
6					
7	VEGF-A	PDGF-BB	Leptin	NEG	POS
8					

Durchgeführt wurde der Dotblot aus ökonomischen Gründen exemplarisch an WS_{Tag1} und WS_{Tag2} von einem der 10 Patientinnen und Patienten.

Zur Bestimmung der Zytokinlevel im Wundsekret wurden die Human Cytokine Antibody Array C3 Membranen (RayBiotech Life) in die im Set enthaltenen 4-Well Inkubationswells (RayBiotech Life) gegeben und 2 ml 1X Blocking Buffer (RayBiotech Life) in jedes Well pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Puffer wieder abpipettiert. Damit war der Blockierungsprozess abgeschlossen. Jetzt wurde je 1 ml WS_{Tag1} und WS_{Tag2} , in die Wells gegeben und über Nacht bei 4° C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde das Wundsekret wieder abpipettiert. Dann schloss sich der erste Waschschrift an. Es wurden 2 ml 20X Wash Buffer I (RayBiotech Life) 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt und in jedes Well pipettiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder abpipettiert. Dieser Schritt wurde weitere 2 Mal wiederholt. Danach wurden 2 ml 20X Wash Buffer II (RayBiotech Life) 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt und in die 4-Well

Inkubationswells pipettiert, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abpipettiert. Auch dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 Mal durchgeführt. Als nächstes wurden die Membranen mit dem Biotinylated Antibody Cocktail (RayBiotech Life) inkubiert. Hierfür wurde 1 ml dieses Cocktails in jedes Well gegeben und wieder über Nacht bei 4° C inkubiert. Dann wurde die Lösung wieder abpipettiert. Nun schloss sich der zweite Waschschrift an, in dem wie bereits oben erwähnt verfahren wurde. Es erfolgten also jeweils 3 Waschdurchgänge mit Wash Buffer I und Wash Buffer II. Die Membranen wurden nun mit der beschichteten Seite nach oben auf Zellstofftücher gelegt und die Ränder mit Tüchern abgetupft, um letzte Reste der Waschpuffer zu entfernen. Dann wurden die Membranen auf eine PVC-Platte aufgelegt. Für die folgende Visualisierung der gebundenen Antikörper musste zunächst aus je 250 µl Detection Buffer C (RayBiotech Life) und 250 µl Detection Buffer D (RayBiotech Life) eine Mischung erstellt werden, welcher jeweils in ein 5ml Eppendorf-Gefäß pipettiert wurde. Diese 500 µl wurden auf die einzelnen die Human Cytokine Antibody Array C3 Membranen aufgetragen und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine weitere PVC-Platte wurde von oben auf diese Membranen gelegt. Durch gleichmäßigen Druck von oben nach unten wurden eventuell gebildete Luftblasen entfernt, ohne die Antikörper zu verschieben. Die Membranen wurden anschließend im Fotolabor entwickelt (RayBiotech, Norcross, GA 2015). Die Auswertung erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ (Open Source). Hierzu wurde die Dichte der Dots gemessen und die jeweiligen Proteine in Relation zur Positivkontrolle POS gesetzt und somit vergleichbar gemacht.

2.11 Fluorescence-activated Cell Scanning zur Zellzyklusanalyse und zur Untersuchung der Apoptoserate

2.11.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik, bei der in einer Pufferlösung suspendierte Zellen bezüglich Zellgröße, Zellgranulierung und der Fluoreszenz analysiert werden können. Hierfür werden sie durch einen Laserstrahl geleitet. Beim Auftreffen des Lichts auf die Zellen kommt es zur Ablenkung der Strahlen, die über feine Detektoren, sog. Photomultiplier, detektiert werden. Es wird hierbei unterschieden zwischen Vorwärts-

und Seitwärtsstreuung. Vorwärtsstreuung bedeutet, dass das Licht relativ gerade durch die Zelle durchtreten kann, dabei jedoch leicht abgelenkt wird. Durch den Grad der Ablenkung kann auf die Zellgröße oder Zelloberfläche geschlossen werden. Die Vorwärtsstreuung wird durch Sensoren detektiert, die im Strahlengang liegen. Die Seitwärtsstreuung entsteht, wenn das Licht auf intrazelluläre Partikel trifft, die groß genug sind, um dieses abzulenken. Somit ist die Seitwärtsstreuung ein Maß für die innere Komplexität der Zelle, die vorwiegend durch die Größe des Zellkernes und der Granula bestimmt wird. Um die Seitwärtsstreuung zu messen, werden Detektoren senkrecht zu den Detektoren für die Vorwärtsstreuung angebracht. Für die genaue Messung einzelner Zellen werden diese durch eine Kapillare angesaugt und in einen gleichmäßigen Fluss gebracht. Die verwendeten Laser arbeiten meist mit einer Wellenlänge von 488 nm. Zudem kann mittels der Detektoren fluoreszierende Strahlung der durchfließenden Partikel aufgezeichnet werden und somit mit fluoreszierenden Markern versehene Zellen bzw. Zellbestandteile analysiert werden (BD Biosciences, San Jose, CA 2002).

2.11.2 Zellzyklusanalyse

Im Laufe des Zellzyklus verändert sich der DNA-Gehalt der Zelle, sodass dieser mittels Markierung der DNA durch Propidiumjodid (PI) in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden kann. So können die Zellen den einzelnen Phasen zugeordnet werden. Damit das Propidiumjodid an die DNA binden kann, muss die Zellmembran durchgängig gemacht werden. Dies geschieht über Zugabe von 70 % Ethanol (J.T. Baker, Griesheim, Deutschland).

Zur Beobachtung des Zellzyklus wurden je 1×10^5 Zellen HLaC78 bzw. FaDu in Cellstar Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen (Greiner Bio-One GmbH) ausgesät und mit 1 ml RPMI-Medium 1640 24 Stunden im CO₂-Inkubator CB 210 inkubiert. Dann erfolgte bei den Kontrollen ein Medienwechsel. Durchgeführt wurden die folgenden Versuche jeweils mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} von 10 Patientinnen und Patienten. Jeweils 2 Wells wurden mit 30 %igem WS-RPMI-Medium 1640-Gemisch von Tag 1 bzw. Tag 2 behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen gemäß dem vom Hersteller vorgegebenen FACS-Protokoll abgelöst, in ein Flow Cytometry-Röhrchen (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) überführt und bei 4 Grad Celsius und 500 g für 5 Minuten mit der Eppendorf Zentrifuge 5810 R zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in einen Becher dekantiert und

der Rand des Flow Cytometry-Röhrchens getrocknet. Nun wurde das Pellet in 2 ml 70 % Ethanol aufgenommen und wenige Sekunden im Lab Dancer Vario Vortexgerät (IKA GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland) gemischt. Danach wurde das Röhrchen erneut bei 4 Grad Celsius und 500 g für 5 Minuten mit der Eppendorf Zentrifuge 5810 R zentrifugiert. Auch das 70% Ethanol wurde in einen Becher dekantiert und der Rand des Röhrchens mit einem Zellstofftuch getrocknet. Daraufhin wurde das Pellet mit 500 µl Propidiumjodid-Staining-Solution (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) behandelt und bei 4 Grad Celsius für 15 Minuten inkubiert. Jetzt wurde am BD FACS Canto™II Flow Cytometer (BD Biosciences) mithilfe des FACS-DIVA-Programms (BD Biosciences) die Zellzyklusmessung durchgeführt. Dies wurde wie im Laborhandbuch beschrieben durchgeführt.

2.11.3 Annexin-V-Apoptosemessung zu Bestimmung der Zellvitalität

Der Annexin-V-Apoptose-Test ist eine Methode, mittels derer apoptotische und nekrotische von vitalen Zellen differenziert werden können. Dies geschieht durch den Nachweis der Bindung von Allophycocyanin (APC) Annexin V an Phosphatidylserin (PS). Im vitalen Zustand kommt PS nur im Inneren der Zelle auf der Innenseite der Zellmembran vor und kann somit nicht gebunden werden. Im Rahmen der Apoptose, also dem programmierten Zelltod, wird das PS allerdings auf die Außenseite der Zellmembran transloziert und kann somit von Annexin V gebunden werden. Im Rahmen einer Nekrose kommt es zu einem unkontrollierten Absterben der Zelle. Die Membran wird durchlässig und das Annexin V kann in die Zelle gelangen, um dort an das PS zu binden und es zu markieren. Somit ist es möglich, sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen zu identifizieren. Sie können allerdings noch nicht voneinander abgegrenzt werden. Daher wird gleichzeitig zur Annexin-V-Apoptosemessung auch eine Färbung der Zellen mit Propidiumjodid durchgeführt. Dieser Farbstoff kann nur in die Zelle gelangen, wenn die Zellmembran durchlässig ist, wie es nur bei der Nekrose vorliegt. So kann unter den Annexin-V-positiven Zellen auch zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden (Vermees et al. 1995).

Cisplatin ist ein Zytostatikum, das passiv über die Zellmembran diffundiert und dort reaktive Komplexe in Form von Aquaplatin-Komplexen bildet, die nun kovalent an die Basen der DNA binden können und dort zu Quervernetzungen des DNA-Stranges führen

(Ott et al. 2006). Dies führt zum Absterben der Zelle, was über den Annexin-V-Apoptose-Test nachgewiesen werden kann. Nun wurde untersucht, wie stark die Vitalität von bisher unbehandelten Tumorzellen bei bestimmten Cisplatin-Konzentrationen reduziert wird. Im Anschluss wurde diese mit der Vitalität von Tumorzellen, die bereits mit WS behandelt wurden, verglichen, um eine mögliche Induktion einer Resistenz gegen Cisplatin in den Tumorzellen festzustellen. In Vorversuchen waren die mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) von Cisplatin in FaDu- und HLaC78-Zelllinien bestimmt worden. Diese lagen jeweils bei ca. 50 Mikromolar (μM) Cisplatin-Konzentration, weswegen die Versuche mit Cisplatin-Konzentrationen von 40 μM , 50 μM und 60 μM durchgeführt wurden, um den Bereich um diese Konzentration abzudecken.

Die Versuche wurden jeweils mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} von 10 Patientinnen und Patienten durchgeführt. Es wurden je 1×10^5 Zellen HLaC78 bzw. FaDu auf Cellstar Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen (Greiner Bio-One GmbH) ausgesät und mit 500 μl RPMI-Medium 1640 behandelt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt, wobei die Kontroll-Wells mit 500 μl RPMI-Medium 1640 versehen wurden. Die anderen Wells wurden mit 30 % WS-RPMI-Medium 1640-Mischung behandelt, die jeweils das WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2} beinhaltet. Nach weiteren 24 Stunden wurde erneut das Medium ausgetauscht, wobei nun die zusätzliche Behandlung mit Cisplatin erfolgte. Dies geschah nach folgendem Schema: Die Kontrollen wurden mit je 40 μM , 50 μM und 60 μM Cisplatin inkubiert. Ebenso wurde dies bei den Wells mit dem WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2} durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Leerkontrolle, die lediglich mit RPMI-Medium 1640 behandelt wurde und Kontrollen mit WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2} ohne Cisplatin. Nach erneuter Inkubation über 24 Stunden wurden die Zellen mit 1 ml 0,25 % Trypsin EDTA 1X abgelöst und in 2 ml Eppendorf-Gefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Nun erfolgte gemäß Laborhandbuch ein Waschschrift mit Annexin V Binding Buffer (1X), das durch 1:0-Verdünnung mit destilliertem Wasser aus 10X Annexin V Binding Buffer (BD Biosciences) hergestellt wurde. Nach Resuspendieren wurden 100 μl des Zellgemisches in ein Flow Cytometry-Röhrchen gegeben und für 5 Minuten bei 500 g mit der Eppendorf Zentrifuge 5810 R zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein Becherglas dekantiert und das Zell-Pellet in 2 ml 4 Grad Celsius kaltem Annexin-V-Binding-Buffer (1X) aufgenommen. Anschließend wurden 5 μl PI

Staining Solution (BD Biosciences) und 5 µl APC Annexin V (BD Biosciences) dazugegeben. Nach kurzem Schütteln des Röhrchens im lab dancer vario Vortexgerät wurde es für 15 Minuten bei 4 Grad Celsius im Dunkeln inkubiert, woraufhin dann die Messung der Apoptose/Nekrose-Rate und Zellvitalität der Zellen am BD FACS CantoTMII flow cytometer im Apoptose-Protokoll erfolgte (BD-Biosciences 2006).

2.12 Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von Markern einer epithelial-mesenchymalen Transition

2.12.1 Grundlagen

Die PCR, ist eine Untersuchungstechnik, bei der mittels hitzestabiler DNA-Polymerasen *in vitro* DNA-Abschnitte vervielfältigt werden können. Dies geschieht in 3 Schritten, die sich nach Abschluss eines Zyklus immer wiederholen. Der erste Schritt dient der Trennung der beiden DNA-Stränge der zu untersuchenden Probe. Diese Denaturierung geschieht durch Erhöhung der Temperatur auf 94-96 Grad Celsius, bei der die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, gelöst werden. Im nächsten Schritt wird die DNA wieder schnell auf 65 Grad Celsius abgekühlt. Nun kann der Primer, ein Oligonukleotid, das komplementär zum Beginn der gesuchten DNA-Sequenz ist, an die entsprechende Stelle auf den Einzelsträngen binden. Dies nennt sich Primer-Hybridisierung bzw. Annealing. Der dritte und letzte Einzelschritt ist die Elongation bzw. Extension. Dabei wird die Temperatur wieder je nach benutzter DNA-Polymerase auf den jeweils idealen Wert erhöht (Solanki 2012). Im Falle des für diese Arbeit genutzten Systems kam die *Thermus aquaticus*(Taq)-Polymerase zum Einsatz, welche bei einer Temperatur von 72 Grad Celsius ihr Temperaturoptimum hat (Mullis et al. 1994). Diese Polymerase ergänzt dann die beiden Einzelstränge mit freien Nukleotiden. Somit liegt am Ende dieses Schrittes die gesuchte DNA-Sequenz in verdoppelter Menge vor. Jetzt kann der Prozess wieder von vorne beginnen, wobei sich so in jedem Zyklus der initiale DNA-Gehalt verdoppelt und bei mehrmaliger Ausführung somit eine exponentielle Vervielfältigung stattfindet, wie es Solanki in seinem Review erläutert (Solanki 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Real-Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) verwendet, die im Folgenden beschrieben werden soll.

2.12.2 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR stellt eine Weiterentwicklung der PCR dar und dient der Quantifizierung von DNA-Proben (Solanki 2012). Dies wird erreicht, indem nach jedem PCR-Zyklus der neue DNA-Gehalt gemessen wird. Hierfür werden sogenannte *Thermus aquaticus* (*TaqMan*)-Sonden, also fluorogen-markierte Oligonukleotidsonden verwendet, die, analog zur PCR, komplementär zum Beginn der gesuchten DNA-Abschnitte sind und diese binden. Im gebundenen Zustand sorgt ein am 3'-Ende der Sonde befestigter Quencher-Farbstoff über den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) dafür, dass der am 5'-Ende angebrachte fluoreszierende Reporter-Farbstoff eine deutlich verringerte Fluoreszenz-Aktivität hat. Wenn nun im Rahmen der PCR die Primerverlängerung stattfindet, kommt es zur Spaltung der Sonde durch die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase. Dadurch kommt es zur Freisetzung des fluoreszierenden Farbstoffes, der jetzt nicht mehr durch die räumliche Nähe zu dem Quencher-Farbstoff gehemmt wird. Proportional zur vorhandenen Menge an Primer-Sequenzen erhöht sich somit die Fluoreszenzintensität, wodurch eine quantitative Messung möglich wird, wie es Didenko in seinem Review erläutert (Didenko 2001). Über Messung der relativen Vermehrung der Fluoreszenz kann auf die Geschwindigkeit der DNA-Replikation geschlossen und somit auf die Ausgangskonzentration des gesuchten DNA-Abschnittes zurückgerechnet werden. Diese Berechnung geschieht über den Cycle Threshold-Wert (CT-Wert) bzw. Schwellenwertzyklus, also den Wert, bei dem die exponentielle Vermehrung der Sequenz beginnt. Dieser Wert ist ein relatives Maß für die Konzentration der Ziel-Sequenz in der untersuchten Probe und erlaubt somit einen quantitativen Vergleich verschiedener Proben. Als endogene Kontrollen der Real-Time-PCR dienen vordefinierte Primer mit zugehöriger Probe, z. B. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Thermo Fisher Scientific Inc. 2006).

2.12.3 Real-Time Reverse Transkriptase PCR

Die Real-Time Reverse Transkriptase PCR stellt eine zusätzliche Erweiterung der Real-Time PCR dar. Während bei der Real-Time PCR eine quantitative Messung des DNA-Gehaltes erfolgt, ermöglicht die Real-Time Reverse Transkriptase PCR die quantitative Messung der messenger Riboneucleinsäure (mRNA)-Expressierung einer Zelle (Solanki

2012). Möglich wird dies durch ein zusätzliches Enzym, die Reverse Transkriptase, welche RNA in komplementäre DNA umschreibt, die dann im Rahmen einer Real-Time PCR vervielfältigt und gemessen werden kann (Doak et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Marker der EMT, der epithelial-mesenchymalen Transition, geprüft. Einerseits wurden die mesenchymalen Marker Vimentin und N-Cadherin und der epitheliale Marker E-Cadherin, andererseits die an der EMT und ihren Signalwegen beteiligten Proteine Snail 1 und Twist untersucht (Kalluri et al. 2009). Hierfür wurde jeweils WS_{Tag1} und WS_{Tag2} von 10 Patientinnen und Patienten benutzt.

Es wurden je 5×10^5 Zellen FaDu und HLaC78 in Cellstar Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät und mit je 2 ml RPMI-Medium 1640 über 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde dieses Medium gewechselt, wobei die Kontrollen wieder mit RPMI-Medium 1640 und die anderen Wells mit 30 %igem WS -RPMI-Medium 1640-Gemisch, das jeweils das WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2} beinhaltet, inkubiert. Auf diese Weise wurden die Zellen wieder 24 Stunden bei 37 Grad Celsius bebrütet. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 500 μ l 0,25 % Trypsin EDTA 1X abgelöst und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in 15ml Cellstar Tubes bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 500 g mit der Eppendorf Zentrifuge 5810 R zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde bis auf einen kleinen Rest aus dem Röhrchen gesaugt und das Röhrchen bei -86 Grad Celsius eingefroren, bis es der PCR zugeführt wurde. Zur Durchführung der PCR musste die mRNA aus den Zellen isoliert werden. Hierfür wurde das RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Die eingefrorenen Zelllösungen wurden wie im Handbuch beschrieben bei 37 Grad Celsius im Laborwasserbad aufgewärmt und mit je 600 μ l Buffer RLT (QIAGEN GmbH) zur Zelllyse bei 37 Grad Celsius für 30 Minuten im CO_2 -Inkubator CB 210 inkubiert. Durch Auf- und Abpipettieren wurde die vollständige Zelllyse kontrolliert. Es wurden 600 μ l 70 % Ethanol zu dem entstandenen Gemisch hinzugefügt und durch Resuspendieren vermischt. 600 μ l dieses Lysats wurden auf die Filtermembran der RNeasy Mini Spin Columns (QIAGEN GmbH) pipettiert und bei 13.000 rpm für 15 Sekunden mit der Eppendorf Zentrifuge 5810 R zentrifugiert, um die RNA von den Zellresten und der DNA zu trennen. Nach Dekantieren des Durchflusses wurden die übrigen 600 μ l Lysat auf dieselbe Filtermembran der RNeasy Mini Spin Columns gegeben und erneut bei 13.000 rpm für

15 Sekunden zentrifugiert. Auch hier wurde der Durchfluss dekantiert und je 700 µl Buffer RW1 (QIAGEN GmbH) auf die RNeasy Mini Spin Columns gegeben. Erneut wurde die Mischung bei 13.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Es wurden 500 µl Buffer RPE (QIAGEN GmbH) auf die RNeasy Mini Spin Columns gegeben und bei 13.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach Dekantieren des Durchflusses wurden weitere 500 µl Buffer RPE auf die RNeasy Mini Spin Columns pipettiert. Nun wurden diese bei 13.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Um die RNA in ein Eppendorf-Gefäß zu übertragen, wurden die Membranen der RNeasy Mini Spin Columns auf ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt und 50 µl RNase-Free Water (QIAGEN GmbH) (Diethyldicarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser) auf die Mitte der Membran pipettiert. Das Eppendorf-Gefäß wurde bei 13.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert, sodass sich nun die RNA im Durchfluss im Eppendorf-Gefäß wiederfand.

Um eventuell in der Lösung verbliebene DNA zu entfernen, wurde das RNase-free DNase Kit (QIAGEN GmbH) verwendet. Es wurde zuerst die DNase-Lösung angesetzt, indem die DNase I, RNase-Free (QIAGEN GmbH) in 550 µl RNase-Free Water aufgelöst wurden. 10 µl dieser DNase-Lösung wurden nun mit 70 µl Buffer RDD (QIAGEN GmbH) für den DNase 1-Inkubationsmix (80 µl) angesetzt. Dieser Mix wurde auf die Membran der RNeasy Mini Spin Columns pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 350 µl Buffer RW1 auf die Membran der RNeasy Mini Spin Columns gegeben und diese für 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Jetzt wurden zwei weitere Waschschriffe mit 500 µl Buffer RPE durchgeführt. Um übrige Pufferreste zu entfernen, wurden die Filtersäulen in 2 ml Sammelröhrchen gegeben und bei 8.000 g für 1 Minute zentrifugiert. Dann wurden die RNeasy Mini Spin Columns in neue 1,5 ml Collection Tubes (QIAGEN GmbH) übertragen und 50 µl RNase-Free Water direkt auf die Membran pipettiert. Die RNeasy Mini Spin Columns wurden für eine Minute bei 8.000 g zentrifugiert. So wurde letztlich die zuvor isolierte RNA in dem RNase-Free Water gelöst und verfügbar gemacht (QIAGEN 2012). Für alle Zentrifugiervorgänge wurde wie anfangs beschrieben die Eppendorf Zentrifuge 5810 R verwendet.

Die gewonnene RNA musste nun in komplementäre DNA, also cDNA, umgeschrieben werden. Hierfür diente das Enzym Reverse Transkriptase. Die RNA wurde zunächst auf

einheitliche Konzentrationen gebracht. Es wurden 147 μl RNase-Free Water in Photometer-Küvetten (Eppendorf AG) pipettiert und 3 μl der RNA hinzugegeben. Im Spektralphotometer BioPhotometer (Eppendorf AG) wurde dann bei 260 nm die Extinktion bestimmt. Daraus wurde dann die vorliegende RNA-Konzentration berechnet, die mit RNase-Free Water so aufgefüllt wurde, um aus allen Proben gleichmäßig die benötigte RNA der reversen Transkription zuzuführen. Es wurde eine Mischung aus 4 μl MasterMix, der aus 1 μl Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 μl Quantiscript RT Buffer, 5x (QIAGEN GmbH) und 1 μl RT Primer Mix (QIAGEN GmbH) besteht, 5 μl RNA-Suspension und 11 μl RNase-Free Water zusammengestellt. Die je 20 μl der entstandenen Mischungen wurden in 96-Well PCR-Platten (Eppendorf AG) pipettiert und im StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) mit dem Programm StepOnePlus (Applied Biosystems) die reverse Transkriptase-Reaktion durchgeführt. In der ersten Phase wurden die Proben für 15 Minuten bei 42°C inkubiert, während die reverse Transkription stattfand. Anschließend wurde für 3 Minuten die Temperatur auf 95°C erhöht, um das reverse Transkriptase-Enzym zu inaktivieren (QIAGEN 2009).

3 μl der gewonnenen cDNA wurden mit 147 μl RNase-Free Water verdünnt und bei 320 nm im Photometer die Extinktion gemessen. Die Konzentrationen der DNA wurden dann auf Konzentrationen von 200 ng/ml gebracht, um die Probenmenge vergleichen zu können.

Mit der nun vorliegenden vereinheitlichten DNA wurde die quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Hier wurde die Expression von Snail 1, Snail 2, Twist, Vimentin, E-Cadherin und N-Cadherin untersucht. GAPDH wurde als Kontrolle geführt, mittels derer die relative Expression der gesuchten Marker berechnet werden konnte.

Für die Durchführung der quantitativen PCR wurden 20 μl -Reagenzien angesetzt. Diese bestanden aus 10 μl TaqMan Gene Expression Mastermix (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA), 1 μl TaqMan Gene Expression Assay Applied Biosystems, Life Technologies), 3 μl cDNA-Probe und 7 μl RNase-Free Water. Diese Reagenzien wurden in Triplets, also jeweils dreifach, in 96-Well PCR-Platten pipettiert. Die Durchführung der PCR erfolgte im Step-One™ Real-Time PCR System mit dem Programm StepOnePlus. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Die 3-fach ermittelten C_T -Werte wurden gemittelt und anschließend der Mittelwert des

entsprechenden gemittelten GAPDH- C_T subtrahiert, um den ΔC_T -Wert des jeweils untersuchten Zielgens zu ermitteln:

$$\Delta C_T (\text{Zielgen}) = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{GAPDH})$$

So ergaben sich die ΔC_T -Werte von Tag 1, Tag 2 und der Kontrolle, jeweils von den Zelllinien FaDu und HLaC78. Durch Subtraktion des ΔC_T der unbehandelten Zellen (Negativkontrolle) von den ΔC_T -Werten des Zielgens der behandelten Zellen ergaben sich die $\Delta\Delta C_T$ (Zielgen)-Werte:

$$\Delta\Delta C_T (\text{Zielgen}) = \Delta C_T (\text{Zielgen}) - \Delta C_T (\text{Negativkontrolle Zielgen})$$

Aus diesen Werten konnte die relative Expression der Zielgene im Vergleich zu den Kontrollen berechnet werden:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T (\text{Zielgen})}$$

Tabelle 2.5: Verwendete Zielsequenzen und TaqMan Assay IDs (Applied Biosystems)

Zielgen	Taq Man Assay ID	RefSeq Zielsequenz
Vimentin	Hs00958111_m1	NM_003380.3
Snail 1	Hs00195591_m1	NM_005985.3
Twist	Hs01675818_s1	NM_000474.3
E-Cadherin	Hs01023894_m1	NM_001317184.1
N-Cadherin	Hs00983056_m1	NM_001308176.1
GAPDH	Hs02758991_g1	NM_001256799.2

2.13 Spheroid-Migrationsanalyse zur Untersuchung der Ausbreitung der Zellen

Die Migration der Zellen sollte anhand eines Spheroid-Modells überprüft werden. Es handelt sich hierbei im Gegensatz zur üblichen Zellkultur um eine mehrschichtige Kultur, die auf eine Schicht aus ECM gegeben wird, um die Ausbreitung der Zellen innerhalb der Matrix zu beobachten und zu analysieren. Eine verstärkte Invasion in die Matrix wird laut Hirschhaeuser et al. v. a. durch Enzyme wie Matrixmetalloproteasen ermöglicht, die eine Verdauung von Matrixbestandteilen bewirken (Hirschhaeuser et al. 2010; Mueller-Klieser 1997). Es wurden hierzu je 5×10^4 Zellen FaDu und HLaC78 in Costar Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen mit abgerundetem Boden (Corning Incorporated-

Life Sciences) mit 100 µl RPMI-Medium 1640 ausgesät und für 24 Stunden bei 37 Grad Celsius im CO₂-Inkubator CB 210 inkubiert. Aufgrund des abgerundeten Bodens wuchsen die Zellen vom tiefsten Punkt der Vertiefung ausgehend annähernd in runder Form. Jetzt wurden Cellstar Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen (Greiner Bio-One GmbH) mit dem Extracellular Matrix Gel MaxGel™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) versehen, welches zuvor angesetzt wurde. Dieses wurde mit RPMI-Medium 1640 ohne FCS 1:80 verdünnt. Von diesem Extracellular Matrix Gel MaxGel™ ECM wurden je 50 µl auf ein Well der Cellstar Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt, ohne die Beschichtung des Wells zu berühren. Nach zweimaliger Spülung mit PBS wurde das Extracellular Matrix Gel MaxGel™ ECM mit PBS-Lösung mit 1% Albumin aus Rinderserum (BSA) (Sigma Aldrich) für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt und diese anschließend abgesaugt. Die Zellpellets wurden nun nach ausreichendem Wachstum unter dem Lichtmikroskop DMIL LED mit einer Pipettenspitze unter leichter Aspiration aufgenommen und möglichst zentral auf die mit ECM-Gel versehenen Wells der Cellstar Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen übertragen. Je 4 Wells pro Zelllinie wurden mit 100 µl RPMI-Medium 1640 behandelt. Je 4 Wells wurden mit WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2} von jeweils 10 Patientinnen und Patienten behandelt. Die Spheroide wurden anschließend zum Zeitpunkt 0 unter dem Forschungsmikroskop DMI 4000 B (Leica) bei 80-facher Vergrößerung mit dem Programm Leica Application Suite LAS V4.8 (Leica) fotografiert. Nach Inkubation über 24 Stunden bei 37 Grad Celsius im CO₂-Inkubator CB 210 wurden die Spheroide erneut unter dem Mikroskop fotografiert. Um die Ausbreitung bzw. Invasion der Zellen aus dem Spheroid zu quantifizieren, wurde die gesamte, von den Zellen eingenommene Fläche und Dichte mittels der Bildbearbeitungssoftware ImageJ gemessen.

2.14 Beobachtung der Zellmorphologie

Unter dem Forschungsmikroskop Leica DMI 4000 B (Leica) der inversen Lichtmikroskopie die Zellmorphologie der Tumorzellen ohne Behandlung mit WS mit der Zellmorphologie nach Behandlung mit WS verglichen. Hierfür wurden je 5.000 Zellen FaDu und HLaC78 in Cellstar Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät, mit 100 µl RPMI-Medium 1640 versehen und für 24 Stunden bei 37 Grad Celsius im CO₂-

Inkubator CB 210 inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Medienwechsel bei den Wells, bei denen keine WS-Behandlung stattfinden sollte. Das RPMI-Medium 1640 wurde abgesaugt und neue 100 μ l RPMI-Medium 1640 auf die Zellen gegeben. Es wurden nun 100 μ l RPMI-Medium 1640 mit 30 %iger WS-Konzentration auf die Zellen gegeben, die mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} behandelt wurden. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37 Grad Celsius im CO_2 -Inkubator CB 210 wurden die Wells unter dem Mikroskop bei 80-facher Vergrößerung ohne Färbung fotografiert, um die Zellmorphologie und die Zell-Zell-Kontakte im Zellverbund zu beurteilen. Dies erfolgte mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} von 10 Patientinnen und Patienten.

2.15 Datenauswertung

2.15.1 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Graphpad Prism Statistiksoftware (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Hierfür wurden Boxplots und Säulendiagramme verwendet. Der Boxplot ermöglicht es, zusätzlich zu den Mittelwerten auch die Lage und die Streuung der Daten graphisch darzustellen. So wird in einer sog. Box oder Kasten, der Bereich dargestellt, in dem sich die mittleren 50 % der Werte befinden. Der Abstand zwischen der 25. und der 75. Perzentile wird Interquartilenabstand (IQR) genannt und stellt ein Maß für die Streuung der Daten dar. Somit befindet sich das obere Quartil oberhalb und das untere Quartil unterhalb des Kastens. Weiterhin befinden sich ober- und unterhalb des Kastens die sog. Whisker. Diese werden durch die Werte gebildet, die maximal das 1,5-fache des IQR sein dürfen. So zeigt die horizontale Linie am Ende eines Whiskers den letzten Wert an, der innerhalb dieses Bereichs liegt. Werte, die außerhalb liegen, werden als Ausreißer bezeichnet und mit einem Punkt dargestellt. Innerhalb des Kastens befindet sich zudem eine Linie, die den Median der Werte kennzeichnet und somit eine Grenze bildet, unter- bzw. oberhalb derer je 50 % der Werte liegen (Tukey 1977) (s. Abb. 2.2). Säulendiagramme eignen sich zur Darstellung einer relativen Häufigkeit bei kleiner Versuchszahl, wie bei der Untersuchung des Dotblots.

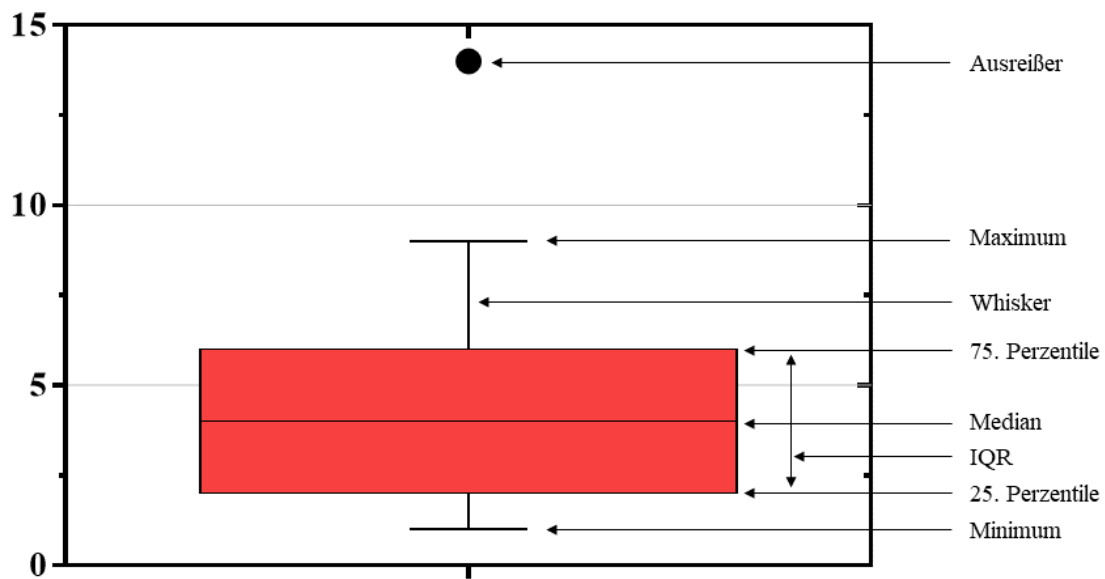


Abbildung 2.2: Schema eines Boxplots, IQR: Interquartilenabstand

2.15.2 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Um Ergebnisse statistisch beurteilen zu können, muss eine Nullhypothese und eine Alternativhypothese formuliert werden. Die Nullhypothese bedeutet in der vorliegenden Arbeit, dass das WS keinen Effekt auf die jeweils untersuchte Variable hat, bzw. dass es keinen Unterschied zwischen dem Effekt des WS_{Tag1} und dem Effekt des WS_{Tag2} gibt. Die Alternativhypothese wiederum besagt, dass das WS einen Effekt auf die jeweils untersuchte Variable hat, bzw. dass es einen Unterschied zwischen den Effekten der WS_{Tag1} und WS_{Tag2} gibt. Wenn die Nullhypothese ausgeschlossen werden kann, wird die Alternativhypothese angenommen. Zur Überprüfung, ob die Nullhypothese ausgeschlossen wird, dienen statistische Verfahren. Diese untersuchen, ob der Unterschied zwischen den untersuchten Werten signifikant ist. Festgelegt wurde hier ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$.

Die statistische Auswertung erfolgte wie auch die graphische Darstellung mit dem Programm GraphPad. Verwendet wurden der Mann-Whitney-U-Test und der Wilcoxon-Test. Der Mann-Whitney-U-Test ist ein nicht-parametrisches statistisches Verfahren, mit dem überprüft werden kann, ob sich die zentralen Tendenzen in zwei unabhängigen Gruppen unterscheiden. Hierbei wird keine Normalverteilung der Proben vorausgesetzt, sie müssen lediglich ordinalskaliert sein. Die einzelnen Proben werden in eine größenabhängige Rangordnung gebracht, jeweils die Ränge der zu vergleichenden

Gruppen aufsummiert und miteinander verglichen. Damit wird nur überprüft, ob eine Variable kleiner oder größer ist als eine andere und nicht, wie groß der Unterschied ist (Mann et al. 1947). Er wurde in dieser Arbeit zur Testung der Signifikanz der Werte der jeweils einzelnen Untersuchungen mit WS im Vergleich zur Kontrolle ohne WS genutzt. Auf eine Korrektur einer möglichen Alphafehler-Akkumulation wurde aufgrund der geringen Probenzahl verzichtet. Auch der Wilcoxon-Test ist ein nicht-parametrisches statistisches Verfahren. Er dient zum Vergleich zweier gepaarter Stichproben. Hierbei wird die Differenz je zweier zu vergleichender Werte ermittelt und den Werten ein Rang zugeordnet, mittels dessen die Signifikanz des Unterschiedes bestimmt werden kann (Wilcoxon 1945). In der vorliegenden Arbeit wurde er verwendet, um die Ergebnisse der Behandlung mit WS_{Tag1} mit denen der Behandlung mit WS_{Tag2} zu vergleichen.

3 Ergebnisse

Im folgenden Teil werden die Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt. Die Ergebnisse werden als Median der Stichproben angegeben. Eine tabellarische Darstellung der Einzelwerte befindet sich jeweils in der Appendix.

Es wurde die Proliferationsrate der Tumorzellen mit und ohne WS-Behandlung mittels Proliferationsassay untersucht. Die Analyse der Zytokinzusammensetzung des WS wurde per Dotblot durchgeführt. Mittels FACS wurden die Verteilung der Zellzyklusphasen mit und ohne WS-Behandlung in den Tumorzellen und die Apoptoseraten der Tumorzellen nach Cisplatinbehandlung mit und ohne WS-Behandlung analysiert. In der PCR wurde die Genexpression von Snail 1, Snail 2, Vimentin, Twist, E-Cadherin und N-Cadherin durch die Tumorzellen mit und ohne WS-Behandlung untersucht. Unter dem Mikroskop wurde die Migration der Tumorzellen in die Umgebung mit und ohne WS-Behandlung analysiert. Des Weiteren wurden die Zellen morphologisch begutachtet. Zuletzt erfolgte der Vergleich der Ergebnisse zwischen WS_{Tag1} und WS_{Tag2} .

3.1 Auswirkung des Wundsekrets auf die Proliferationsrate der Tumorzellen

Zu Beginn wurde die Konzentration an WS_{Tag1} untersucht, bei der nach 24-stündiger Behandlung mit WS die größte Proliferation der Tumorzellen zu sehen war. Die gefundene Konzentration sollte anschließend für die weiteren Versuche verwendet werden. Untersucht wurden hierfür WS_{Tag1} von 4 Patientinnen und Patienten. Das größte Wachstum der Zellen ergab sich bei beiden Zelllinien bei einer Konzentration des WS von 30 % gemischt mit 70 % RPMI-Medium 1640. Hier zeigten sich eine relative Proliferationsrate der Zellen von 2,02 im Vergleich zur Negativkontrolle mit reinem RPMI-Medium 1640 bei FaDu-Zellen (s. Abb. 3.1) und ein relatives Wachstum von 1,48 im Vergleich zur Negativkontrolle bei HLaC78-Zellen (s. Abb. 3.2). Für die folgenden Versuche wurde deshalb eine WS-Konzentration von 30 % am Nährmedium gewählt. Das Medium zur Behandlung der Zellen bestand also bei allen Versuchen aus 30 % WS und 70 % RPMI-Medium 1640. Die tabellarische Auflistung der Einzelwerte findet sich in der Appendix unter IV.A.

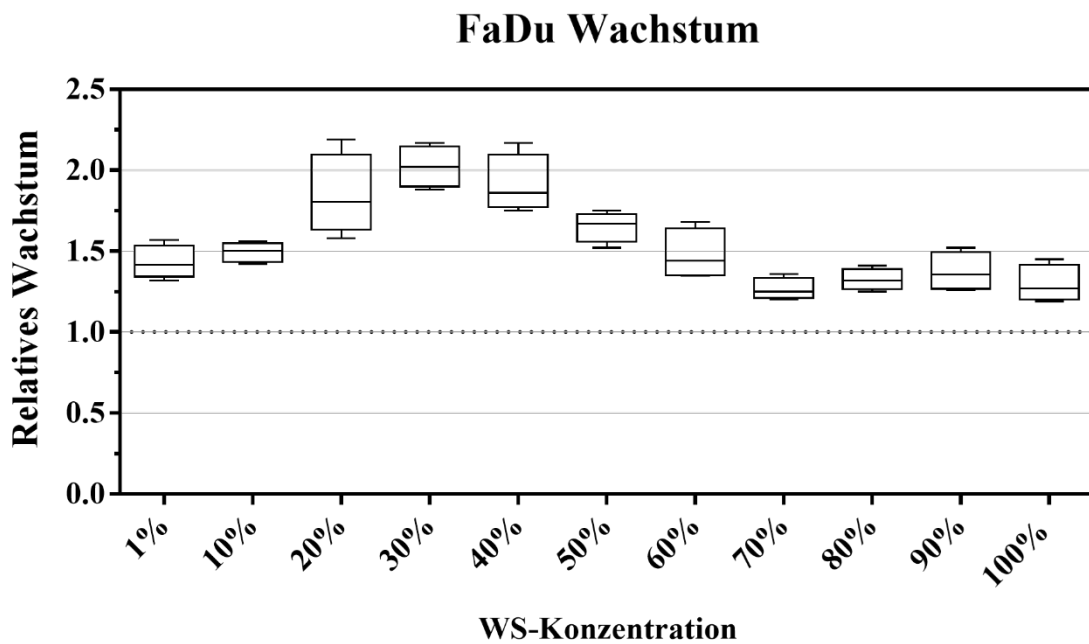


Abbildung 3.1: FaDu Wachstum

Darstellung des relativen Wachstums von FaDu-Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von WS im WS-Medium-Gemisch

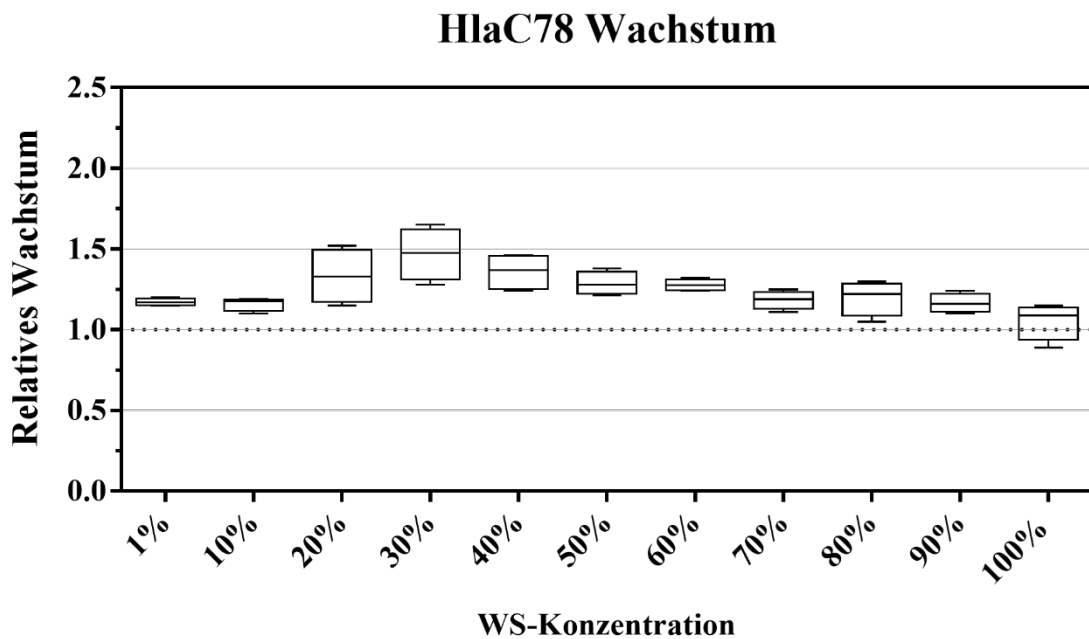


Abbildung 3.2: HLaC78 Wachstum

Darstellung des relativen Wachstums von HLaC78-Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von WS im WS-Medium-Gemisch

3.2 Zusammensetzung der Zytokine im Wundsekret

Das Dotplot wurde durchgeführt, um die Konzentrationen der Zytokine im WS zu untersuchen (s. Abb. 3.3). Die Auswertung erfolgte durch Vermessung der Flächen der Dots auf der Membran. Die Flächen der jeweiligen Zytokine wurden in Relation zu den Flächen der zugehörigen Kontrollen gesetzt. Im WS_{Tag1} betrug die relative Konzentration von IL-6 2,45, im WS_{Tag2} 1,59. Bei IL-8 lag die relative Konzentration im WS_{Tag1} bei 0,49 und im WS_{Tag2} bei 0,34. CCL 2 hatte

im WS_{Tag1} eine relative Konzentration von 1,30 und im WS_{Tag2} von 0,94. Die relative Konzentration von EGF war im WS_{Tag1} 0,60 und im WS_{Tag2} 0,40. Bei CCL 5/RANTES lag die relative Konzentration im WS_{Tag1} bei 0,61 und im WS_{Tag2} bei 0,45 (s. Abb. 3.4). Die relative Konzentration von Leptin lag im WS_{Tag1} bei 1,28 und im WS_{Tag2} bei 0,43. Die relativen Konzentrationen der Zytokine IL-6, IL-8, CCL 2, EGF, CCL 5 und Leptin waren jeweils im WS_{Tag2} signifikant niedriger als im WS_{Tag1} . Die relativen Konzentrationen der übrigen getesteten Zytokine waren viel niedriger und wurden deshalb nicht vermessen. Die Positivkontrolle war stark positiv, die Negativkontrolle fiel negativ aus, sodass die Messung gemäß Handbuch valide war.

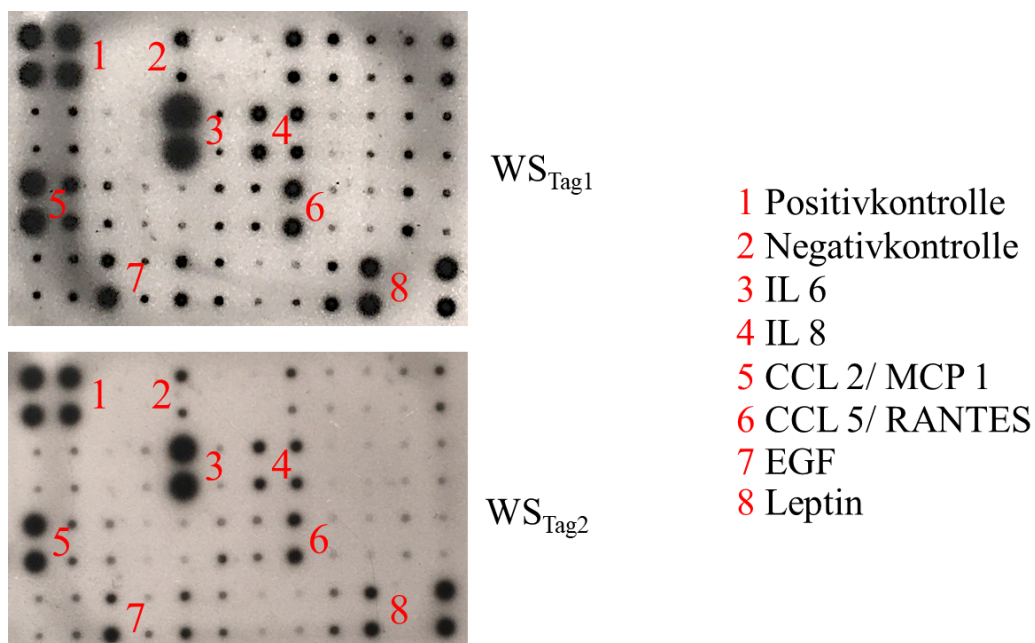


Abbildung 3.3: Dotplot

Dotplot von WS_{Tag1} und WS_{Tag2} mit Legende der in dieser Arbeit behandelten Proteine

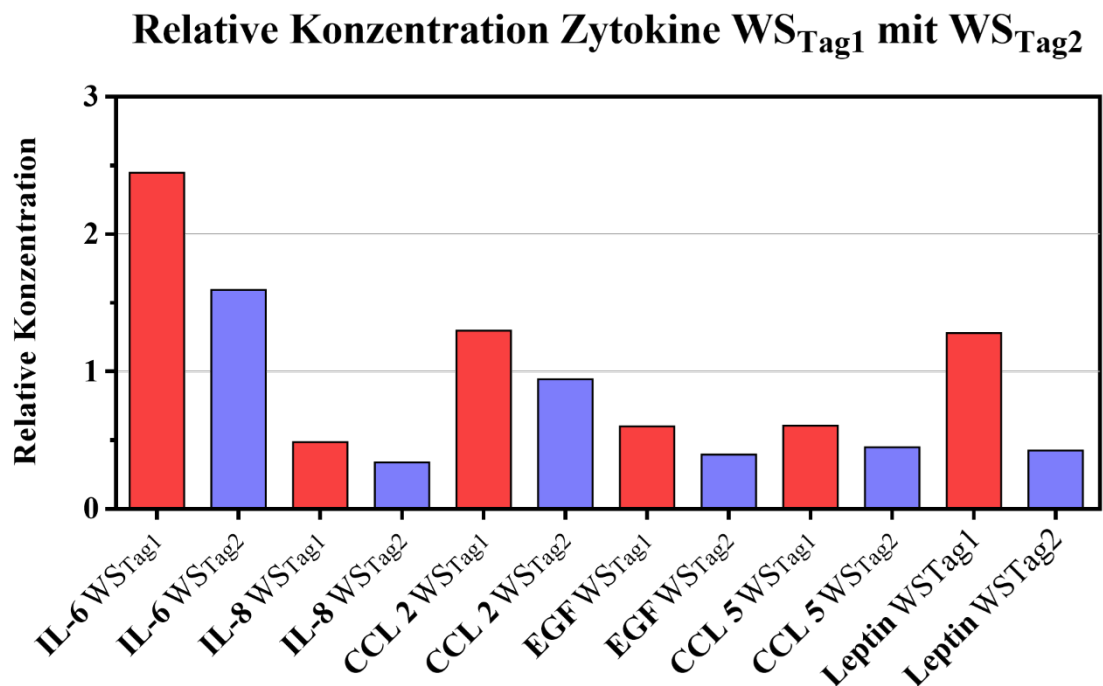


Abbildung 3.4: Relative Konzentration Zytokine WS_{Tag1} mit WS_{Tag2}

Relative Konzentration der Zytokine im Vergleich zur Positivprobe, jeweils von WS_{Tag1} (rot) und WS_{Tag2} (blau)

3.3 Einfluss des Wundsekrets auf den Zellzyklus der Tumorzellen

Die Tumorzelllinien wurden nach Behandlung mit WS im FACS mittels Propidiumjodid-Testung auf den Effekt auf den Zellzyklus untersucht. Der Zellzyklus wurde in 3 Teile eingeteilt: die G1-Phase, die S-Phase und die G2/M-Phase. Der Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase wurde prozentual als Anteil des Zellzyklus angegeben. In der Kontrolle mit alleiniger Behandlung mit RPMI-Medium 1640 befanden sich 46,60 % der FaDu-Zellen in der G1-Phase (s. Abb. 3.5), 14,65 % in der S-Phase und 33,0 % in der G2/M-Phase. Nach Behandlung der FaDu-Zellen mit 30 % WS_{Tag1} befanden sich 43,70 % der Zellen in der G1-Phase, 19,15 % in der S-Phase und 32,8 % in der G2/M-Phase. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der Verteilung im Vergleich zur Kontrolle. Nach Behandlung der FaDu-Zellen mit 30 % WS_{Tag2} befanden sich 49,20 % der Zellen in der G1-Phase, 14,40 % in der S-Phase und 29,90 % in der G2/M-Phase. Der Unterschied zur Kontrolle war nicht signifikant. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WS_{Tag1} und WS_{Tag2} nachgewiesen werden.

In der Kontrolle mit Behandlung mit RPMI-Medium 1640 lag der Anteil der HLaC78-Zellen in der G1-Phase bei 61,50 % (s. Abb. 3.6), 16,60 % befanden sich in der S-Phase und 22,05 % in der G2/M-Phase. Unter Behandlung der HLaC78-Zellen mit 30 % WS_{Tag1} waren 64,30 % der Zellen in der G1-Phase, 16,30 % in der S-Phase und 20,50 % in der G2/M-Phase. Der Anteil von Zellen in der G1-Phase war unter den FaDu-Zellen nach Behandlung mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} jeweils nicht signifikant unterschiedlich. Auch die S-Phase und die G2/M-Phase zeigten keine signifikanten Unterschiede. Nach Behandlung der HLaC78-Zellen mit 30 % WS_{Tag2} war der Anteil der Zellen in der G1-Phase bei 67,05 %, der Anteil der Zellen in der S-Phase 16,55 % und der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase 20,30 %. Der Anteil von Zellen in der G1-Phase war bei HLaC78-Zellen nach Behandlung mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} nicht signifikant verändert. Auch hier unterschieden sich die Ergebnisse durch WS_{Tag1} und WS_{Tag2} nicht signifikant. Die Einzelwerte sind tabellarisch in der Appendix unter I.V.B aufgeführt. Die G2/M-Phase und S-Phase sind graphisch nicht dargestellt.

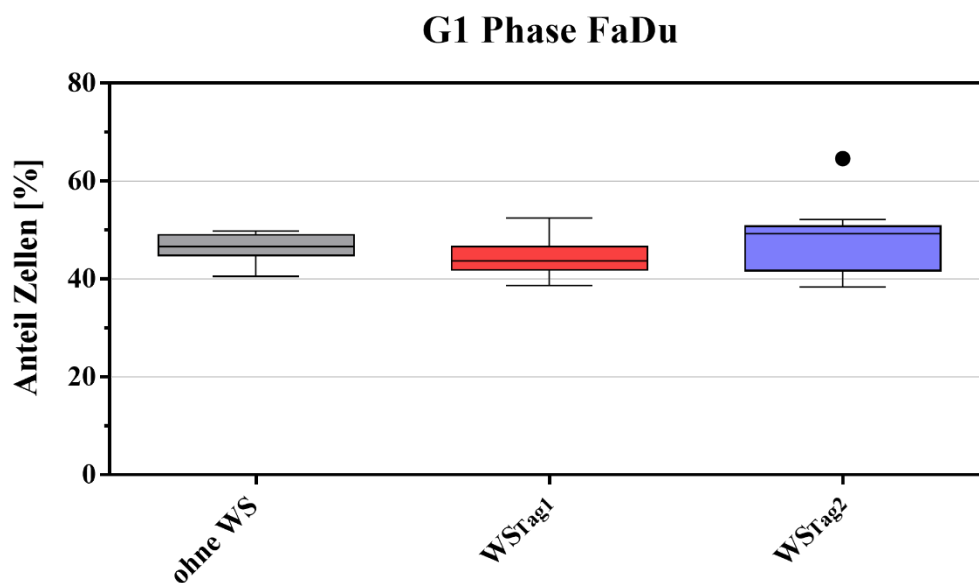


Abbildung 3.5: G1 Phase FaDu

Prozentualer Anteil der FaDu-Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus ohne Behandlung mit WS, bei Behandlung mit WS_{Tag1} (rot) und bei Behandlung mit WS_{Tag2} (blau), •: Ausreißer

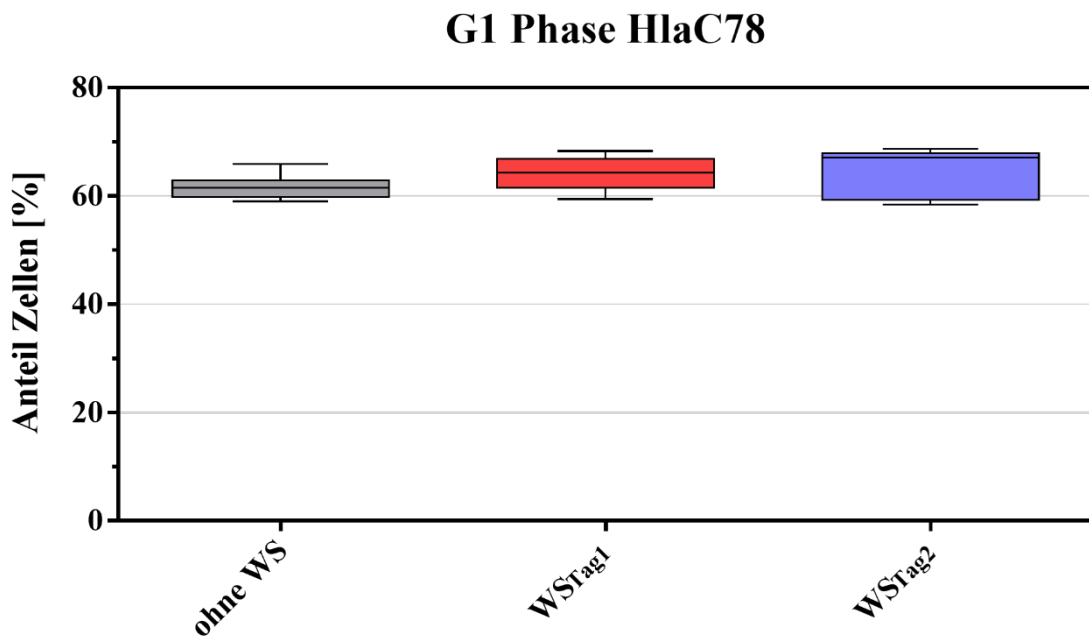


Abbildung 3.6: G1 Phase HlaC78

Prozentualer Anteil der HlaC78-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus ohne Behandlung mit WS, bei Behandlung mit WS_{Tag1} (rot) und bei Behandlung mit WS_{Tag2} (blau)

3.4 Auswirkung des Wundsekrets auf die Sensibilität der Tumorzellen gegenüber Cisplatin

Die Auswirkungen des WS auf die Zellvitalität unter Cisplatin-Therapie wurden anhand des Annexin-Tests überprüft. Unter Behandlung der FaDu-Zellen mit 40 μ M Cisplatin lag die Zellvitalität in der Kontrolle mit Behandlung mit RPMI-Medium 1640 bei 37,15 %. Bei vorheriger Behandlung mit WS_{Tag1} lag die Vitalität bei 52,00 % und nach Behandlung mit WS_{Tag2} bei 47,80 % (s. Abb. 3.7) und somit nicht signifikant erhöht. Unter Behandlung der FaDu-Zellen mit 50 μ M Cisplatin lag die Zellvitalität in der Kontrolle mit RPMI-Medium 1640 bei 33,40 %, bei vorheriger Behandlung mit WS_{Tag1} bei 45,90 % und bei vorheriger Behandlung mit WS_{Tag2} bei 28,15 %. Die Veränderungen waren auch hier nicht statistisch signifikant. Bei einer Cisplatin-Konzentration von 60 μ M betrug die Vitalität der Zellen bei Kontrolle mit RPMI-Medium 1640 17,85 %, bei vorheriger Behandlung mit WS_{Tag1} 20,70 % und bei vorheriger Behandlung mit WS_{Tag2} 22,15 %. Die Unterschiede waren ebenfalls nicht statistisch signifikant.

Die Vitalität von HLaC78-Zellen lag bei Behandlung mit 40 μ M Cisplatin bei der Kontrolle mit RPMI-Medium 1640 bei 57,95 %, nach vorangegangener Behandlung mit

WS_{Tag1} bei 73,15 % und war damit signifikant erhöht. Nach Behandlung mit WS_{Tag2} war die Zellvitalität mit 65,80 % nicht erhöht (s. Abb. 3.8). Bei Behandlung mit 50 µM Cisplatin betrug die Vitalität der Zellen mit RPMI-Medium 1640 als Kontrolle 58,65 %, bei vorheriger Behandlung mit WS_{Tag1} 73,35 % und war damit signifikant erhöht. Bei vorheriger Behandlung mit WS_{Tag2} war sie mit 66,65 % nicht signifikant erhöht. Bei Behandlung der Zellen mit 60 µM Cisplatin lag die Vitalität bei der Kontrolle mit RPMI-Medium 1640 bei 46,30 %, bei vorausgegangener Behandlung mit WS_{Tag1} bei 44,05 % und damit nicht erhöht. Bei vorausgegangener Behandlung mit WS_{Tag2} war sie mit 57,05 % signifikant erhöht. In keiner der Cisplatin-Konzentrationen konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen WS_{Tag1} und WS_{Tag2} gezeigt werden. Die Einzelwerte der Messungen finden sich in der Appendix unter IV.C. Die Zellvitalitäten von FaDu- und HlaC78-Zellen unter Cisplatin-Behandlung mit 50 µM und 60 µM sind graphisch nicht dargestellt.

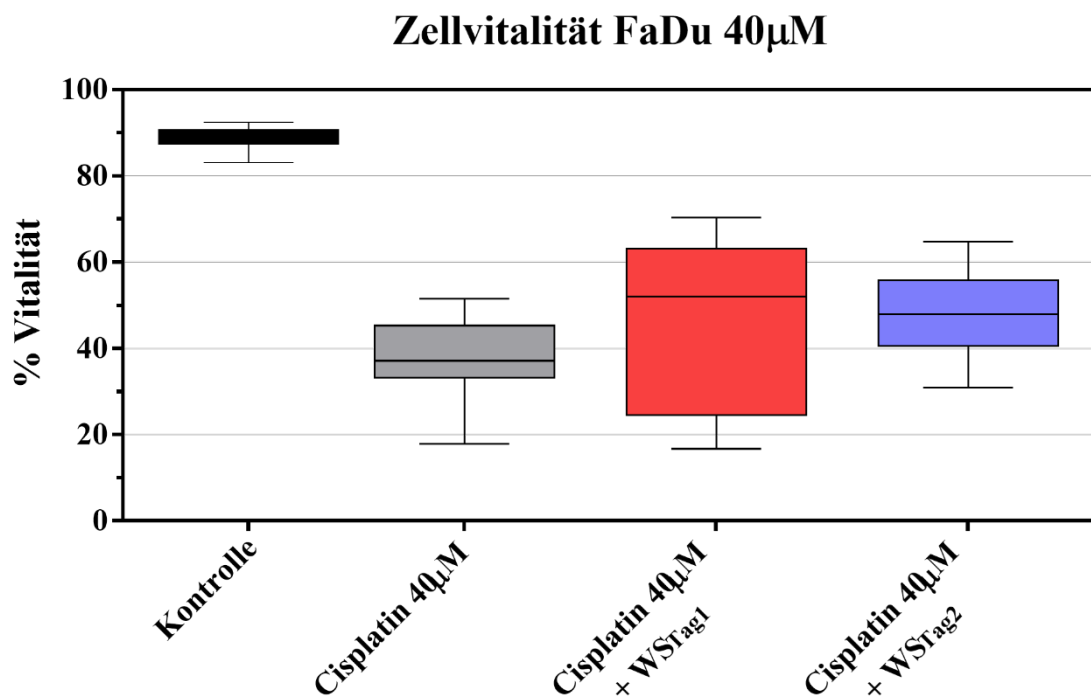


Abbildung 3.7: Zellvitalität FaDu 40 µM

Prozentueller Anteil der vitalen Zellen an allen FaDu-Zellen ohne Behandlung mit Cisplatin (schwarz), nach Behandlung mit einer Cisplatin-Konzentration von 40 µM ohne WS (grau), nach Vorbehandlung mit WS_{Tag1} (rot) und anschließender Behandlung mit einer Cisplatin-Konzentration von 40 µM und nach Vorbehandlung mit WS_{Tag2} (blau) und anschließender Behandlung mit einer Cisplatin-Konzentration von 40 µM

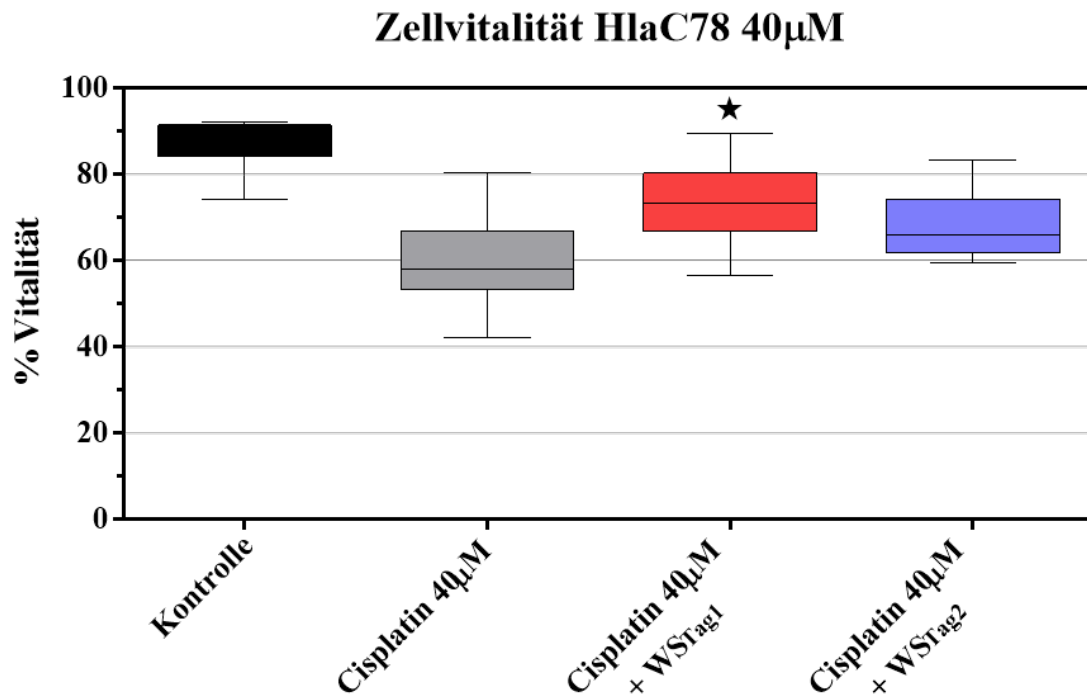


Abbildung 3.8: Zellvitalität HLaC78 40 μ M

Prozentueller Anteil der vitalen Zellen an allen HLaC78-Zellen ohne Behandlung mit Cisplatin (schwarz), nach Behandlung mit einer Cisplatin-Konzentration von 40 μ M ohne WS (grau), nach Vorbehandlung mit WStag1 (rot) und anschließender Behandlung mit einer Cisplatin-Konzentration von 40 μ M und nach Vorbehandlung mit WStag2 (blau) und anschließender Behandlung mit einer Cisplatin-Konzentration von 40 μ M, ★: $p < 0,05$ vs. ohne WS.

3.5 Expression von Markern einer epithelial-mesenchymalen Transition in Tumorzellen nach Behandlung mit Wundsekret

In der PCR wurde die Expressierung verschiedener Marker der EMT überprüft. Die Expressierung dieser Marker in der Kontrolle mit alleiniger Behandlung mit RPMI-Medium 1640 wurde als Referenzwert verwendet, zu der die Expressierung der Marker durch die Zellen nach Behandlung mit WS in Relation gesetzt wurden. Berechnet wurde diese Relation durch $2^{-\Delta\Delta C_T}$ wie in 2.12.3 erklärt.

Nach Behandlung der FaDu-Zellen mit WStag1 lag die Expressierung von Snail 1 bei 1,12, nach Behandlung mit WStag2 bei 1,06. Der Unterschied war nicht statistisch signifikant. Die relative Genexpression von Snail 2 zeigte sich nach Behandlung mit WStag1 mit 1,93 mit WStag2 mit 1,98 je statistisch signifikant erhöht (s. Abb. 3.9). Vimentin wurde nach

Behandlung mit WS_{Tag1} 2,43-fach exprimiert, nach Behandlung mit WS_{Tag2} 1,92-fach und war somit jeweils signifikant vermehrt. Die Expression von Twist war nach Behandlung mit WS_{Tag1} mit einem Faktor von 1,05 und nach Behandlung mit WS_{Tag2} mit einem Faktor von 1,06 nicht signifikant unterschiedlich. E-Cadherin wurde nach Behandlung mit WS_{Tag1} 0,75-fach, nach Behandlung mit WS_{Tag2} 0,71-fach exprimiert (s. Abb. 3.11). Die verringerte Expressierung war statistisch signifikant. Die Expression von N-Cadherin nach Behandlung mit WS_{Tag1} war 1,21-fach, nach Behandlung mit WS_{Tag2} 1,08-fach und damit nicht signifikant unterschiedlich. Die Ergebnisse von WS_{Tag1} und WS_{Tag2} wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Nach Behandlung der HLaC78-Zellen mit WS_{Tag1} wurde Snail1 1,28-fach, nach Behandlung mit WS_{Tag2} 1,44-fach und damit jeweils signifikant vermehrt exprimiert. Snail 2 wurde nach Behandlung mit WS_{Tag1} 2,08-fach, nach Behandlung mit WS_{Tag2} 2,18-fach und damit statistisch signifikant vermehrt exprimiert (s. Abb. 3.10). Vimentin wurde nach Behandlung mit WS_{Tag1} 2,82-fach und damit signifikant stärker exprimiert, nach Behandlung mit WS_{Tag2} war die relative Expressierung mit 2,13 ebenfalls signifikant erhöht. Die Genexpression von Twist war nach Behandlung mit WS_{Tag1} 1,02-fach, nach Behandlung mit WS_{Tag2} 1,22-fach und somit jeweils nicht signifikant verändert. Die Expression von E-Cadherin war nach Behandlung mit WS_{Tag1} mit 0,74 signifikant erniedrigt und nach Behandlung mit WS_{Tag2} mit 0,86 nicht signifikant verändert (s. Abb. 3.12). Die relative N-Cadherin-Expression nach Behandlung mit WS_{Tag1} lag bei 1,07, nach Behandlung mit WS_{Tag2} bei 0,84 und war nicht signifikant unterschiedlich. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Ergebnisse zwischen WS_{Tag1} und WS_{Tag2} . Eine tabellarische Auflistung der Einzelergebnisse befindet sich in der Appendix unter IV.D. Die Expressierung von N-Cadherin, Vimentin, Snail 1 und Twist ist graphisch nicht dargestellt.

PCR FaDu Snail 2

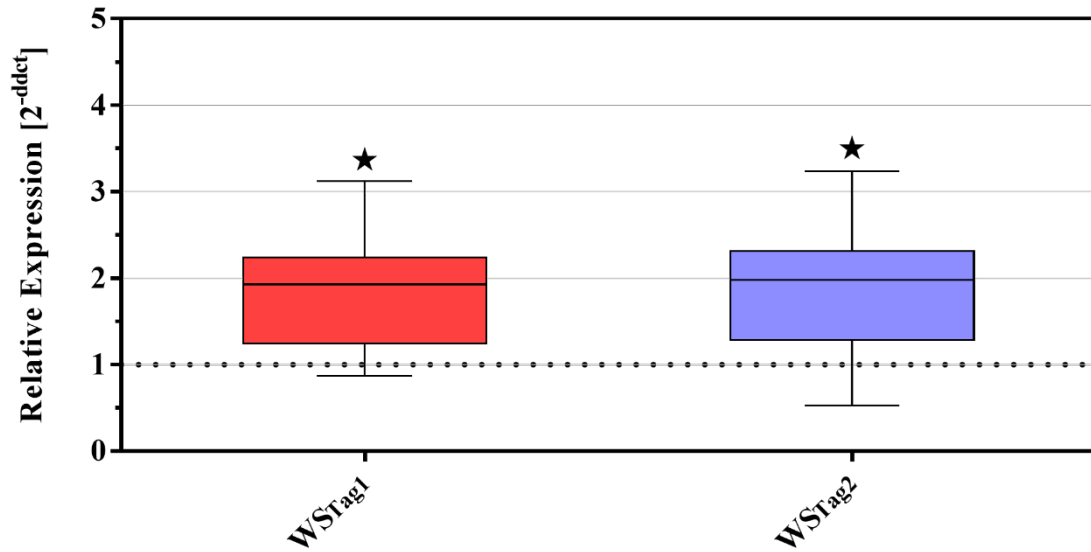


Abbildung 3.9: PCR FaDu Snail 2

2ddct (relative Exprimierung) von Snail 2 in FaDu-Zellen nach Behandlung mit WS_{Tag1} (rot) bzw. WS_{Tag2} (blau), ★: $p < 0,05$ vs. ohne WS.

PCR HLaC78 Snail 2

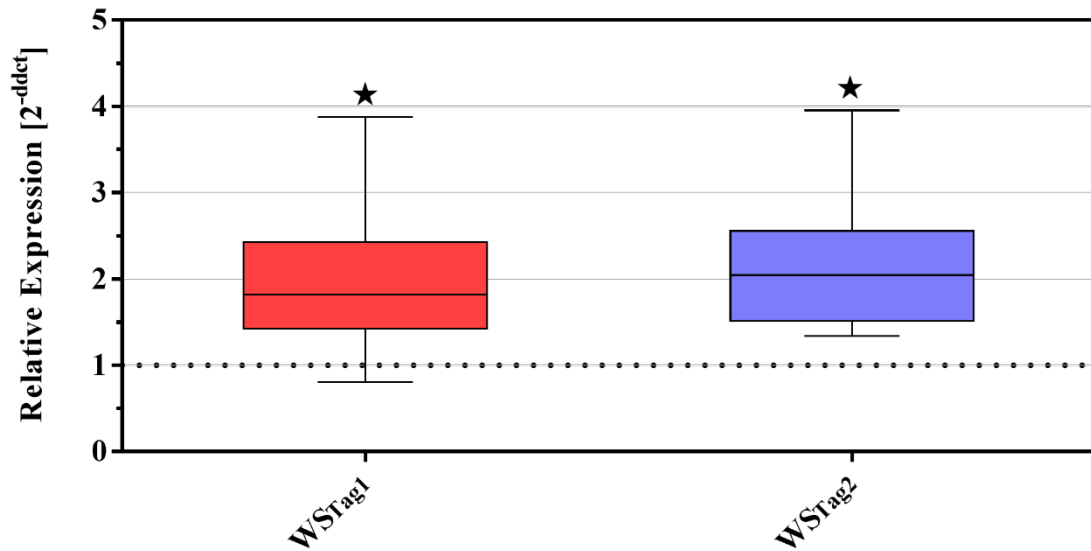


Abbildung 3.10: PCR HLaC78 Snail 2

2ddct (relative Exprimierung) von Snail 2 in HLaC78-Zellen nach Behandlung mit WS_{Tag1} (rot) bzw. WS_{Tag2} (blau), ★: $p < 0,05$ vs. ohne WS.

PCR FaDu Cadherin E

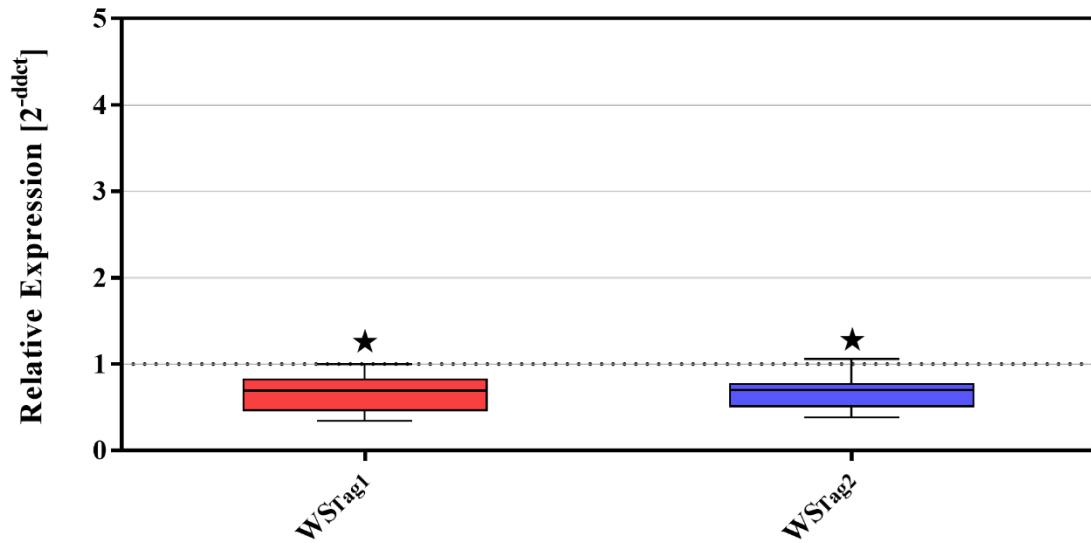


Abbildung 3.11: PCR FaDu Cadherin E

2ddct (relative Exprimierung) von Cadherin E in FaDu-Zellen nach Behandlung mit WSTag1 (rot) bzw. WSTag2 (blau), ★: $p < 0,05$ vs. ohne WS.

PCR HlaC78 Cadherin E

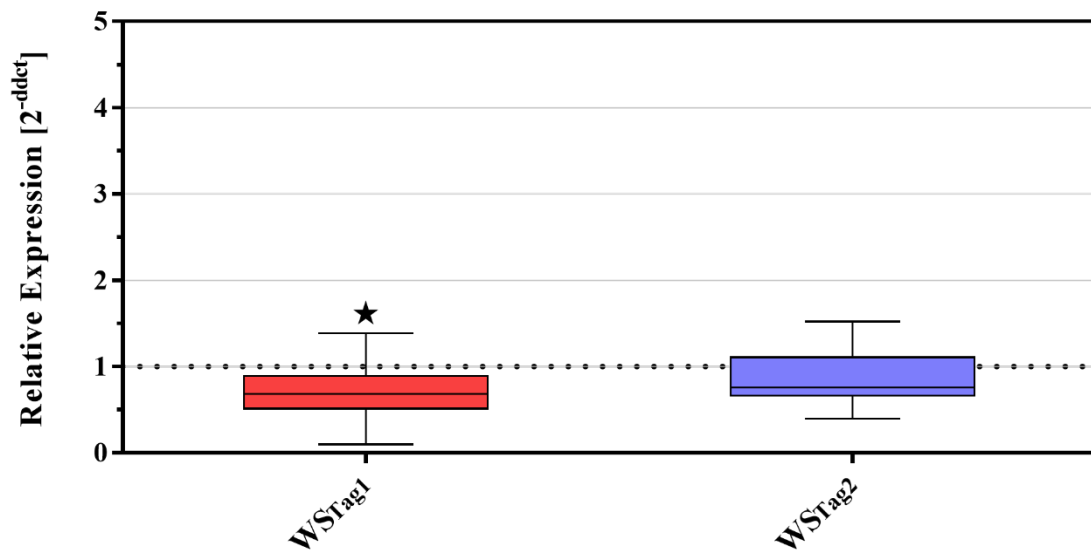


Abbildung 3.12: PCR HlaC78 Cadherin E

2ddct (relative Exprimierung) von Cadherin E in HlaC78-Zellen nach Behandlung mit WSTag1 (rot) bzw. WSTag2 (blau), ★: $p < 0,05$ vs. ohne WS.

3.6 Auswirkung des Wundsekrets auf die Migrationsneigung der Tumorzellen

FaDu-Zellen wuchsen innerhalb von 48 Stunden unter Behandlung mit reinem RPMI-Medium 1640 auf einer Fläche von 1,12 mm². Nach Behandlung mit 30 % WS_{Tag1} wuchsen die FaDu-Zellen nach 48 Stunden auf einer Fläche von 1,65 mm², nach Behandlung mit 30 % WS_{Tag2} auf einer Fläche von 2,27 mm². Die migrierte Fläche war nach Behandlung mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} jeweils signifikant erhöht (s. Abb. 3.13). HLaC78-Zellen wiesen unter Behandlung mit reinem RPMI-Medium 1640 innerhalb von 24 Stunden eine migrierte Fläche von 0,83 mm², nach Behandlung mit WS_{Tag1} von 1,70 mm² und nach Behandlung mit WS_{Tag2} von 2,22 mm² auf. Die migrierte Fläche war sowohl Behandlung mit WS_{Tag1} als auch WS_{Tag2} signifikant erhöht (s. Abb. 3.14). Ein signifikanter Unterschied zwischen WS_{Tag1} und WS_{Tag2} konnte nicht nachgewiesen werden. Eine tabellarische Auflistung der Einzelwerte findet sich in der Appendix unter IV.E.

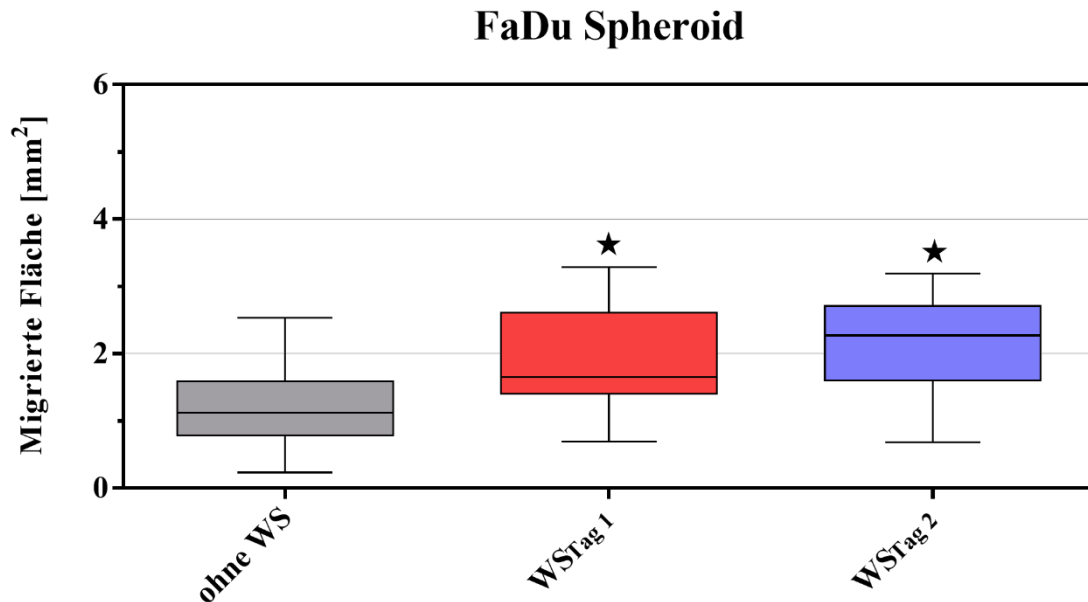


Abbildung 3.13: FaDu Spheroid

Migrierte Fläche in mm² im Spheroid-Modell nach 48 Stunden von FaDu-Zellen ohne Behandlung mit WS, nach Behandlung mit WS_{Tag1} (rot) und nach Behandlung mit WS_{Tag2} (blau), ★: p < 0,05 vs. ohne WS.

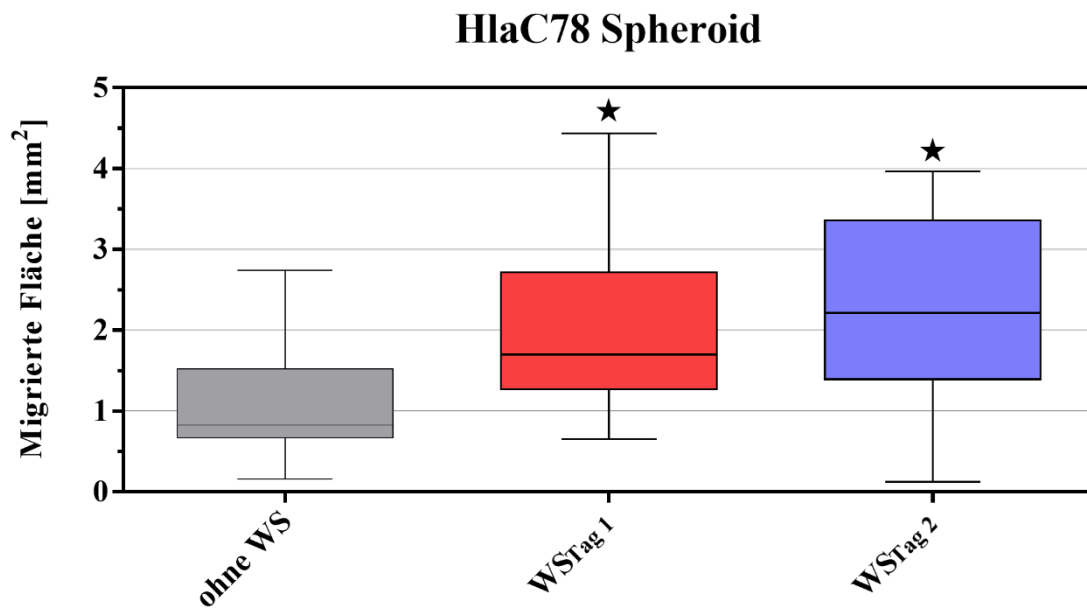


Abbildung 3.14: HLaC78 Spheroid

Migrierte Fläche in mm^2 im Spheroid-Modell nach 24 Stunden von HLaC78-Zellen ohne Behandlung mit WS, nach Behandlung mit WStag1 (rot) und nach Behandlung mit WStag2 (blau), ★: $p < 0,05$ vs. ohne WS.

3.7 Beeinflussung der Zellmorphologie der Tumorzellen durch Wundsekret

Unter dem Mikroskop wurden mit 80-facher Vergrößerung die Morphologie der Zellen und die Zellverbindungen beobachtet. Nach 24 Stunden ohne Behandlung mit WS zeigte sich ein dichter Zellverband mit basal-apikaler Polarisierung mit dichten interzellulären Verbindungen und gleichmäßig geformten Zellen (exemplarisch s. Abb. 3.15). Bei den Zellen, die über 24 Stunden mit WS behandelt worden waren, zeigte sich ein Auswandern aus dem Zellverbund, die Zellverbindungen waren nicht mehr eng, es fanden sich freie Räume zwischen den Zellen, die Zelldichte verringerte sich stark. Weiterhin konnte ein morphologischer Wandel der Zellen festgestellt werden. So waren die Zellen ungleichmäßiger geformt und bildeten spitz zulaufende Ausläufer im Sinne einer stark reduzierten Polarität der Zellen (exemplarisch s. Abb. 3.16).

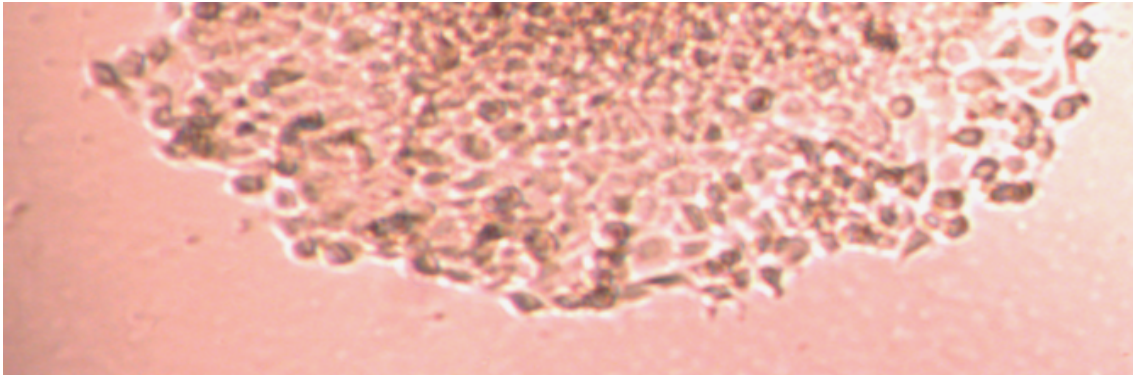


Abbildung 3.15: FaDu Zellmorphologie ohne WS

FaDu-Zellen unter 80-facher Vergrößerung in der inversen Lichtmikroskopie ohne Färbung nach 24 Stunden Behandlung mit RPMI-Medium 1640 ohne WS-Behandlung

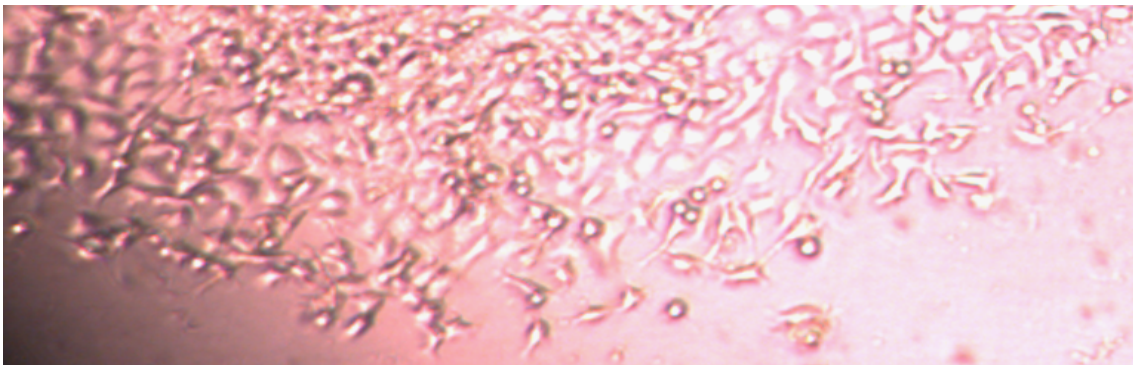


Abbildung 3.16: FaDu Zellmorphologie mit WS

FaDu-Zellen unter 80-facher Vergrößerung in der inversen Lichtmikroskopie ohne Färbung nach 24 Stunden Behandlung mit 30 % WS-RPMI-Medium 1640-Gemisch

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von WS auf Zellvermehrung, Chemoresistenzentwicklung, Zellzyklus und die Induktion einer EMT in Plattenepithelkarzinom-Zelllinien von Kopf und Hals, hier FaDu- und HlaC78-Zellen, untersucht. Zunächst wurde die Zusammensetzung des WS exemplarisch analysiert. Es zeigten sich erhöhte Zytokinlevel an IL-6, IL-8, CCL 5/RANTES, CCL 2/MCP 1 und EGF. Die Konzentrationen waren jeweils im WS_{Tag1} geringer als im WS_{Tag2} .

Im Proliferationsassay konnte in beiden Zelllinien eine gesteigerte Zellproliferation unter Behandlung mit WS nachgewiesen werden. In der Annexin-Durchflusszytometrie zeigte sich in HlaC78-Zellen ein verminderter Anteil von apoptotischen Zellen nach Cisplatin-Exposition, sofern die Zellen zuvor mit WS behandelt worden waren. In FaDu-Zellen konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. In der Propidiumjodid-

Durchflusszytometrie wurde in beiden Zelllinien keine Veränderung der Phasenverteilung des Zellzyklus nach Behandlung mit WS nachgewiesen. In der PCR ergab sich nach Behandlung mit WS sowohl in FaDu- als auch HlaC78-Zellen eine gesteigerte Expression von Snail 1, Snail 2 und Vimentin. Die Expression von E-Cadherin war jeweils reduziert, Twist und N-Cadherin wurden unverändert exprimiert. Im Spheroid-Modell zeigte sich unter WS-Behandlung eine vermehrte Neigung der Tumorzellen zum Migrieren in die Umgebung. Morphologisch konnte ein Wandel von epithelialen Charakteristika zu mesenchymalen Merkmalen gefunden werden.

Der Vergleich der Ergebnisse von WS_{Tag1} und WS_{Tag2} brachte keine signifikanten Unterschiede.

4 Diskussion

4.1 Zusammensetzung des Wundsekrets

Im Rahmen des Dotblots wurde die Zusammensetzung des Wundsekrets untersucht. Hier zeigte sich eine Erhöhung der Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen, wie sie im Rahmen der Wundheilung freigesetzt werden. Hierzu zählen IL-6, IL-8, CCL 2/MCP 1, CCL 5/RANTES, Leptin, EGF und TNF- α .

In dieser Arbeit konnte eine stark erhöhte Konzentration von IL-6 sowohl in WS_{Tag1} als auch in WS_{Tag2} nachgewiesen werden. Insgesamt war es das Zytokin mit der größten Konzentration der untersuchten Botenstoffe. Das zunächst sehr hohe Level an IL-6 fiel im WS_{Tag2} um annähernd die Hälfte gegenüber dem Level im WS_{Tag1} ab. Die Dynamik der Konzentration bzw. der Sekretion von IL-6 in Wunden wurde bereits ausführlich erforscht. So wurden beispielsweise bei Frauen, bei denen eine Mastektomie vorgenommen wurde, die Wundflüssigkeiten abgeleitet und auf ihre IL-6-Konzentration untersucht. Hier ergab sich in den Untersuchungen von Wang et al. eine zunächst sehr hohe IL-6-Konzentration am 1. postoperativen Tag, die bereits am 2. Tag auf die Hälfte gesunken war und im weiteren Verlauf weiterhin stark abfiel (Wang et al. 2015). Mateo et al. konnten im Tierversuch innerhalb der ersten 48 postoperativen Stunden eine stark erhöhte IL-6-Konzentrationen von bis zu 15×10^3 U/ml nachweisen, die im Anschluss innerhalb der folgenden 72 Stunden stark abfiel (Mateo et al. 1994). Kumagai et al. untersuchten nach Gastrektomie per Wunddrainage aus dem abdominalen Operationsgebiet abgeleitetes WS auf IL-6. In den ersten 48 Stunden stellte sich hier die IL-6-Konzentration als am höchsten heraus. Es lagen hier hohe Level vor, die innerhalb der ersten 24 Stunden um ca. 50 Prozent abfielen, um in den darauffolgenden 24 Stunden erneut stark zu sinken (Kumagai et al. 2014). Diese Beobachtungen legen nahe, dass IL-6 eines der am höchsten konzentrierten Zytokine in der initialen Phase der Wundheilung ist, was auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Ebenso ergab sich ein ähnlich schneller Abfall nach 24 Stunden.

CCL 2/MCP lag in einer hohen Konzentration sowohl im WS_{Tag1} als auch im WS_{Tag2} vor, wobei diese im WS_{Tag2} allerdings bereits absank. CCL 2/MCP ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches v. a. im Rahmen der Inflammationsphase der Wundheilung exprimiert wird und somit in der Anfangsphase nach einer Verletzung in

der höchsten Konzentration im WS gefunden werden kann. Auch in der Proliferationsphase wird es sezerniert, sodass die Konzentration erst in den ersten Tagen wieder sinkt (Ridiandries et al. 2018). Die hier gefundenen Konzentrationen stimmen also mit den vorbeschriebenen Beobachtungen überein.

CCL 5/RANTES lag im WS_{Tag1} in stark erhöhter Konzentration vor, bevor diese im WS_{Tag2} um die Hälfte niedriger war. CCL 5 ist ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, welches in der initialen Phase der Wundheilung am stärksten sezerniert wird, in den späteren Phasen der Wundheilung dann eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Ridiandries et al. 2018). Erneut bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit also die vorliegende Forschungsliteratur.

Leptin war in erhöhter relativer Konzentration im WS_{Tag1} und WS_{Tag2} vor. Auch hier war diese im WS_{Tag2} etwa halb so hoch. Leptin ist ein Zytokin mit einer Vielzahl an Funktionen. Untersuchungen über den Verlauf der Leptinkonzentration in Wunden liegen nicht vor. Leptin scheint jedoch im Rahmen von akuten Wunden vermehrt sezerniert zu werden und eine Rolle bei der Wundheilung zu spielen. (Murad et al. 2003)

Insgesamt stimmen die in dieser Arbeit nachgewiesenen Zytokin-Konzentrationen also mit denen in der Literatur überein, insbesondere im Falle des IL-6, IL-8, CCL 2 und CCL 5. In der exemplarischen Untersuchung des WS fanden sich weder an Tag 1 noch an Tag 2 stark erhöhte Konzentrationen an TNF- α , welches in bisherigen Arbeiten gefunden worden war (Henry et al. 2003; Trengove et al. 2000). Allerdings wurden von Trengove et al. die erhöhten Konzentrationen von TNF- α v. a. in chronischen, schlecht heilenden Wunden nachgewiesen, während in akuten Wunden noch geringe Level zu finden waren. Da in der vorliegenden Arbeit iatrogene Wunden ohne Hinweis auf Wundheilungsstörungen untersucht wurden, ist hier eher von einem Wundmilieu wie in einer akuten Wunde auszugehen. Somit wären die hohen Level an IL-6 und IL-8 in Kombination mit der niedrigen Konzentration an TNF- α erklärbar.

4.2 Veränderte Proliferation der Tumorzellen in Abhängigkeit von der Wundsekret-Konzentration

Unter Behandlung mit WS ergab sich eine Erhöhung der Zellzahl. Die Proliferation der Zellen war unter WS-Einfluss also verstärkt. Die größte Steigerung der Proliferation fand sich bei einer WS-Konzentration von 30 % bzw. 40 % im Gemisch mit Kulturmedium.

Segatto et al. konnten zeigen, dass WS in gesunden, nicht entarteten Zellen und auch in Tumorzellen die Teilungsaktivität erhöhen kann (Segatto et al. 2014). Hierfür seien die im WS enthaltenen Zytokine verantwortlich. Im WS des in dieser Arbeit untersuchten Patienten lagen diese in höherer Konzentration vor als in den Standard-Kulturmedien. Im Folgenden sollen die beobachteten Effekte dargestellt und diskutiert werden.

4.2.1 Einfluss von IL-6 auf die Proliferation der Tumorzellen

Unter den im WS enthaltenen Zytokinen wies IL-6 besonders hohe Konzentrationen auf und wurde in anderen Publikationen bereits als Induktor einer gesteigerten Proliferation identifiziert. Yadav et al. konnten diesen Effekt bereits bei Head and Neck Squamous Cell Carcinoma-Tumorzellen (HNSCC) nachweisen (Yadav et al. 2011). Dies scheint unter anderem an dem direkten Einfluss des IL-6 auf den Januskinasen (JAK)-Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT 3)-Signalweg zu liegen. Hier bezeichnen Heinrich et al. IL-6 als den potentesten Aktivator (Heinrich et al. 2003). Zwei IL-6-Moleküle binden an zwei IL-6-R α -Untereinheiten, woraufhin diese beiden an zwei glycoprotein (gp) 130-Untereinheiten binden und sich somit ein Hexamer bildet. Es gibt hier zwei Formen der IL-6-R α -Untereinheit. Zum einen eine membrangebundene Form, die nur auf wenigen Zellen, v. a. Lymphozyten, vorhanden ist und gp 130 über eine cis-Konfiguration bindet und zum anderen eine lösliche IL-6 R α -Untereinheit, welche die gp 130-Proteine über eine trans-Konfiguration bindet. Die membrangebundene gp 130-Untereinheit scheint ubiquitär vorzuliegen (Heinrich et al. 2003). Die aktivierte gp 130-Untereinheit induziert die Aktivierung der JAK 1, 2 und Tyrosinkinase (Tyk) 2 durch Auto- und Transphosphorylierung. Der intrazelluläre Teil, der jetzt phosphoryliert und damit aktiviert ist, dient als Andockstelle für STAT 3. STAT 3 besitzt eine Src Homology (SH 2)-Domäne, über die er nach Aktivierung durch die JAK, Dimerisierung und Transport in den Zellkern über STAT-Importine oder per Diffusion als Transkriptionsfaktor wirkt. Hierfür bindet er an Interferon (IFN)- γ aktivierte Sequenzen (GAS) (Ehret et al. 2001). Diese stellen Enhancer dar, die die Genexpression des zugehörigen Gens verstärken können. Die Wirkung des STAT 3 setzt 15-60 Minuten nach Kontakt mit dem Zytokin ein und hält über mehrere Stunden an (Subramaniam et al. 2013). Der Transkriptionsfaktor STAT 3 wird aus dem Zellkern durch das STAT 3-Exportin ausgeschleust, welches allerdings wiederum durch IL-6 gehemmt wird. Durch

diese Blockade unter IL-6-Einfluss kommt es zu einer Anhäufung von STAT 3 im Zellkern (Ehret et al. 2001; Taniguchi et al. 2014). Die vermehrte Anzahl von STAT 3-Proteinen führt zu einer direkten Aktivierung antiapoptotischer Moleküle, zu denen B-cell Lymphoma 2 (Bcl-2), Survivin und Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein (Mcl)-1 gehören. Gleichzeitig wird die Transkription apoptosefördernder Proteine wie Bax oder Bad gehemmt. Durch Hochregulierung der Cycline D1, D2 und B1 und Herabregulierung des Cyclin-dependent Kinase (Cdk)-Inhibitors p21 wird der Eintritt in den und das Durchlaufen des Zellzyklus beschleunigt, wie es Taniguchi et al. in ihrem Review darlegen (Taniguchi et al. 2014). Diese Effekte könnten eine weitere Ursache für die vermehrte Proliferation der Zellen sein. Wang et al. konnten im Rahmen ihrer Untersuchungen des Effektes von WS auf Ovarialzellkarzinomzellen einen Zusammenhang zwischen erhöhten IL-6-Konzentrationen und vermehrter Zellproliferation feststellen, der durch den oben dargelegten JAK/STAT 3-Signalweg erklärbar wäre (Wang et al. 2015). Die Literatur liefert also gute mögliche Erklärungsansätze für die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte auf die Tumorzellproliferation.

4.2.2 Einfluss von IL-8 auf die Proliferation der Tumorzellen

Ein derartiger Effekt konnte auch bei IL-8 nachgewiesen werden, dessen Konzentration in in dieser Arbeit untersuchten WS an beiden Tagen ebenfalls stark erhöht war. Von IL-8 wurde eine chemotaktische Aktivität, v. a. auf neutrophile Granulozyten, beobachtet, die im Laufe der Entzündungsphase der Wundheilung von essenzieller Bedeutung ist (David et al. 2016). IL-8 vermittelt seine Wirkung über zwei Rezeptoren, CXC-Motiv-Chemokinrezeptor (CXCR) 1 und CXCR 2, die auch IL-8-Rezeptor A und B genannt werden. Beide Rezeptortypen werden v. a. von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Mastzellen exprimiert. Nach Bindung und Aktivierung des Rezeptors scheint es zu einer intrazellulären Aktivierung des Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K)-Signalwegs und der Induzierung der Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) zu kommen (Liu et al. 2016). Über den PI3K/AKT-Signalweg wird die Transkription einiger Proteine induziert, die eine Reihe von Auswirkungen auf die Zellen haben. Hierzu zählt v. a. der Einfluss auf die Proliferation, welcher offenbar über verschiedene Mechanismen vermittelt wird. Die Glukosenutzung und -aufnahme der Zellen wird verstärkt, indem Glykogensynthase-

Kinasen (GSK 3 α und β) phosphoryliert und somit inaktiviert werden. Dadurch können sie ihren inhibierenden Effekt auf die Glykogensynthesen nicht mehr ausüben und es kommt zu einer vermehrten Glykogenproduktion und Glukoseaufnahme in die Zelle (Cheng et al. 2008). Zudem wird ein Hemmer von Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR), Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC 2), gehemmt, was dessen Aktivität erhöht. mTOR ist ein wichtiger Regulator der Protein-Translation. Durch vermehrte Aktivität werden Proteine verstärkt produziert, was eine Proliferation der Zellen vereinfacht (Karar et al. 2011). Des Weiteren bewirkt die Proteinkinase AKT (auch Proteinkinase B genannt) eine geringere Sensitivität von Tumorzellen auf wachstumshemmende Signale, indem es Cyclin D 1 stabilisiert und p21 und p27 antagonisiert (Cheng et al. 2008). Ein weiterer Mechanismus, der die Proliferation von Tumorzellen steigern kann, ist die AKT-vermittelte Apoptose-Verhinderung durch vermehrte Produktion antiapoptotisch wirksamer Proteine wie Bcl-2 oder Bcl-xL (Cheng et al. 2008). AKT scheint auch Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B-cells (NF- κ B) zu induzieren, welches wiederum die Translation pro-proliferativer Proteine verstärkt (Liu et al. 2016). Ein zusätzlicher Effekt von AKT ist die Aktivitätssteigerung der humanen Telomerase (hTERT), was den natürlichen Untergang durch Apoptose von Zellen nach Verbrauch der Telomere verhindert (Cheng et al. 2008). Liu et al. beschreiben in ihrem Review, wie über den MAPK-Signalweg eine Phosphorylierung von Erk 1/2 verursacht wird, welches eine vermehrte Produktion von proliferationsfördernden Proteinen bewirkt (Cheng et al. 2008; Liu et al. 2016). Einen weiteren möglichen Mechanismus der Proliferationssteigerung durch eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors beschreiben Luppi et al.. Über eine durch IL-8 bewirkte Transaktivierung werde der EGF-Rezeptor phosphoryliert und könne somit seine Downstream-Signalwege in Gang setzen, die in vermehrter MAPK-Aktivität resultieren und eine Steigerung der Proliferation bewirken (Luppi et al. 2007).

4.2.3 Einfluss von CCL 5/RANTES auf die Proliferation der Tumorzellen

Auch CCL 5/RANTES ist ein Enzym, das im untersuchten WS der vorliegenden Arbeit eine gesteigerte Konzentration aufwies. Wang et al. konnten einen positiven Einfluss auf die Proliferationsrate von Osteosarkom-Zellen zeigen (Wang et al. 2012). CC-Chemokinligand 5 (CCL 5) ist ein Botenstoff, der im Rahmen von

Entzündungsreaktionen eine chemotaktische Wirkung aufweist. Es kommt zur Attraktion von Entzündungszellen wie neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen (Maghazachi et al. 1996). Die Wirkung von CCL 5/RANTES wird über den CCL 5-Rezeptor vermittelt. Hierbei kommt es offenbar wie bei IL-8 zur Aktivierung von mTOR (Gao et al. 2013) und des PI3K/Akt-Signalwegs (Huang et al. 2009). mTOR wirkt als Transkriptionsfaktor und scheint für eine gesteigerte Transkription von Cyclin D1, c-Myelocytomatosis (c-Myc) und Dolichyl-Diphosphooligosaccharide-Protein Glycosyltransferase Subunit 1 (Dad-1) zu sorgen und somit die Zellproliferation zu steigern (Murooka et al. 2009). In den Zellen bewirkt mTOR eine vermehrte Glukoseaufnahme, gesteigerte Glykolyse und eine vermehrte Produktion von Adenosintriphosphat (ATP), wodurch der Energieumsatz der Zelle gesteigert wird (Edinger et al. 2002; Gao et al. 2013). CCL 5 ist ebenfalls in der Lage, über eine NF- κ B-Aktivierung die Transkription proliferationsfördernder Proteine zu induzieren und kann somit auch direkt pro-proliferativ wirken (Sun 2009), was ein Erklärungsansatz für die Proliferationssteigerung durch das WS sein könnte.

4.2.4 Einfluss von CCL 2/MCP 1 auf die Proliferation der Tumorzellen

Neben den in 4.2.1 – 4.2.3 diskutierten Zytokinen wies auch CCL 2/MCP im WS des einen in dieser Arbeit untersuchten Patienten eine erhöhte relative Konzentration auf. CCL 2/MCP 1 ist ein Zytokin, das im Rahmen von Entzündungsprozessen und der Wundheilung einen chemotaktischen Faktor zur Attraktion von Makrophagen darstellt (Loberg et al. 2006). Seine Wirkung vermittelt CCL 2/MCP 1 über den CCL 2-Rezeptor CCR 2 (Hao et al. 2020). Ji et al. konnten zeigen, dass CCL 2/MCP 1 über den PI3K/Akt-Signalweg und die vermehrte Expressierung von proproliferativen Proteinen die Proliferation von Tumorzellen von Hals und Kopf steigern kann (Ji et al. 2014). Lee et al. haben eine Steigerung des Zellüberlebens und der Proliferation durch CCL 2/CMP beobachtet (Lee et al. 2015). Ähnlich wie CCL 5/RANTES kann CCL 2/MCP 1 den Regulationsfaktor mTOR aktivieren und dessen Wirkung als Transkriptionsfaktor, wie in 4.2.3 beschrieben, vermitteln (Murooka et al. 2009). Außerdem konnte eine Heraufregulierung von Survivin, einem apoptosehemmenden Protein, und eine Herabregulierung der Autophagosom-Bildung beobachtet werden, was ein vermehrtes Zellüberleben bewirkte (Lee et al. 2015). All diese Beobachtungen stimmen somit mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen überein.

4.2.5 Einfluss von Leptin auf die Proliferation der Tumorzellen

Leptin wurde im WS in erhöhter relativer Konzentration nachgewiesen. Leptin ist ein vielseitiges Zytokin, dessen Rezeptoren sowohl zentral als auch im peripheren Gewebe vorkommen. Seine Hauptwirkung liegt im Bereich der Energiehomöostase und der Appetitregulation, wie Kelesidis et al. in ihrem Review erläutern (Kelesidis et al. 2010). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Leptin zudem eine wichtige Rolle in der Wundheilung zukommt, indem es Fibroblasten und die Angiogenese stimuliert und die Zellproliferation steigert (Murad et al. 2003; Tokuyama-Toda et al. 2016). Seine Wirkung vermittelt Leptin über den Leptinrezeptor, der wiederum mehrere intrazelluläre Signalwege in Gang setzen kann. Die zwei wichtigsten Signalwege scheinen hier der JAK-STAT- und der PI3K-MAPK-Akt-Weg zu sein, die über Apoptosehemmung und vermehrte Expression von pro-proliferativen Proteinen eine Steigerung der Zellproliferation bewirken können (Kelesidis et al. 2010). Diese wurden unter 4.2.1 und 4.2.2 bereits diskutiert.

4.3 Induktion einer Chemoresistenz der Tumorzellen gegenüber Cisplatin durch Wundsekret

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte unter Behandlung mit WS keine vermehrte Resistenz von Tumorzellen gegen das Standard-Chemotherapeutikum Paclitaxel nachgewiesen werden (Scherzed et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Auswirkung des WS auf die Sensibilität gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin, das ebenfalls zu den Standardschemata gehört, getestet werden. Unter Behandlung mit WS ergab sich bei den vorliegenden Tumorzellen unter anschließender Behandlung mit Cisplatin bei lokal wirksamen Konzentrationen von 40 – 60 μmol keine statistisch signifikant größere Vitalität als bei Zellen, die nicht mit WS behandelt worden waren. Zunächst sollen in diesem Kapitel der Wirkmechanismus von Cisplatin erläutert und im Anschluss verschiedene Mechanismen der Resistenzbildung gegenüber Cisplatin diskutiert werden (Hsu et al. 2010; Kaufhold et al. 2014; Wheelock et al. 2008).

4.3.1 Cisplatin und seine Wirkweise

Cisplatin ist ein Zytostatikum und Standardtherapeutikum in der Therapie von HNSCC-Tumoren, welches seine Wirkung hauptsächlich über die Auslösung einer Apoptose von Zellen sich schnell teilender Zellen ausübt, wie Dasari et al. es in ihrem Review beschreiben (Dasari et al. 2014). Nach intravenöser Verabreichung diffundiert es passiv über die Zellmembran und bildet dort reaktive Komplexe in Form von Aquaplatin-Komplexen. Diese können nun kovalent an beliebige Basen der DNA binden, Cisplatin-DNA-Addukte bilden und zu Quervernetzungen des DNA-Stranges führen und die Zellteilung hemmen (Ott et al. 2006). Die Aktivierung der Apoptose erfolgt anschließend auf verschiedenen Wegen. So können die DNA-Quervernetzungen zu Verdrehungen und Verformungen führen, welche verschiedene intrazelluläre Proteine wie p53 oder MAPK aktivieren und über verschiedene Signalwege letztlich eine Apoptose der Zelle auslösen (Siddik 2003). Weitere Wirkmechanismen von Cisplatin sind direkter oxidativer Stress durch vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen unter Cisplatin-Einfluss, die wiederum über DNA-Schädigung eine Apoptoseeinleitung bewirken können (Dasari et al. 2014) oder ein von Pabla et al. beschriebener Zellzyklusarrest, der die Zellvermehrung verhindert (Pabla et al. 2008).

4.3.2 Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Cisplatin

Im WS, das in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, sind u. a. IL-6, IL-8, CCL 2/MCP 1, CCL 5/RANTES, Leptin und EGF in hohen relativen Konzentrationen vorhanden. In der PCR konnte eine signifikant gesteigerte Expression von Snail 1 und Snail 2 in HLaC78-Zellen nachgewiesen werden. Snail 1 ist ein Signalprotein mit Zinkfinger-Domäne und wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert (Kaufhold et al. 2014). Es wird u. a. direkt durch STAT 3 aktiviert, welches wiederum durch mehrere Zytokine aktiviert werden kann. Somit könnte es diese Wirkung auf die Tumorzellen *in vitro* vermitteln. Wie in 4.2.1 beschrieben ist STAT 3 ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription verschiedener Proteine reguliert. Zum einen verstärkt STAT 3 direkt die Transkription von Snail 1, zum anderen aktiviert es auch den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der seinerseits einen Snail 1-Promoter bindet und dessen Aktivierung bewirkt (Yu et al. 2009). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte eine

starke Induktion der STAT 3-Expression nachgewiesen worden, die u. a. auf eine starke IL-6-Konzentration im WS zurückzuführen sein könnte, durch die es wohl über eine starke Aktivierung von Snail 1 zur STAT 3-Induktion kommt (Scherzad et al. 2019). Zusätzlich wird NF- κ B wohl auch durch das im in der vorliegenden Arbeit untersuchten WS in erhöhter Konzentration vorliegende CCL 5/RANTES aktiviert (Hsu et al. 2010). Dies wird über den PI3K/Akt-Signalweg vermittelt (Sun 2009). Hsu et al. beschreiben, dass Snail 1 nun das DNA-Reparatur-Protein Excision Repair Cross Complementation Group 1 (ERCC 1) über Bindung an dessen Promoter induziert. ERCC scheint in der Lage zu sein, Platin-induzierte DNA-Addukte über Nukleotid-Exzision wieder zu entfernen. Diese Addukte lösen offenbar in Zellen ohne ERCC-Aktivität eine Apoptose aus und sorgen somit für das Absterben der Zelle, wobei der genaue Mechanismus der ERCC-Wirkung noch nicht verstanden ist. Unter ERCC-Aktivität kann es zu einer verminderten Rate an Apoptosen unter den Tumorzellen kommen, was eine Erklärung für die verminderte Wirkung von Cisplatin gegenüber Zellen sein kann, die zuvor mit WS behandelt worden waren (Hsu et al. 2010). In Ovarialzellkarzinom-Zelllinien konnten Haslehurst et al. eine Korrelation einer erhöhten Snail 1- und Snail 2-Expression mit einer Cisplatin-Resistenz nachweisen (Haslehurst et al. 2012). Kurrey et al. konnten belegen, dass erhöhtes Snail 1 und Snail 2 in Ovarialzellkarzinom-Zellen zur Induktion einer Chemoresistenz führte, indem eine p53-vermittelte Apoptose verhindert wurde (Kurrey et al. 2009).

Es gibt weitere Faktoren, die für das schlechtere Ansprechen auf Cisplatin verantwortlich sein könnten. Die bereits zuvor beschriebene Hemmung der Apoptosen durch die im WS enthaltenen Zytokine könnte auch die durch Cisplatin induzierten Apoptosen verhindern. So sorgt IL-6 laut Guo et al. und Taniguchi et al. für eine direkte Aktivierung antiapoptotischer Moleküle wie Bcl-2, Survivin und Mcl-1 und gleichzeitig für die Hemmung der Transkription Apoptose-auslösender Proteine wie Bax oder Bad, was mit einer vermehrten Chemoresistenz, u. a. auch gegen Cisplatin in Verbindung gebracht werden konnte (Guo et al. 2012; Taniguchi et al. 2014). Ebenso bewirkt wohl auch STAT 3 eine Induktion der Transkription von Apoptosehemmern wie Bcl-2, Survivin, Mcl-1 und X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) und eine Hemmung der Transkription von Apoptose-auslösenden Proteinen wie Bax und Bad (Taniguchi et al. 2014). Hier ist auch ein weiterer potenzieller Angriffsort des STAT 3 besonders wichtig.

STAT 3 scheint direkt am p53-Promoter dessen Transkriptionsrate zu hemmen kann somit dessen Apoptose-auslösende Wirkung unterbinden (Niu et al. 2005). In ösophagealen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien konnte eine IL-6-induzierte Resistenz gegenüber Cisplatin über die STAT 3-, PI3K-Akt- und Ras-MEK-Signalwege über die vermehrte Expression antiapoptotischer Proteine gezeigt werden (Suchi et al. 2011). CCL 2/MCP 1 nimmt anscheinend über den PI3K-Akt-Snail-Pfadweg ebenfalls auf das Apoptose-System Einfluss. So konnten Ji et al. zeigen, dass es in HNSCC-Tumorzellen zu einer Heraufregulierung von Survivin und einer Herabregulierung der Autophagosom-Bildung kommt (Ji et al. 2014).

Leptin scheint über die oben beschriebenen JAK/STAT 3- und PI3k-Akt-Signalweg ebenfalls eine direkte antiapoptotische Wirkung über die Induktion apoptosehemmender Proteine und über die Aktivierung von NF- κ B zu entfalten (Gorrab et al. 2021). In Mammakarzinomzelllinien konnte eine reduzierte zytotoxische Wirkung von Cisplatin unter Leptinbehandlung nachgewiesen werden, die von McGlothen et al. u.a. auf den JAK/STAT 3-Signalweg zurückgeführt wurde (McGlothen et al. 2011).

All diese Mechanismen könnten die Apoptoserate in den Zellen und somit auch die Wirkung des Cisplatins reduzieren, welches über die Induktion einer Apoptose seine Wirkung ausübt.

In der vorliegenden Arbeit konnte lediglich in HlaC78-Zellen eine verminderte Effektivität der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin auf die Tumorzellen unter WS-Behandlung in bestimmten Konzentrationen gezeigt werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die geringe Versuchszahl sein. Die Ergebnisse wiesen eine große Spannbreite auf. Die statistisch signifikant erhöhte Expression von Snail 2 spricht jedoch für eine ablaufende Entwicklung einer Chemoresistenz. Hier wären weitergehende Untersuchungen möglich, um bspw. längere Zeiträume der WS-Behandlung zu erforschen oder die Versuche mit höherer Versuchszahl zu wiederholen, um eine mögliche Resistenzentwicklung gegen Cisplatin festzustellen.

4.4 Auswirkungen des Wundsekrets auf den Zellzyklus der Tumorzellen

Die Phasenverteilung des Zellzyklus bei Tumorzellen, die mit WS behandelt worden waren, wies in den durchgeführten Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied zu

den Tumorzellen auf, die nicht mit WS behandelt worden waren. Zudem wiesen die beiden Tumorzelllinien unterschiedliche Tendenzen auf. HLaC78-Zellen zeigten nach 24 Stunden Behandlung sowohl mit WS_{Tag1} als auch mit WS_{Tag2} einen Anstieg des Anteils der Zellen in der G1-Phase und Abnahme des G2/M-Phasen-Anteils gegenüber unbehandelten Zellen. Nach 24 Stunden Behandlung mit sowohl mit WS_{Tag1} als auch mit WS_{Tag2} lag der Anteil von FaDu-Zellen in der G1-Phase unter dem Anteil bei Zellen ohne Behandlung. Die G2/M-Phase hatte jeweils einen höheren Anteil als unter den unbehandelten Zellen. Wie in 4.3.2 beschrieben können sowohl IL-6, IL-8 und CCL 2, als auch CCL 5 und Leptin die Transkription von proliferativen Proteinen steigern (Bromberg et al. 1999; Gao et al. 2013; Gorrab et al. 2021; Liu et al. 2016). Zu diesen gehören unter anderem die Cycline D1 und D2 (Liu et al. 2016; Vega et al. 2004), welche eine Schlüsselrolle im Progress des Zellzyklus von der G1- zur S-Phase spielen und diesen beschleunigen. Gleichzeitig konnte von Snail 1 ein hemmender Effekt auf Cyclin D2 nachgewiesen werden, wodurch Snail einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase induzieren kann (Vega et al. 2004). Snail 1 kann u. a. durch IL-6 induziert werden (Huang et al. 2009), wodurch IL-6 sowohl einen hemmenden als auch einen fördernden Einfluss auf die G1-S-Phasen-Progression aufweist. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die kaum veränderten Zusammensetzungen der Phasen des Zellzyklus sein.

4.5 Verstärkte Migration der Tumorzellen in die Umgebung nach Wundsekret-Behandlung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen beider Zelllinien *in vitro* unter Behandlung mit WS im Spheroid-Modell stärker aus dem zentralen Zellhaufen in die Umgebung auswuchsen. Es kam zu einer starken Vergrößerung des Abstandes zum Ausgangspunkt. Die Zellen wiesen also eine stärkere Motilität auf als unbehandelte Zellen. Dies könnte mit einer vermehrten Invasivität und Mobilität der Zellen begründet werden, welche sich durch die im WS enthaltenen Zytokine erklären lassen kann. Durch eine verminderte Expressierung von E-Cadherin und vermehrte Expressierung von N-Cadherin und Vimentin scheinen die Zellen die starren Verbindungen untereinander zu verlieren, die einen epithelialen Zellverbund ausmachen (Leggett et al. 2016). Somit können sie besser in die Umgebung wandern. Laut Wheelock kann bereits eine geringe Steigerung der N-Cadherin-Expressierung eine gesteigerte

Motilität verursachen, auch wenn E-Cadherin noch nicht signifikant erniedrigt ist (Wheelock et al. 2008). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von N-Cadherin in Tumorzellen aus nasopharyngealen Plattenepithelkarzinomen mit einer erhöhten Rate an lokaler Metastasierung in Lymphknoten und mit einer schlechteren Prognose der betroffenen Patientinnen und Patienten korreliert (Sun et al. 2017). Ähnliche Ergebnisse wurden auch im Falle von Plattenepithelkarzinomen der Zervix gefunden (Jiang et al. 2019).

Zusätzliche Erklärungsansätze für eine verstärkte Invasivität und ein Einwachsen der Zellen in die Umgebung könnten weitere Wirkungen der im WS enthaltenen Zytokine sein. Hierbei spielen v. a. IL-6, CCL 2/MCP 1, CCL 5/RANTES und Leptin eine Rolle, die im Dotplot des WS_{Tag1} und WS_{Tag2} in stark erhöhter relativer Konzentration nachgewiesen werden konnten.

So konnten Ling et al. zeigen, dass CCL 2/MCP 1 die Zellmotilität in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle verstärkt und somit deren lokale Invasivität erhöhen kann (Ling et al. 2019). Eine weitere Studie ergab, dass CCL 2/MCP 1 über eine Aktivierung des ERK 1/2-MMP 2/9-Signalwegs in Tumorzellen von Kopf und Hals eine gesteigerte Zellinvasivität bewirken kann und die gesteigerte Aktivität des CCL 2 mit einer verschlechterten Prognose der Patientinnen und Patienten einhergeht. Yang et al. erklären, dass die Matrix-Metalloproteasen für den Abbau der Extrazellulärmatrix verantwortlich sind und den Tumorzellen so erlauben, sich stärker in die Umgebung auszubreiten (Yang et al. 2016). In Prostatakarzinomzellen wurde eine vermehrte Motilität beobachtet, die durch CCL 2/MCP 1 induziert wird. So kommt es offenbar zu einer Induktion der ras Homolog Gene Family Member c (RhoC)-GTPase, die Zellinvasion und gerichtete Zellmobilität fördern kann, indem es eine Aktin-Umorganisation und die Bildung von Filopodien bewirkt (van Golen et al. 2008).

Auch von CCL 5/RANTES wurde beobachtet, dass es über den PI3K-Signalweg die Invasivität und Proliferation von Zellen erhöhen kann, indem es NF- κ B aktiviert und Integrine hochreguliert, was die Tumormigration zu vereinfachen scheint. Es kommt zu einer Ausbildung einer Zellpolarisation, die Tumorzellen beginnen eine vermehrte Aktinproliferation und F-Aktin-Formation. Schlussendlich wird die Zellmigration offenbar direkt durch eine Actinomyosin-Kontraktion und gleichzeitiges Nachziehen des hinteren Zellendes ermöglicht (Aldinucci et al. 2014).

Durch CCL 5 kann es ebenfalls zu einer vermehrten Sekretion der Matrix-Metalloproteasen MMP 2 und 9 kommen, wodurch die Fähigkeit zur Degeneration der Extrazellulärmatrix verbessert werden könnte. In Lungenkarzinom-Zelllinien konnte eine gesteigerte Migrationsfähigkeit der Zellen unter CCL 5-Wirkung nachgewiesen werden (Huang et al. 2009).

IL-6, das unter den getesteten Zytokinen im WS in der größten Konzentration nachgewiesen wurde, ist über den JAK-STAT 3-Signalweg in der Lage, die Transkription der MMP 2, 7 und 9 zu aktivieren und so wie oben beschrieben eine Invasion in die umgebende Extrazellulärmatrix zu ermöglichen. In Melanomzellen beispielsweise konnte eine Induktion einer Metastasierungsfähigkeit über diese vermehrte MMP-Transkription nachgewiesen werden (Xie et al. 2004).

Dem Zytokin Leptin konnte ebenfalls eine Steigerung der Migrationsfähigkeit von Tumorzellen nachgewiesen werden. Gorrab et al. beschrieben den JAK/STAT 3-Signalweg als möglichen Auslöser der vermehrten Migration von Prostatakarzinomzelllinien nach Leptinbehandlung (Gorrab et al. 2021).

4.6 Induktion einer epithelial-mesenchymalen Transition in Tumorzellen durch Wundsekret

Zur Untersuchung einer möglichen Induktion einer EMT wurden PCR und lichtmikroskopische Bilder verwendet.

In der PCR wurde in der vorliegenden Arbeit die Transkription verschiedener Proteine untersucht, die im Laufe einer EMT unterschiedlich stark exprimiert werden. Es wurden einerseits Proteine ausgewählt, die im Laufe möglicher Signalwege im Rahmen der EMT aktiviert werden, und andererseits Proteine, welche am Anfang und am Ende dieser Signalkaskaden stehen und charakteristische Ausgangs- und Endpunkte einer EMT darstellen können, nämlich charakteristische mesenchymale und epitheliale Marker (Scanlon et al. 2013). Als Proteine der involvierten Signalwege wurden Snail 1 und Twist ausgewählt. Diese beiden Signalproteine sind Teil des JAK/STAT 3-Signalwegs, einem der wichtigsten Signalwege im Prozess der EMT, der bereits für HNSCC-Tumoren beschrieben wurde (Yadav et al. 2011). Als Marker des epithelialen Zellstatus wurde E-Cadherin ausgewählt, als mesenchymale Marker N-Cadherin und Vimentin. Diese gehören zu den wichtigsten eine EMT definierenden Markern (Kalluri et al. 2009). Bei

Betrachtung dieser Marker nach Behandlung mit WS fällt auf, dass es zu einer vermehrten Expressierung v. a. von Snail 1 und des mesenchymalen Markers Vimentin kommt, wohingegen der epitheliale Marker E-Cadherin vermindert exprimiert wird. Für diese Veränderung gibt es in der Literatur mehrere Erklärungsansätze, die im Folgenden erörtert werden.

4.6.1 Einfluss von IL-6 auf die Induktion einer EMT in Tumorzellen

IL-6 lag sowohl im WS_{Tag1} als auch im WS_{Tag2} in stark erhöhter Konzentration vor. In der PCR konnte eine starke Zunahme von Vimentin und N-Cadherin bei gleichzeitig reduzierter Expressierung von E-Cadherin nachgewiesen werden. Dieser Prozess wird Cadherin-Switch genannt und ist einer der wichtigsten und ersten Schritte der EMT (Loh et al. 2019). Wie von Yu et al. untersucht, ist ein möglicher Grund hierfür die Hochregulierung des STAT 3-Signalwegs über IL-6. Über diesen werden verschiedene Signalwege in Gang gesetzt, in denen Snail und Twist eine wichtige Rolle spielen. STAT 3 interagiert mit dem NF- κ B-Transkriptionsfaktor und kann diesen dauerhaft aktivieren. Laut Yu et al. kann NF- κ B an einen Snail 1-Promoter binden, wodurch offenbar dessen Transkription hochreguliert wird (Yu et al. 2009).

Snail 1 ist ein Protein der Snail-Gruppe, die ihre Effekte als Transkriptionsfaktoren über Zinkfinger-Domänen vermitteln. Es scheint eine essenzielle Rolle im Prozess der EMT zu spielen. So bewirkt es anscheinend eine starke Unterdrückung der E-Cadherin- und Claudin-Transkription, zweier wichtiger epithelialer Marker, die für Zell-Zell-Verbindungen verantwortlich sind (Kaufhold et al. 2014; Wheelock et al. 2008). E-Cadherin ist ein Transmembran-Glykoprotein zur Calcium-abhängigen Zell-Zell-Adhäsion. Bei normalem Vorhandensein und normaler Funktion sorgt es für eine geringere Invasivität und Migration von Zellen und stärkt die Stabilität des Zellverbundes, so erklären es van Roy et al. in ihrem Review (van Roy et al. 2008). Ein Verlust des E-Cadherin kann somit eine vermehrte Invasivität verursachen und korreliert überdies mit reduzierten Überlebensraten bei Tumorpatientinnen und -Patienten mit HNSCC-Tumoren (Gao et al. 2016). Es konnte durch Yokoyama et al. gezeigt werden, dass in Mundboden-Karzinomen Snail 1 und E-Cadherin invers miteinander und gesteigerte Level an Snail 1 mit einer höheren Aggressivität und Invasivität des Tumors korrelieren (Yin et al. 2001).

Zusätzlich induziert Snail 1 wohl die Expression von mesenchymalen Markern wie Vimentin und N-Cadherin (Cano et al. 2000). Vimentin ist ein Intermediärfilament in mesenchymalen Zellen, weshalb sein Vorkommen für die Entwicklung eines mesenchymalen Phänotyps spricht (Yang et al. 2008). Auch eine Hochregulierung von Vimentin korreliert mit einer schlechteren Prognose bei Tumorpatientinnen und -Patienten, denn sie kann eine erhöhte Migration und vermehrte Invasivität der Tumorzellen bewirken (Lang et al. 2002). N-Cadherin ist ein Transmembran-Glykoprotein in mesenchymalen Zellen, welches eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Adhäsion, Migration und Invasion von Tumorzellen spielt und neben E-Cadherin als ein wichtiger Marker der EMT gilt (Loh et al. 2019). Vermehrte N-Cadherin-Expression kann eine beschleunigte Migration und Invasion der Tumorzellen bewirken. Dies resultiert scheinbar aus der Fähigkeit des N-Cadherins, an Stromazellen zu binden und somit den Kontakt zu umgebenden nicht-tumorösen Zellen herzustellen, wie Christofori in seinem Review beschreibt (Christofori 2006). Zudem kommt es zu einer Aktivierung von Co-Repressoren wie ZEB-1, welche die Transkription von E-Cadherin weiter reprimieren und eine vermehrte Invasivität der Zellen verursachen können (Comijn et al. 2001). Ein weiterer Erklärungsansatz für die Herabregulierung von E-Cadherin ist der Twist-Signalweg, der u. a. durch STAT 3 in Gang gesetzt wird und in Mammakarzinomzelllinien beobachtet wurde (Vesuna et al. 2008). Von Twist konnte gezeigt werden, dass dieser Transkriptionsfaktor über Bindung an den E-Cadherin-Promoter einen Verlust von E-Cadherin bewirken und gleichzeitig mesenchymale Marker wie Vimentin und N-Cadherin induzieren und somit die Zellmotilität erhöhen kann (Yang et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit war allerdings keine erhöhte Expression von Twist nachweisbar, sodass dieser Signalweg für die beobachteten Effekte nicht verantwortlich sein dürfte.

4.6.2 Einfluss von CCL 2/MCP 1 auf die Induktion einer EMT in Tumorzellen

CCL 2/MCP 1 lag sowohl im WS_{Tag1} als auch im WS_{Tag2} in erhöhten Konzentrationen vor. In einer Studie konnte von CCL 2/MCP 1 gezeigt werden, dass es über den PI3K/AKT/Snail-Pfadweg einen EMT-ähnlichen Phänotyp induzieren kann, indem es E-Cadherin reprimiert und die Vimentin-Transkription induziert (Ling et al. 2019). Unter

Knockdown von MCP 1 wurde der Prozess der EMT blockiert. CCL 2/MCP 1 wirkt somit synergistisch mit IL-6 in Richtung einer EMT. In Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals wurde eine vermehrte Metastasierungsfähigkeit unter MCP 1-Einwirkung nachgewiesen, die mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Lee et al. 2015). Als weiterer Wirkmechanismus von MCP 1 wurde durch Lee et al. eine Aktivierung des bereits beschriebenen Transkriptionsfaktors Snail 1 beobachtet, welche zu einer EMT-artigen Veränderung führen kann. Es kam offenbar zu einer Hochregulierung von Fibronectin und einer Reprimierung des epithelialen Markers E-Cadherin. Ebenfalls kam es zu einer Aktivierung von STAT 3, was über denselben Signalweg eine weitere Induktion einer EMT bewirken kann (Lee et al. 2012; Lee et al. 2015). Ein weiterer Hinweis auf eine durch MCP 1 induzierte EMT ist im Rahmen der Behandlung von Prostatakarzinomzellen aufgefallen. Es kam hier anscheinend zu einer Aktivierung der Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1(Rac)-GTPase, welche morphologische Veränderungen der Zellen bewirkt und zur Ausbildung von Pseudopodien führen kann. Diese Effekte ermöglichen es den Zellen zusätzlich, per Diapedese durch das Endothel zu wandern und somit nach Anschluss an das Lymph- bzw. Blutssystem im Organ der Metastasierung durch das Endothel auszuwandern (van Golen et al. 2008). Somit wären diese Signalwege ein weiterer möglicher Ansatz, die in dieser Arbeit nachgewiesene signifikant verminderte Expression von E-Cadherin und vermehrte Expression von Vimentin zu erklären.

4.6.3 Einfluss von IL-8 auf die Induktion einer EMT in Tumorzellen

Auch IL-8 lag im WS jeweils in erhöhten Konzentrationen vor. IL-8 übt seinen Einfluss auf die Entstehung einer EMT v. a. über den PI3K/Akt-Signalweg aus (Li et al. 2012). So kann Akt eine Aktivierung von Snail bewirken, welches die Expression von E-Cadherin reprimieren und die Expression von Vimentin verstärken kann. Somit bewirkte IL-8 in bisherigen Versuchen einen partiellen Wandel vom epithelialen zum mesenchymalen Status, was als EMT-artiger Prozess beschrieben wurde (Leroy und Mostov 2007). Des Weiteren zeigte sich laut Cheng et al. in Untersuchungen eine vermehrte Induktion eines mesenchymalen Phänotyps in Tumorzellen (Cheng et al. 2014; Grille et al. 2003). Insgesamt ist IL-8 ein möglicher unterstützender Faktor zur Erklärung der gefundenen signifikanten E-Cadherin-Suppression und Vimentin-Induktion.

4.6.4 Einfluss von CCL 5/RANTES auf die Induktion einer EMT in Tumorzellen

Neben den in 4.2.3 beschriebenen Effekten des im WS erhöhten CCL 5 spielt es auch eine wichtige Rolle in der Entstehung einer EMT. So wurde in Lungenkarzinomzellen eine Aktivierung des ERK-Signalwegs über den CCR 4-Rezeptor beschrieben. Es kam zu einer bereits beschriebenen Verminderung von E-Cadherin, während die mesenchymalen Marker N-Cadherin und Vimentin unter CCL 5-Einfluss eine verringerte Expression aufwiesen. Somit ist CCL 5 augenscheinlich in der Lage, eine EMT-artige Veränderung einzuleiten (Zhong et al. 2019). Auch in kolorektalen Karzinomzelllinien konnte eine Verstärkung der Metastasierungsneigung durch Aktivierung des CCR 4-Rezeptors beschrieben werden, die scheinbar ebenfalls über den ERK/NF- κ B-Signalweg vermittelt wird (Ou et al. 2016). Somit liefert auch das erhöhte CCL 5 einen möglichen Erklärungsansatz für die veränderte Protein-Transkription im Sinne einer EMT.

4.6.5 Einfluss von Leptin auf die Induktion einer EMT in Tumorzellen

Wie in 4.2.5 dargelegt scheint Leptin in der Lage zu sein, nach Bindung an den Leptinrezeptor intrazellulär den JAK/STAT 3- und PI3K/Akt-Signalweg zu aktivieren (Kelesidis et al. 2010; Wei et al. 2016). Die Effekte des JAK/STAT 3-Signalwegs wurden in 4.6.1 diskutiert. Über PI3K kommt es zu einer Aktivierung von Akt und hierüber einer Induktion von NF- κ B. NF- κ B wiederum ist in der Lage, die Transkription von Snail 1 zu induzieren und somit die Transkription von mesenchymalen Proteinen wie Vimentin und N-Cadherin zu aktivieren und gleichzeitig die Transkription von epithelialen Proteinen wie E-Cadherin zu hemmen. Somit scheint Leptin dazu beizutragen, einen mesenchymalen Phänotyp im Sinne einer EMT auszulösen (Olea-Flores et al. 2020; Wei et al. 2016).

4.6.6 Auslösung eines Phänotyp-Switchs in Tumorzellen durch WS

Lichtmikroskopisch zeigte sich ein Wandel des Phänotyps von eher epithelartig angeordneten Zellen mit dichten Zell-Zell-Kontakten hin zu einem eigenständigen, eher spindelförmigen Aspekt mit unregelmäßiger Form. Dies sind typische Entwicklungen im Rahmen einer EMT, die bereits vorbeschrieben sind und mit einem Verlust von E-

Cadherin und einem Zugewinn von N-Cadherin und Vimentin verbunden sind (Leggett et al. 2016). So kann es zur Lösung der Zellen aus dem epithelialen Verband und einer Auswanderung in die Umgebung kommen (Leggett et al. 2016; Scanlon et al. 2013; Shibue et al. 2017). Diese Effekte werden anscheinend direkt durch die EMT-bedingten Veränderungen der Oberflächenmarker verursacht (Scanlon et al. 2013). Zusätzlich induzierten einige der im WS vorhandenen Zytokine direkt einen Wandel des Phänotyps. So konnte MCP 1 mit der Induktion eines spindelförmigeren Phänotyps in HNSCC-Tumorzellen in Verbindung gebracht werden, der typisch für die Veränderungen im Rahmen einer EMT ist (Lee et al. 2015). Ebenso konnte von IL-8 gezeigt werden, dass es über den PI3K/Akt-Signalweg über die Induktion einer EMT einen Wandel von epithelialem Phänotyp mit oben beschriebenen Eigenschaften hin zu einem spindelförmigen mesenchymalen Phänotyp induzieren kann (Cheng et al. 2014; Grille et al. 2003). Auch Leptin trägt offenbar, wie in 4.6.5 beschrieben, zu dem Phänotyp-Switch von epithelialem zu mesenchymalem Status bei (Olea-Flores et al. 2020).

4.6.7 Schlussfolgerung EMT

Es kam zu einer vermehrten Expressierung einiger EMT-typischer Marker wie u. a. Snail 1. Zudem begann der für eine EMT typische Switch der Oberflächenmarker von epithelialen Markern zu mesenchymalen Markern. Dieser Vorgang war allerdings zum Zeitpunkt der Untersuchung 24 Stunden nach Behandlung mit WS noch nicht abgeschlossen, sondern erst eingeleitet, sodass nicht von einer EMT, sondern von einer EMT-artigen Veränderung der Zellen im Sinne einer partial EMT (pEMT) gesprochen werden kann, wie es Pastushenko et al. vorschlagen (Pastushenko et al. 2019). Morphologisch konnten diese Veränderungen bestätigt werden. Die typische basal-apikale Zellpolarität in einem engen Zellverbund und die engen Zell-Zellkontakte wichen einer eigenständigen, unregelmäßigen Anordnung der Zellen, die einen für den mesenchymalen Phänotyp typischen spindelförmigen Aspekt mit unregelmäßiger Form und anterior-posteriorer Polarität aufwiesen, wie es laut Klymkowsky et al. typischerweise stattfindet (Klymkowsky et al. 2009; Leroy et al. 2007).

Insgesamt lässt sich unter Zusammenschau der Ergebnisse aus PCR und morphologischer Untersuchung der Tumorzellen der Schluss ziehen, dass durch das WS ein EMT-artiger Prozess in Gang gesetzt wurde.

DISKUSSION

In weiteren Untersuchungen wäre hier die Analyse von anderen epithelialen und mesenchymalen Markern möglich. Außerdem wäre eine längere Behandlungsdauer mit WS denkbar.

In Abbildung 4.1 findet sich eine graphische Darstellung der in dieser Arbeit beschriebenen Signalwege.

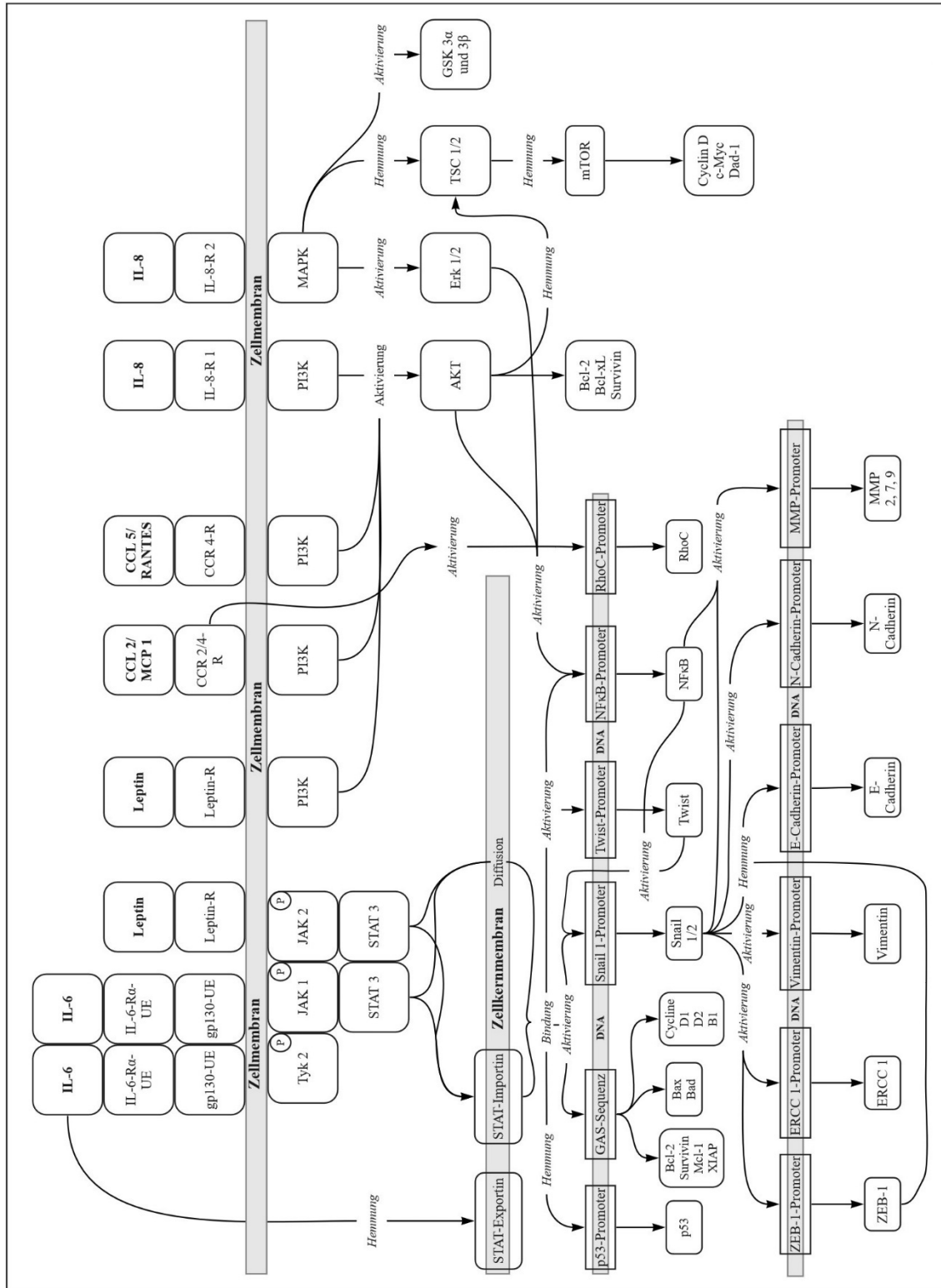


Abbildung 4.1: Darstellung der wichtigsten in dieser Arbeit beschriebenen Signalwege

Darstellung der wichtigsten in dieser Arbeit beschriebenen Zytokine IL-6, IL-8, CCL 2/MCP 1, CCL 5/RANTES, Leptin, deren jeweiligen Rezeptoren an der Zellmembran, den intrazellulären Signalwegen und den Promotern der Zielgene dieser Kaskaden.

4.7 Unterschiede der Zusammensetzung von Wundsekret_{Tag1} und Wundsekret_{Tag2}

Das WS wies an den beiden exemplarisch untersuchten Tagen unterschiedliche Beschaffenheiten auf. So konnte ein Absinken der relativen Zytokin-Konzentrationen im WS der zweiten 24 Stunden postoperativ festgestellt werden. IL-6, IL-8, CCL 2, CCL 5, Leptin, EGF und TNF- α wiesen alle um ca. die Hälfte reduzierte Konzentrationen auf. Trotz der abfallenden Konzentrationen, v. a. von IL-6, blieben die relativen Konzentrationen in einem hohen Bereich. Die in den Versuchen erlangten Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen WS_{Tag1} und WS_{Tag2}.

Die Wundheilung ist ein dynamischer Prozess. Es kommt im Verlauf des Heilungsprozesses zu unterschiedlichen Mechanismen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an Zytokinen einhergehen. Diese Zytokin-Zusammensetzungen wurden bereits in verschiedenen Arbeiten analysiert, wie in 4.1 beschrieben. Die höchste Konzentration an IL-6 im WS wurde 12 Stunden nach einer Gewebsverletzung gemessen (Kondo et al. 1996; Mateo et al. 1994).

Ein weiterer Ansatz ist der Entnahmezeitpunkt des WS, da das WS nach großen Operationen am Hals entnommen wurde, die einen unterschiedlichen postoperativen Verlauf zeigen können. Dies spiegelte sich auch in der Menge des gewonnenen WS und dessen Farbe bzw. Blutanteil wider. So waren bei einigen Patientinnen und Patienten nach 48 Stunden nur wenige ml WS in den Redon-Drainagen aufgefangen worden, während die Redon-Drainagen bei anderen noch 200 ml blutiges WS gefördert hatten. Die Drainagen enthielten nun aber nicht nur das erwünschte WS, sondern auch Blut aus der Wunde. So liegt das WS verdünnt vor, die Konzentration der einzelnen Zytokine wurde dadurch beeinflusst und schwer einschätzbar. Dieser Effekt zeigt sich auch an Tag 1, hier lag zwar mehr WS vor, es war allerdings auch unterschiedlich stark mit Blut versetzt. Im Durchschnitt zeigte sich unter Behandlung mit WS der zweiten 24 Stunden postoperativ ein ähnlicher Effekt wie unter Behandlung mit WS der ersten 24 Stunden nach stattgehabter Operation.

4.8 Vergleich der Auswirkungen von Behandlung der Tumorzellen mit Wundsekret_{Tag1} und Wundsekret_{Tag2}

Im WS wurden hohe relative Konzentrationen an IL-6, IL-8, CCL 2, CCL 5, Leptin und EGF gefunden. Vor allem im WS_{Tag1} lagen sehr hohe Konzentrationen dieser Zytokine vor. Auch im WS_{Tag2} ergab sich ein ähnliches Bild, wobei die Zytokinlevel aller oben Genannten im Vergleich zu denen des WS_{Tag1} stark verringert waren. Im Falle von IL-6, IL-8, CCL 2, CCL 5 und Leptin war dieser Unterschied statistisch signifikant. Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte des WS auf Tumorzellen waren sowohl bei Behandlung mit WS_{Tag1} als auch mit WS_{Tag2} nachzuweisen. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Wirkung der beiden WS konnte allerdings in keiner der Untersuchungen nachgewiesen werden.

Wie in den vorhergehenden Abschnitten diskutiert, gibt es in der Literatur gute Erklärungsansätze für die jeweils unter WS-Einfluss beobachteten Ergebnisse. Eine klare Differenzierung der Konzentrationen der untersuchten Zytokine findet sich dabei nur sporadisch. In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein relativer Vergleich der Zytokin-Konzentrationen vorgenommen. Eine absolute Bestimmung der Konzentrationen wurde nicht durchgeführt.

Zur korrekten Beurteilung könnten hier in Zukunft weitere Untersuchungen angeschlossen werden, um die Ergebnisse in Abhängigkeit der Zytokinkonzentration der einzelnen Zytokine zu prüfen.

4.9 Interindividualität der Patientinnen und Patienten

Initial wurde aus wirtschaftlichen Gründen die Zytokin-Zusammensetzung eines einzelnen Patienten untersucht, um einen Rückschluss auf die allgemeine Zusammensetzung ziehen zu können. Hier ergab sich, wie in 4.1 diskutiert, eine Zusammensetzung, die mit in der Literatur beschriebenen Werten übereinstimmte. So lagen hohe Konzentrationen verschiedener Zytokine wie IL-6, IL-8, CCL 2/MCP 1, CCL 5/RANTES und Leptin vor, die vom WS_{Tag1} zum WS_{Tag2} stark abnahm. Die WS der Patientinnen und Patienten wiesen teils größere Unterschiede sowohl in der absoluten Flüssigkeitsmenge als auch in der makroskopischen Zusammensetzung auf. So war aufgrund der Farbe eine grobe Abschätzung der Menge an beigemischtem Blut möglich,

die evtl. einer kleineren Nachblutung zuzuordnen ist als einem hauptsächlich der Wundheilung dienenden Sekret. Eine vermehrte Blutbeimengung würde die Konzentration der Zytokine im entsprechenden WS verringern, da die absolut freigesetzte Menge tendenziell gleichbleibe. Somit ist durch die nur exemplarisch an einem Patienten durchgeführte Überprüfung der Zusammensetzung des WS nur bedingt eine allgemeingültige Aussage über das WS zu treffen. Zusätzlich zu rein makroskopisch beobachtbaren Unterschieden in der Menge und Zusammensetzung des WS kann auch ein anderer Faktor eine Rolle spielen. So stellen die untersuchten Patientinnen und Patienten ein heterogenes Patientinnen- und Patientengut mit unterschiedlichem Alter, Gesundheits- und Ernährungszustand dar. Dies könnte folglich auch unterschiedliche Fähigkeiten der Körper in Bezug auf die Wundheilung bedeuten. Insgesamt waren die Ergebnisse der Untersuchungen allerdings sehr konsistent, was für einen eher untergeordneten Effekt dieser Einflüsse spricht.

Weitere Einflussgrößen sind persönliche Faktoren der Patientinnen und Patienten, die im Rahmen der 10 in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen und Patienten jedoch nicht untersucht wurden. So weisen Patientinnen und Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 eine schlechtere und trägere Wundheilung auf und neigen zu chronischen Wunden (Nunan et al. 2014). Auch dies könnte einen Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben. Weiterhin spielen Einflüsse wie das Alter und der Allgemein- bzw. Ernährungszustand eine wichtige Rolle bei der Dynamik der Wundheilung, sodass sich hier eine Einschränkung der Ergebnisse ergibt. So konnte in Versuchen an Mäusen beobachtet werden, dass im Alter die Effizienz der Signalwege, die durch gewisse Zytokine ausgelöst werden, nachlässt (Dawes et al. 2013). Zudem zeigte eine andere Arbeit, dass das Einwandern von neutrophilen Granulozyten in die Wunde mit zunehmendem Alter der Mäuse abnimmt, was den gesamten Prozess der Wundheilung verlangsamen kann (Ebaid 2014). Ein reduzierter Ernährungszustand bzw. eine Malnutrition gehen mit einer verzögerten und eingeschränkten Wundheilung einher, was vor allem in Kombination dieser beiden Faktoren einen starken Einfluss haben kann (Arnold et al. 2006). All diese Faktoren und deren Einfluss auf die Ergebnisse könnten in weiteren Untersuchungen beleuchtet werden.

4.10 Untersuchungen an Tumorzellen *in vitro*

Allgemein gibt es viele Einflüsse auf die Ergebnisse der Arbeit, die schwer zu kontrollieren sind und somit toleriert werden müssen. So wurde mit Tumorzelllinien gearbeitet, die nach Generierung immer weiter passagiert werden und somit einer Entwicklung unterliegen, die nicht vorhersehbar ist. Die Tumorzelllinien wurden über einen Zeitraum von mehreren Monaten und dementsprechend vielen dazwischen liegenden Passagen verwendet. Welche Veränderungen die Zellen dabei durchgemacht haben, ist nicht absehbar. Es wurden zudem zwei Zelllinien parallel verwendet, sodass auch hier eine gewisse Variabilität anzunehmen ist. Allerdings waren die Ergebnisse der beiden Zelllinien konsistent, sodass ein Effekt auf die Tumorzellen im Allgemeinen angenommen werden kann. Zudem stimmen die beobachteten Effekte mit den in der Literatur beschriebenen weitgehend überein, wie in 4.1 – 4.8 beleuchtet.

4.11 Unterschiede zwischen den Zelllinien

Die Ergebnisse der beiden Zelllinien FaDu und HLaC78 waren über alle Versuche hinweg größtenteils vergleichbar. Beide Zelllinien stellen etablierte Tumorzelllinien des Halses dar, FaDu-Zellen entspringen dem Hypopharynx, HLaC78-Zellen stammen aus dem Larynx (Rangan 1972; Zenner et al. 1979). Für beide Lokalisationen sind dieselben Risikofaktoren bekannt. So ist der Hauptrisikofaktor Zigarettenabusus, gefolgt von Alkoholabusus. Des Weiteren ist eine HPV-Infektion, insbesondere mit dem HPV-Subtyp 16, ein potenzieller Faktor bei der Entstehung dieser Karzinome (Wittekindt et al. 2012). Die in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Tumorzelllinien sind jedoch HPV-negativ, sodass dieser Risikofaktor bei der Bewertung der vorliegenden Ergebnisse eine untergeordnete Rolle spielt. Auch die Diagnostik und Therapieoptionen decken sich weitgehend. Grundsätzlich ist auch das Ursprungsgewebe der beiden Tumoren Plattenepithel, sodass ein ähnliches Verhalten der Tumorzellen auch *in vitro* zu erwarten ist.

4.12 Limitierungen der Aussagekraft der Ergebnisse

Unter den Limitierungen der Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse sind besonders die Folgenden zu nennen: Grundsätzlich bieten *in vitro*-Versuche eine gute Möglichkeit,

das Verhalten von Tumorzellen zu beobachten. Diese Versuche finden allerdings unter Bedingungen statt, die nur bedingt mit denen *in vivo* zu vergleichen sind. So werden die Zellen nur den gezielt ausgewählten Substanzen und Flüssigkeiten ausgesetzt, die für die jeweiligen Versuche von Bedeutung sind, während *in vivo* die Einflüsse auf die Zellen vielseitig und nur sehr begrenzt steuerbar sind. Somit können im Rahmen von *in vitro*-Versuchen grundsätzliche Eigenschaften von Zellen identifiziert, jedoch nur begrenzt auf die eigentliche Situation im Körper angewandt werden. Es handelt sich somit um Grundlagenforschung, die einen Weg in Richtung zukünftiger Fragestellungen und weiterführender Überlegungen weisen kann.

Eine weitere Einschränkung der Ergebnisse ergibt sich durch die Behandlung der Zellen mit dem WS. Das aus der Wunde abgeleitete WS liegt dort in seiner individuellen Zusammensetzung aus entzündlichem Sekret und Blut vor und kann auf potenziell verbleibende Zellen wirken. In den Versuchen dieser Arbeit wurde das WS durch Zentrifugation von den zellulären Bestandteilen getrennt, gefiltert und mit Zellkulturmedium in einer Konzentration von 30 % auf die Zellen gegeben, da sich hierunter die Effekte der im WS enthaltenen Zytokine am besten beobachten ließen. Allerdings herrschte daher ein anderes Milieu als in der eigentlichen Wunde, wodurch sich nur bedingt nachvollziehen lässt, wie genau die Auswirkungen *in vivo* sind. Insbesondere das Herausfiltern der im WS enthaltenen Leukozyten und Makrophagen verfälscht die direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation.

Zusätzliche Einschränkungen ergeben sich durch die Zeitdauer der Behandlung. So wurde in den vorliegenden Versuchen jeweils über 24 Stunden mit WS behandelt und anschließend die Untersuchungen an den Zellen durchgeführt. Hierbei wurde auf eine gleichbleibende Zusammensetzung der Medienflüssigkeit geachtet. Wie lange Zellen *in vivo* mit dem WS in Kontakt kommen, ist unklar. Hier könnten weitere Versuche angesetzt werden, um den Einfluss von unterschiedlichen Einwirkzeiten zu evaluieren. Leggett et al. konnten nachweisen, dass Snail innerhalb von 72 Stunden eine vollständige EMT auslösen kann, im Verlauf derer es zu einem schrittweisen Ablauf kommt (Leggett et al. 2016). Somit wäre ein längerer Behandlungszeitraum mit WS möglich, um ein weiteres Voranschreiten der EMT zu eruieren.

In dieser Arbeit wurde das WS aus den Redon-Drainage-Flaschen gewonnen, die intraoperativ eingebracht worden waren. Diese dienen dazu, Flüssigkeit aus dem

Operationsgebiet unter Sog abzuleiten, um einer Serom- oder Hämatom-Bildung und auch einer Wundinfektion vorzubeugen. Gleichzeitig kann durch Begutachtung des Sekrets in der durchsichtigen Flasche ein Rückschluss auf potenzielle Blutungen oder Infektionen gezogen werden. Diese Drainagen verbleiben typischerweise bis zum 2. postoperativen Tag in der Wunde (Schumpelick et al. 2006). Dadurch wird ein Großteil des Sekrets aus der Wunde abgeleitet und kommt nur im Bereich zwischen dem Austreten aus der Wunde und dem Eintreten in den Schlauch der Redon-Drainage in Kontakt mit dem Wundbett und mit potenziell hier verbliebenen Tumorzellen. Das bedeutet eine relativ kurze Kontaktzeit, die nicht mit den 24 Stunden Einwirkzeit *in vitro* vergleichbar ist. Da die Wunde jedoch innerhalb des Zeitraums der Wunddrainage annähernd kontinuierlich sezerniert, befindet sich dort über diesen Zeitraum jeweils frisch sezerniertes WS. Dieses hat zwar jeweils vor Ort nur eine kurze Einwirkzeit, liegt dabei allerdings in der initialen Konzentration vor. Somit dürfte die Konzentration an Zytokinen *in vitro* mit denen *in vivo* annähernd vergleichbar sein.

4.13 Ausblick auf potenzielle neue Therapieansätze

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein EMT-artiger Prozess in den HNSCC-Tumorzellen gezeigt werden. Die potenziell verantwortlichen Signalwege wurden bereits diskutiert. Spezifische Therapieansätze sind bereits ausführliches Thema der aktuellen Forschung.

Aktuell befindet sich die medikamentöse Therapie der Karzinome von Kopf und Hals in einem starken Umbruch. Seit einigen Jahren stehen im Sinne von Checkpoint-Inhibitoren die Anti-PD-1-Antikörper wie Nivolumab und Pembrolizumab zur Verfügung, die in der Therapie von rezidierten oder metastasierten Karzinomen eingesetzt werden (Guntinas-Lichius et al. 2021; Vasiliadou et al. 2021). Auch PD-L1-Antikörper sind bereits entwickelt und v. a. in der Therapie von Lungenkarzinomen im Einsatz und könnten in Zukunft auch in Karzinomen von Kopf und Hals eingesetzt werden (Makuku et al. 2021). Zudem steht mit Cetuximab ein EGFR-Antikörper zur Verfügung (Kitamura et al. 2020). Seit 2021 läuft eine Studie, die den therapeutischen Effekt der Kombination aus Cetuximab und Pembrolizumab untersuchen soll (Sacco et al. 2021).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein EMT-artiger Prozess in den HNSCC-Tumorzellen gezeigt werden. Die potenziell verantwortlichen Signalwege wurden bereits

diskutiert. Einige Therapieansätze sind bereits in Erforschung, andere bieten weitere mögliche Angriffspunkte. Das Therapieziel STAT 3 hat bisher wenig zufriedenstellende Therapieergebnisse erzielen können, zuletzt gab es jedoch vielversprechendere Ergebnisse bei der Therapie des Medulloblastoms mit dem STAT 3-Inhibitor LLL12B (Chen et al. 2021) und des STAT-Hemmers OPB-51602 (Brambilla et al. 2020). Auch PI3K-Inhibitoren befinden sich aktuell in der klinischen Erforschung. So konnte von BEZ235, einem PI3K- und mTOR-Hemmer, gezeigt werden, dass er in der Therapie von Karzinomen von Kopf und Hals synergistische Effekte mit Docetaxel aufwies und somit ein potenzielles Therapeutikum darstellen könnte (Chou et al. 2021). Von 2 weiteren PI3K-Inhibitoren, BKM120 and BYL719, konnte gezeigt werden, dass sie als Radiosensitizer in Kombination mit Radiotherapie eingesetzt werden könnten (Chuang et al. 2021). Ein weiterer neuer Therapieansatz wird von Shen et al. beschrieben. Behandlung mit MicroRNA-149-3p hemmt offenbar die Zellproliferation in oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien über die Hemmung von Akt 2 (Shen et al. 2021). Insgesamt lässt sich eine Entwicklung in Richtung von immer weiter zielgerichteter Therapie feststellen, die sich nach dem jeweiligen Mutationsstatus und der Tumorentität richtet, wie Kordbacheh et al. in ihrem Review erklären. (Kordbacheh et al. 2021).

4.14 Ausblick auf zukünftige mögliche Fragestellungen

Aufbauend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und den Einschränkungen der Experimente lassen sich einige weitere Fragestellungen ableiten. So könnte die Einwirkzeit des WS auf die Zellen variiert werden und somit überprüft werden, ob nach längerer Zeit eine weitere Verstärkung der beobachteten Effekte auftritt.

Des Weiteren wäre eine Untersuchung weiterer Marker einer EMT möglich, um die molekularen Vorgänge im Rahmen einer WS-Behandlung genauer analysieren zu können. Auch könnte die Induktion einer Chemoresistenz gegenüber weiteren Chemotherapeutika bzw. neuen Therapieoptionen untersucht werden. Die beiden Standardtherapeutika Cisplatin und Paclitaxel wurden in dieser Arbeit bzw. in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits untersucht. In Zukunft könnten diese Versuche laut einem Review von Bußmann et al. auf 5-Fluoruracil und v. a. den EGFR-Antikörper Cetuximab als Alternativtherapeutika bzw. -optionen in Rezidiv-Situationen ausgeweitet werden (Bußmann et al. 2018).

5 Zusammenfassung

Tumore von Kopf und Hals stellen eine große Gruppe von Karzinomen dar, die weiterhin mit einer schlechten Prognose einhergehen. Therapieprinzipien sind die operative Entfernung des Tumors oder eine Radiochemotherapie. Palliativ steht eine Chemotherapie zur Verfügung. Im Rahmen der operativen Therapie tritt Wundsekret (WS) aus, welches der Wundheilung dient. Im Wundbett tritt es in Kontakt mit potenziell dort verbliebenen Tumorzellen bzw. Resttumor. Das WS ist bereits gut untersucht worden und enthält eine Reihe von Zytokinen, die Effekte auf die Tumorzellen ausüben können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Frage nach dem Einfluss von Wundsekret auf Zellvermehrung, Chemoresistenzentwicklung, den Zellzyklus und die Induktion einer Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) in Tumorzellen von Kopf und Hals gestellt.

Hierfür wurde das WS_{Tag1} , das über Redon-Drainagen über 24 Stunden nach Tumoroperation aus der Wunde abgeleitet wurde und WS_{Tag2} , das nach Flaschenwechsel über weitere 24 Stunden abgeleitet wurde, zunächst im Dotblot auf seine Zytokinzusammensetzung analysiert. Zwei Tumorzelllinien von Kopf und Hals, FaDu und HlaC78, wurden mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} behandelt und untersucht, welche Effekte das WS auf die Zellen hat. Hierfür wurde zunächst ein Proliferationsassay durchgeführt, um den Einfluss des WS auf die Proliferationsrate der Zellen zu analysieren. Die Verteilung der Zellzyklusphasen wurde mittels FACS untersucht. Die Apoptoserate der Tumorzellen nach Cisplatin-Behandlung in Konzentrationen von 40 μ M, 50 μ M und 60 μ M wurde ebenfalls per FACS überprüft. Mithilfe der RT-PCR wurde die relative Genexpression von Snail 1, Snail 2, Vimentin, Twist, E-Cadherin und N-Cadherin, also von Markern einer EMT, analysiert. Im Spheroidmodell wurde die Migration der Tumorzellen in die Umgebung beobachtet. Unter dem Mikroskop erfolgte eine morphologische Analyse der Tumorzellen.

Im WS wurden erhöhte Konzentrationen von IL-6, IL-8, CCL 2/MCP 1, CCL 5/RANTES, Leptin und EGF nachgewiesen. Zellen, die mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} behandelt wurden, wiesen eine erhöhte Proliferationsrate auf. Eine Behandlung mit WS_{Tag1} und mit WS_{Tag2} führte zu keiner veränderten Verteilung der Zellzyklusphasen. In FaDu-Zellen ergab sich

keine Induktion einer Resistenz der Tumorzellen gegen das Therapeutikum Cisplatin. In HlaC78-Zellen konnte dieser Effekt jedoch sowohl nach Behandlung mit WS_{Tag1} als auch mit WS_{Tag2} nachgewiesen werden. In der RT-PCR konnte in beiden Tumorzelllinien sowohl nach Behandlung mit WS_{Tag1} als auch mit WS_{Tag2} eine vermehrte Expression von Snail 1, Snail 2 und Vimentin gezeigt werden. E-Cadherin wurde jeweils vermindert exprimiert. Twist und N-Cadherin wiesen jeweils keine veränderte Expression auf. Im Spheroidmodell fand sich in beiden Zelllinien nach Behandlung mit beiden WS jeweils eine vermehrte Migration der Tumorzellen in die Umgebung. Unter dem Mikroskop wiesen beide Zelllinien morphologische Veränderungen auf. Ein epithelialer Phänotyp mit klarer Zellpolarität und dichten interzellulären Kontakten ging nach Behandlung mit WS_{Tag1} und WS_{Tag2} in einen eher mesenchymalen Phänotyp mit vergrößerten interzellulären Abständen und Ausbildung von Zellausbreitungen über. Es konnte kein Unterschied der Auswirkungen einer Behandlung mit WS_{Tag1} im Vergleich zu einer Behandlung mit WS_{Tag2} nachgewiesen werden.

Unter Zusammenführung aller erhobenen Ergebnisse lässt sich sagen, dass WS in Tumorzellen von Kopf und Hals einen Prozess in Gang setzt, der Charakteristika einer EMT aufweist und somit als EMT-artig beschrieben werden kann. Das gleichzeitige Vorhandensein epithelialer und mesenchymaler Eigenschaften der Tumorzellen wird als partial EMT, pEMT, bezeichnet und bestätigt die bisherige Forschungsliteratur. So werden typische in der bisherigen Forschung beschriebene Signalwege dieser Transition induziert, unter denen v. a. der STAT 3-Snail-Signalweg eine wichtige Rolle spielt. Gleichzeitig zeigen die Tumorzellen typische morphologische Veränderungen, die im Laufe einer EMT stattfinden. Auch ein vermehrtes Auswachsen der Zellen in die Umgebung ist mit dem Ablaufen einer EMT zu vereinbaren, die mit verstärkter Invasivität von Tumorzellen und einer vermehrten Metastasierungsneigung in Verbindung gebracht wird. Als möglicher Auslöser dieser Veränderungen kommen die im WS nachgewiesenen Zytokine und v. a. IL-6 in Frage, die bereits als Induktoren dieser Veränderungen beschrieben wurden. Die vorliegende Arbeit bestätigt die Forschungslage bezüglich des WS und dessen Bestandteilen größtenteils und kann einen kleinen Mosaikstein zur weiteren Forschungsarbeit beitragen. Es sollten weitere Untersuchungen

folgen, um die genauen Mechanismen und Zusammenhänge besser verstehen zu können. Insbesondere wichtig ist die Forschung nach weiteren Therapieansätzen.

6 Literaturverzeichnis

- Abramovitch Rinat, Meir Gila, Neeman Michal (1999) Stimulation of tumour growth by wound-derived growth factors, *Br J Cancer*, 79: S. 1392–1398.
- Aldinucci Donatella, Colombatti Alfonso (2014) The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression, *Mediators Inflamm*, 2014: S. 292376.
- Arnold Meghan, Barbul Adrian (2006) Nutrition and wound healing, *Plast Reconstr Surg*, 117: 42S-58S.
- Barnes Benjamin (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/renGkGzAqwKc2/PDF/28oaKVmif0wDk.pdf, zuletzt geprüft am 02.07.2022.
- BD Biosciences, San Jose, CA (2002) Bacterial Detection and Live/Dead Discrimination by Flow Cytometry. APPLICATION NOTE, https://www.isu.edu/media/libraries/research/mrcf-images/Flow-Doc-Bacterial_Detection_Live_Dead.pdf, zuletzt geprüft am 02.07.2022.
- BD-Biosciences (2006) Technical Data Sheet APC Annexin V, <https://www.bdbiosciences.com/content/bdb/paths/generate-tds-document.us.550475.pdf>, zuletzt geprüft am 02.07.2022.
- Behm Barbara, Babilas Philipp, Landthaler Michael, Schreml Stephan (2012) Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing, *JEADV*, 26: S. 812–820.
- Bodnar Richard J (2015) Chemokine Regulation of Angiogenesis During Wound Healing, *Adv Wound Care*, 4: S. 641–650.
- Brambilla Lara, Lahiri Tanaya, Cammer Michael, Levy David E (2020) STAT3 Inhibitor OPB-51602 Is Cytotoxic to Tumor Cells Through Inhibition of Complex I and ROS Induction, *iScience*, 23 (12): S. 101822.
- Bromberg Jacqueline F, Wrzeszczynska Melissa H, Devgan Geeta, Zhao Yanxiang, Pestell Richard G, Albanese Chris, Darnell James E (1999) Stat3 as an Oncogene, *Cell*, 98: S. 295–303.
- Broughton George, Janis Jeffrey E, Attinger Christopher E (2006) The basic science of wound healing, *Plast Reconstr Surg*, 117: 12S-34S.
- Bucalo Brian, Eaglstein William H, Falanga Vincent (1993) Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid, *Wound Repair Regen*, 1: S. 181–186.

- Bußmann Lara, Münscher Adrian, Busch Chia-Jung (2018) Therapie der rezidivierten und fernmetastasierten Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs : Highlights des ASCO-Meetings 2018, HNO, 66: S. 907–912.
- Cano Amparo, Pérez-Moreno Mirna A, Rodrigo Isabel, Locascio Annamaria, Blanco María J, Del Barrio Marta G, Portillo Francisco, Nieto Angela N (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression, Nat Cell Biol, 2: S. 76–83.
- Chen Xiang, Pan Li, Wei Jia, Zhang Ruijie, Yang Xiaozhi, Song Jinhua, Bai Ren-Yuan, Fu Shengling, Pierson Christopher R, Finlay Jonathan L, Li Chenglong, Lin Jiayuh (2021) LLL12B, a small molecule STAT3 inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and enhances cisplatin-mediated cytotoxicity in medulloblastoma cells, Sci Rep, 11 (1): S. 6517.
- Cheng George Z, Park Sungman, Shu Shaokun, He Lili, Kong William, Zhang Weizhou, Yuan Zengqiang, Wang Lu-Hai, Cheng Jin Q (2008) Advances of AKT pathway in human oncogenesis and as a target for anti-cancer drug discovery, Curr Cancer Drug Targets, 8: S. 2–6.
- Cheng Xian-Shuo, Li Yun-Feng, Tan Jing, Sun Bin, Xiao You-Chuan, Fang Xing-Bao, Zhang Xiao-Feng, Li Qiang, Dong Jian-Hua, Li Ming, Qian Hai-hua, Yin Zheng-Feng, Yang Zhi-Bin (2014) CCL20 and CXCL8 synergize to promote progression and poor survival outcome in patients with colorectal cancer by collaborative induction of the epithelial-mesenchymal transition, Cancer Lett, 348: S. 77–87.
- Chou Ming-Huei, Chuang Hui-Ching, Lin Yu-Tsai, Tsai Ming-Hsien, Kao Ying-Hsien, Lin I-Chun, Huang Tai-Lin, Fang Fu-Min, Chien Chih-Yen (2021) Targeting mTOR-CCL20 Signaling May Improve Response to Docetaxel in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, Int J Mol Sci, 22 (6).
- Christofori Gerhard (2006) New signals from the invasive front, Nature, 441: S. 444–450.
- Chuang Fu-Cheng, Wang Chih-Chun, Chen Jian-Han, Hwang Tzer-Zen, Yeh Shyh-An, Su Yu-Chieh (2021) PI3k inhibitors (BKM120 and BYL719) as radiosensitizers for head and neck squamous cell carcinoma during radiotherapy, PloS one, 16 (1): e0245715.
- Comijn Joke, Berx Geert, Vermassen Petra, Verschueren Koen, van Grunsven Leo, Bruyneel Erik, Mareel Marc, Huylebroeck David, van Roy Frans (2001) The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion, Mol Cell, 7: S. 1267–1278.

- Cooper Geoffrey M (2000) *The cell. A molecular approach*, Washington, DC: ASM Press.
- Craene Bram de, Berx Geert (2013) Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression, *Nat Rev Cancer*, 13: S. 97–110.
- Dasari Shaloam, Tchounwou Paul B (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, *Eur J Pharmacol*, 740: S. 364–378.
- David Justin M, Dominguez Charli, Hamilton Duane H, Palena Claudia (2016) The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance, *Vaccines*, 4 (3).
- Dawes Lucy J, Duncan George, Wormstone Ian M (2013) Age-related differences in signaling efficiency of human lens cells underpin differential wound healing response rates following cataract surgery, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54: S. 333–342.
- Didenko Vladimir V (2001) DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications, *BioTechniques*, 31: S. 1106–1121.
- Doak Shareen H, Zaïr Zoulikha M (2012) Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction: technical considerations for gene expression analysis, *Methods Mol Biol*, 817: S. 251–270.
- Du Bowen, Shim Joong S (2016) Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer, *Molecules*, 21.
- Ebaid Hossam (2014) Neutrophil depletion in the early inflammatory phase delayed cutaneous wound healing in older rats: improvements due to the use of un-denatured camel whey protein, *Diagn Pathol*, 9: S. 46.
- Edinger Aimee L, Thompson Craig B (2002) Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake, *Mol Biol Cell*, 13 (7): S. 2276–2288.
- Ehret Georg B, Reichenbach Patrick, Schindler Ulrike, Horvath Curt M, Fritz Stefan, Nabholz Markus, Bucher Philipp (2001) DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites, *J Biol Chem*, 276: S. 6675–6688.
- Fay Margaret F (1987) Drainage Systems, *AORN Journal*, 46: S. 442–456.
- Fernando Romaine I, Castillo Marianne D, Litzinger Mary, Hamilton Duane H, Palena Claudia (2011) IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells, *Cancer Res*, 71: S. 5296–5306.
- Gao Darrin F, Fish Eleanor N (2013) 89: A role for CCL5 in breast cancer cell metabolism, *Cytokine*, 63: S. 264.

- Gao Jian, Zhao Sen, Halstensen Trond S (2016) Increased interleukin-6 expression is associated with poor prognosis and acquired cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma, *Oncol Rep*, 35: S. 3265–3274.
- Gorrab Amal, Pagano Alessandra, Ayed Khoulood, Chebil Mohamed, Derouiche Amine, Kovacic Hervé, Gati Asma (2021) Leptin Promotes Prostate Cancer Proliferation and Migration by Stimulating STAT3 Pathway, *Nutr Cancer*, 73 (7): S. 1217–1227.
- Grille Sylvia J, Bellacosa Alfonso, Upson John, Klein-Szanto Andres J, van Roy Frans, Lee-Kwon Whaseon, Donowitz Mark, Tschlis Philip N, Larue Lionel (2003) The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines, *Cancer Res*, 63: S. 2172–2178.
- Guntinas-Lichius Orlando, Klußmann Jens P, Lang Stephan (2021) Referenz HNO-Heilkunde, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Guo Yuqi, Xu Feng, Lu TianJian, Duan Zhenfeng, Zhang Zhan (2012) Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer, *Cancer Treat Rev*, 38: S. 904–910.
- Hao Qiongyu, Vadgama Jaydutt V, Wang Piwen (2020) CCL2/CCR2 signaling in cancer pathogenesis, *Cell Commun Signal*, 18 (1): S. 82.
- Haslehurst Alexandria M, Koti Madhuri, Dharsee Moyez, Nuin Paulo, Evans Ken, Geraci Joseph, Childs Timothy, Chen Jian, Li Jieran, Weberpals Johanne, Davey Scott, Squire Jeremy, Park Paul C, Feilotter Harriet (2012) EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer, *BMC Cancer*, 12: S. 91.
- Heinrich Peter C, Behrmann Iris, Haan Serge, Hermanns Heike M, Müller-Newen Gerhard, Schaper Fred (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, *Biochem J*, 374: S. 1–20.
- Henne-Bruns Doris (2012) Chirurgie, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Henry Ginard, Garner Warren L (2003) Inflammatory mediators in wound healing, *Surg Clin North Am*, 83: S. 483–507.
- Hirschhaeuser Franziska, Menne Heike, Dittfeld Claudia, West Jonathan, Mueller-Klieser Wolfgang, Kunz-Schughart Leoni A (2010) Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again, *J Biotechnol*, 148: S. 3–15.
- Hsu Dennis S-S, Lan Hsin-Yi, Huang Chi-Hung, Tai Shyh-Kuan, Chang Shyue-Yih, Tsai Tung-Lung, Chang Cheng-Chi, Tzeng Cheng-Hwai, Wu Kou-Juey, Kao Jung-Yie, Yang Muh-Hwa (2010) Regulation of excision repair cross-complementation group 1

- by Snail contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer, *Clin Cancer Res*, 16: S. 4561–4571.
- Huang Chun-Yin, Fong Yi-Chin, Lee Chun-Yi, Chen Meng-Yi, Tsai Hsiao-Chi, Hsu Horng-Chaung, Tang Chih-Hsin (2009) CCL5 increases lung cancer migration via PI3K, Akt and NF-kappaB pathways, *Biochem Pharmacol*, 77: S. 794–803.
- Jerjes Waseem, Upile Tahwinder, Petrie Aviva, Riskalla Andrew, Hamdoon Zaid, Vourvachis Michael, Karavidas Kostas, Jay Amrita, Sandison Ann, Thomas Gareth J, Kalavrezos Nicholas, Hopper Colin (2010) Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients, *Head Neck Oncol*, 2: S. 9.
- Ji Wen-Tsai, Chen Hau-Ren, Lin Chun-Hsuan, Lee Jeng-Woei, Lee Ching-Chih (2014) Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) modulates pro-survival signaling to promote progression of head and neck squamous cell carcinoma, *PloS one*, 9: e88952.
- Jiang Jing, Li Xinling, Yin Xiangmei, Zhang Jieying, Shi Bin (2019) Association of low expression of E-cadherin and β -catenin with the progression of early stage human squamous cervical cancer, *Oncol Lett*, 17: S. 5729–5739.
- Johnson Daniel E, Burtneß Barbara, Leemans René C, Lui Vivian W Y, Bauman Julie E, Grandis Jennifer R (2020) Head and neck squamous cell carcinoma, *Nature reviews. Disease primers*, 6 (1): S. 92.
- Kalluri Raghu, Weinberg Robert A (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J Clin Invest*, 119: S. 1420–1428.
- Karar Jayashree, Maity Amit (2011) PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis, *Frontiers Research Foundation*, 4: S. 51.
- Katz Matthew H, Alvarez Alfred F, Kirsner Robert S, Eaglstein William H, Falanga Vincent (1991) Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth, *J Am Acad Dermatol*, 25: S. 1054–1058.
- Kaufhold Samantha, Bonavida Benjamin (2014) Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention, *J Exp Clin Cancer Res*, 33: S. 62.
- Kelesidis Theodore, Kelesidis Iosif, Chou Sharon, Mantzoros Christos S (2010) Narrative Review: The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications, *Ann Intern Med*, 152 (2): S. 93–100.

- Kitamura Naoya, Sento Shinya, Yoshizawa Yasumasa, Sasabe Eri, Kudo Yasusei, Yamamoto Tetsuya (2020) Current Trends and Future Prospects of Molecular Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, *Int J Mol Sci*, 22 (1).
- Klymkowsky Michael W, Savagner Pierre (2009) Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe, *Am J Pathol*, 174: S. 1588–1593.
- Kondo Toshikazu, Ohshima Tooru (1996) The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: a preliminary study for possible wound age determination, *Int J Legal Med*, 108: S. 231–236.
- Kordbacheh Farzaneh, Farah Camile S (2021) Molecular Pathways and Druggable Targets in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, *Cancers*, 13 (14).
- Kumagai Youichi, Tajima Yusuke, Ishiguro Toru, Haga Norihiro, Imaizumi Hideko, Suzuki Okihide, Kuwabara Koki, Matsuzawa Takeaki, Sobajima Jun, Fukuchi Minoru, Baba Hiroyuki, Ishibashi Keiichiro, Mochiki Erito, Ishida Hideyuki (2014) Production of intraperitoneal interleukin-6 following open or laparoscopic assisted distal gastrectomy, *Int surg*, 99: S. 812–818.
- Kurita Hiroshi, Nakanishi Yoshitaka, Nishizawa Rishiho, Xiao Tiepeng, Kamata Takahiro, Koike Takeshi, Kobayashi Hiroichi (2010) Impact of different surgical margin conditions on local recurrence of oral squamous cell carcinoma, *Oral oncology*, 46 (11): S. 814–817.
- Kurrey Nawneet K, Jalgaonkar Swati P, Joglekar Alok V, Ghanate Avinash D, Chaskar Prasad D, Doiphode Rahul Y, Bapat Sharmila A (2009) Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells, *Stem cells*, 27: S. 2059–2068.
- Lamouille Samy, Xu Jian, Derynck Rik (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: S. 178–196.
- Lang Shona H, Hyde Catherine, Reid Ian N, Hitchcock Ian S, Hart Claire A, Bryden Gordon A, Villette Jean-Marie, Stower Michael J, Maitland Norman J (2002) Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma, *Prostate*, 52: S. 253–263.
- Laplante Alain F, Germain Lucie, Auger François A (2001) Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions, *FASEB*, 15: S. 2377–2389.

- Larue Lionel, Bellacosa Alfonso (2005) Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways, *Oncogene*, 24: S. 7443–7454.
- Lechner Matt, Liu Jacklyn, Masterson Liam, Fenton Tim R (2022) HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management, *Nature reviews. Clinical oncology*.
- Lee Ching-Chih, Ho Hsu-Chueh, Su Yu-Chieh, Lee Moon-Sing, Hung Shih-Kai, Lin Chun-Hsuan (2015) MCP1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Head and Neck Cancer by AKT Activation, *Anticancer Res*, 35: S. 3299–3306.
- Lee Sun H, Kang Hye-Young, Kim Kyung S, Nam Bo Y, Paeng Jisun, Kim Seonghun, Li Jin J, Park Jung T, Kim Dong K, Han Seung H, Yoo Tae-Hyun, Kang Shin-Wook (2012) The monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCR2 system is involved in peritoneal dialysis-related epithelial-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells, *Lab Invest*, 92: S. 1698–1711.
- Leggett Susan E, Sim Jea Y, Rubins Jonathan E, Neronha Zachary J, Williams Evelyn K, Wong Ian Y (2016) Morphological single cell profiling of the epithelial-mesenchymal transition, *Integr Biol (Camb)*, 8: S. 1133–1144.
- Leroy Pascale, Mostov Keith E (2007) Slug is required for cell survival during partial epithelial-mesenchymal transition of HGF-induced tubulogenesis, *Mol Biol Cell*, 18: S. 1943–1952.
- Licitra Lisa, Perrone Federica, Tamborini Elena, Bertola Lorenzo, Ghirelli Cristina, Negri Tiziana, Orsenigo Marta, Filipazzi Paola, Pompilio Madia, Bossi Paolo, Locati Laura D, Cantu' Giulio, Scaramellini Gabriele, Pilotti Silvana, Tagliabue Elda (2011) Role of EGFR family receptors in proliferation of squamous carcinoma cells induced by wound healing fluids of head and neck cancer patients, *ESMO Open*, 22: S. 1886–1893.
- Lindgren Gustaf, Kjellén Elisabeth, Wennerberg Johan, Ekblad Lars (2016) Wound-healing factors can prime head and neck cancer cells to increase their tumor-forming capacity, *Laryngoscope*, 126: E213-7.
- Ling Zihang, Yang Xi, Chen Xiaobin, Xia Juan, Cheng Bin, Tao Xiaoan (2019) CCL2 promotes cell migration by inducing epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma, *J Oral Pathol Med*, 48: S. 477–482.

- Liu Qian, Li Anping, Tian Yijun, Wu Jennifer D, Liu Yu, Li Tengfei, Chen Yuan, Han Xinwei, Wu Kongming (2016) The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer, *Cytokine Growth Factor Rev*, 31: S. 61–71.
- Lo Hui-Wen, Hsu Sheng-Chieh, Xia Weiya, Cao Xinyu, Shih Jin-Yuan, Wei Yongkun, Abbruzzese James L, Hortobagyi Gabriel N, Hung Mien-Chie (2007) Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression, *Cancer Res*, 67: S. 9066–9076.
- Loberg Robert D, Day LaShon L, Harwood Jason, Ying Chi, St John Lauren N, Giles Ryan, Neeley Chris K, Pienta Kenneth J (2006) CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation, *Neoplasia*, 8 (7): S. 578–586.
- Loh Chin-Yap, Chai Jian Y, Tang Ting F, Wong Won F, Sethi Gautam, Shanmugam Muthu K, Chong Pei P, Looi Chung Y (2019) The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges, *Cells*, 8 (10).
- Luppi Fabrizio, Longo Anna M, Boer Willem I de, Rabe Klaus F, Hiemstra Pieter S (2007) Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation, *Lung cancer*, 56: S. 25–33.
- Luttmann Werner, Bratke Kai, Küpper Michael, Myrtek Daniel (2014) Quantitative Immunoassays, Luttmann W.; Bratke K.; Küpper M.; Myrtek D. (Hrsg.) *Der Experimentator: Immunologie*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 103–131.
- Maghazachi Azzam A, Al-Aoukaty Ala, Schall Thomas J (1996) CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56⁺ cells, *Eur J Immunol*, 26: S. 315–319.
- Makuku Rangarirai, Khalili Neda, Razi Sepideh, Keshavarz-Fathi Mahsa, Rezaei Nima (2021) Current and Future Perspectives of PD-1/PDL-1 Blockade in Cancer Immunotherapy, *J Immunol Res*, 2021: S. 6661406.
- Mann Henry B, Whitney Donald R (1947) On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other, *Ann Stat*, 18: S. 50–60.
- Mateo Romeo B, Reichner Jonathan S, Albina Jorge E (1994) Interleukin-6 activity in wounds, *Am J Physiol*, 266: R1840-4.
- McGlothen Tanisha Z, Gillespie Corey, Colbert Lindsay, Blaylock-Hogans Dorotea, Guo Shifeng, Gonzalez Perez R (2011) P5-06-10: Leptin Signaling Impacts Notch and Wnt Crosstalk in Breast Cancer, *Cancer Res*, 71 (24_Supplement): P5-06-10-P5-06-10.

- Mueller-Klieser Wolfgang (1997) Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications, *Am J Physiol*, 273: C1109-23.
- Mullis Kary, Ferré François, Gibbs Richard (1994) *The Polymerase Chain Reaction*, Boston, MA: Birkhäuser Boston.
- Murad Ali, Nath Anjali K, Cha Sung-Tae, Demir Erhan, Flores-Riveros Jaime, Sierra-Honigmann Rocío (2003) Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing, *FASEB J*, 17 (13): S. 1895–1897.
- Murooka Thomas T, Rahbar Ramtin, Fish Eleanor N (2009) CCL5 promotes proliferation of MCF-7 cells through mTOR-dependent mRNA translation, *Biochem Biophys Res Commun*, 387 (2): S. 381–386.
- Niu Guilian, Wright Kenneth L, Ma Yihong, Wright Gabriela M, Huang Mei, Irby Rosalyn, Briggs Jon, Karras James, Cress Douglas, Pardoll Drew, Jove Richard, Chen Jiangdong, Yu Hua (2005) Role of Stat3 in Regulating p53 Expression and Function†, *Mol Cell Biol*, 25: S. 7432–7440.
- Nunan Robert, Harding Keith G, Martin Paul (2014) Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity, *Dis Model Mech*, 7: S. 1205–1213.
- Olea-Flores Monserrat, Juárez-Cruz Juan C, Zuñiga-Eulogio Miriam D, Acosta Erika, García-Rodríguez Eduardo, Zacapala-Gomez Ana E, Mendoza-Catalán Miguel A, Ortiz-Ortiz Julio, Ortuño-Pineda Carlos, Navarro-Tito Napoleón (2020) New Actors Driving the Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: The Role of Leptin, *Biomolecules*, 10 (12).
- OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG. (2018) MEET THE LEGEND in cell-based research, https://cellcounting.de/wp-content/uploads/2018/10/CASY_2018.pdf, zuletzt geprüft am 02.07.2022.
- Ott Ingo, Gust Ronald (2006) Medizinische Chemie der Platinkomplexe: Besonderheiten anorganischer Zytostatika, *Pharm Unserer Zeit*, 35: S. 124–133.
- Ou Baochi, Zhao Jingkun, Guan Shaopei, Feng Hao, Wangpu Xiongzhi, Zhu Congcong, Zong Yaping, Ma Junjun, Sun Jing, Shen Xiaohui, Zheng Minhua, Lu Aiguo (2016) CCR4 promotes metastasis via ERK/NF- κ B/MMP13 pathway and acts downstream of TNF- α in colorectal cancer, *Oncotarget*, 7: S. 47637–47649.

- Pabla Navjotsingh, Huang Shuang, Mi Qing-Sheng, Daniel Rene, Dong Zheng (2008) ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis, *J Biol Chem*, 283: S. 6572–6583.
- Pastushenko Ievgenia, Blanpain Cédric (2019) EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis, *Trends Cell Biol*, 29 (3): S. 212–226.
- Preiß, Joachim; Bettag, Martin (Hrsg.) (2010) Taschenbuch Onkologie. Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2010/2011, München: Zuckschwerdt.
- QIAGEN (2009) QuantiTect Reverse Transcription Handbook, <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=f0de5533-3dd1-4835-8820-1f5c088dd800&lang=en>, zuletzt geprüft am 02.07.2022.
- QIAGEN (2012) RNeasy® Mini Handbook, <https://www.qiagen.com/ch/resources/download.aspx?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>, zuletzt geprüft am 02.07.2022.
- Rangan Setular R S (1972) A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma, *Cancer*, 29: S. 117–121.
- Ratliff Catherine R (2008) Wound exudate: an influential factor in healing, *Adv Nurse Pract*, 16: 32-5; quiz 36.
- RayBiotech, Norcross, GA (2015) RayBio® C-Series Human Cytokine Antibody Array C3. For the semi-quantitative detection of 42 human proteins in serum, plasma, cell culture media, and other liquid sample types., <https://www.raybiotech.com/files/manual/Antibody-Array/AAH-CYT-3.pdf>, zuletzt geprüft am 02.07.2022.
- Reiß Michael (2009) Facharztwissen HNO-Heilkunde. Differenzierte Diagnostik und Therapie, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Ridiandries Anisyah, Tan Joanne T M, Bursill Christina A (2018) The Role of Chemokines in Wound Healing, *Int J Mol Sci*, 19.
- Robert Koch-Institut (2017) Krebs in Deutschland für 2013/2014, <https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/3270/22EwGndhBfkPkE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>, zuletzt geprüft am 02.07.2022.
- Sacco Assuntina G, Chen Ruifeng, Worden Francis P, Wong Deborah J L, Adkins Douglas, Swiecicki Paul, Chai-Ho Wanxing, Oppelt Peter, Ghosh Debanjali, Bykowski Julie, Molinolo Alfredo, Pittman Emily, Estrada Valeria, Gold Kathryn, Daniels Gregory, Lippman Scott M, Natsuhara Amanda, Messer Karen, Cohen (2021) Pembrolizumab plus cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck

- squamous cell carcinoma: an open-label, multi-arm, non-randomised, multicentre, phase 2 trial, *Lancet Oncol*, 22 (6): S. 883–892.
- Scanlon Christina S, van Tubergen Elizabeth A, Inglehart Ronald C, D'Silva Nisha J (2013) Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma, *J Dent Res*, 92: S. 114–121.
- Scherzad Agmal, Gehrke Thomas, Meyer Till, Ickrath Pascal, Bregenzer Maximilian, Eiter Rafael, Hagen Rudolf, Kleinsasser Norbert, Hackenberg Stephan (2019) Wound fluid enhances cancer cell proliferation via activation of STAT3 signal pathway in vitro, *Oncol Rep*, 41: S. 2919–2926.
- Scherzed Agmal, Hackenberg Stephan, Froelich Katrin, Radeloff Andreas, Technau Antje, Kessler Michael, Hagen Rudolf, Rak Kristen, Koehler Christian, Kleinsasser Norbert (2011) The effect of wound fluid on adipose-derived stem cells in vitro: a study in human cell materials, *Tissue Eng Part C Methods*, 17: S. 809–817.
- Schumpelick Volker, Bleese Niels, Mommsen Ulrich (2006) *Kurzlehrbuch Chirurgie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Segatto Ilenia, Berton Stefania, Sonogo Maura, Massarut Samuele, Perin Tiziana, Piccoli Erica, Colombatti Alfonso, Vecchione Andrea, Baldassarre Gustavo, Belletti Barbara (2014) Surgery-induced wound response promotes stem-like and tumor-initiating features of breast cancer cells, via STAT3 signaling, *Oncotarget*, 5: S. 6267–6279.
- Shen Qin, Zhu Hong, Lei Qiaoling, Chen Luyuan, Yang Dajiang, Sui Wen (2021) MicroRNA-149-3p inhibits cell proliferation by targeting AKT2 in oral squamous cell carcinoma, *Mol Med Rep*, 23 (3).
- Shibue Tsukasa, Weinberg Robert A (2017) EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications, *Nat Rev Clin Oncol*, 14: S. 611–629.
- Siddik Zahid H (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene*, 22: S. 7265–7279.
- Solanki Gaurav (2012) Polymerase Chain Reaction, *IJPR*, 2: S. 98–102.
- Spear Marcia (2012) Wound exudate--the good, the bad, and the ugly, *Plast Surg Nurs*, 32: S. 77–79.
- Subramaniam Aruljothi, Shanmugam Muthu K, Perumal Ekambaram, Li Feng, Nachiyappan Alamelu, Dai Xiaoyun, Swamy Shivananju N, Ahn Kwang S, Kumar Alan P, Tan Benny K H, Hui Kam M, Sethi Gautam (2013) Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation,

- survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma, *Biochim Biophys Acta*, 1835 (1): S. 46–60.
- Suchi Kentaro, Fujiwara Hitoshi, Okamura Shinichi, Okamura Hiroko, Umehara Seiji, Todo Momoko, Furutani Akinobu, Yoneda Masayuki, Shiozaki Atsushi, Kubota Takeshi, Ichikawa Daisuke, Okamoto Kazuma, Otsuji Eigo (2011) Overexpression of Interleukin-6 suppresses cisplatin-induced cytotoxicity in esophageal squamous cell carcinoma cells, *Anticancer Res*, 31: S. 67–75.
- Sullivan Nicholas J, Sasser, Axel Amy E, Vesuna Farhad, Raman Venu, Ramirez Nilsa, Oberyszyn Tatiana M, Hall Brian M (2009) Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells, *Oncogene*, 28: S. 2940–2947.
- Sun Hong, Liu Mingyu, Wu Xuwen, Yang Chunguang, Zhang Yanni, Xu Zhenhang, Gao Kelei, Wang Fengjun (2017) Overexpression of N-cadherin and β -catenin correlates with poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma, *Oncol Lett*, 13: S. 1725–1730.
- Sun Shengrong (2009) Role of CCL5 in invasion, proliferation and proportion of CD44+/CD24– phenotype of MCF-7 cells and correlation of CCL5 and CCR5 expression with breast cancer progression, *Oncol Rep*, 21.
- Taniguchi Koji, Karin Michael (2014) IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer, *Semin Immunol*, 26: S. 54–74.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2006) Real-time PCR: understanding Ct, <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PJ1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>, zuletzt geprüft am 02.07.2022.
- Tokuyama-Toda Reiko, Satomura Kazuhito (2016) The Physiological Roles of Leptin in Skin Wound Healing, Alexandrescu V. A. (Hrsg.) Wound Healing - New insights into Ancient Challenges, InTech.
- Trengove Naomi J, Bielefeldt-Ohmann Helle, Stacey Michael C (2000) Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers, *Wound Repair Regen*, 8: S. 13–25.
- Trivedi Sumita, Sun Lova, Aggarwal Charu (2021) Immunotherapy for Head and Neck Cancer, *Hematol Oncol Clin North Am*, 35 (5): S. 1021–1037.
- Tukey John W (1977) *Exploratory data analysis*, Reading, Mass.: Addison-Wesley.

- van Golen Kenneth L, Ying Chi, Sequeira Linda, Dubyk Cara W, Reisenberger Tracy, Chinnaiyan Arul M, Pienta Kenneth J, Loberg Robert D (2008) CCL2 induces prostate cancer transendothelial cell migration via activation of the small GTPase Rac, *J Cell Biochem*, 104: S. 1587–1597.
- van Roy Frans, Berx Geert (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin, *Experientia*, 65: S. 3756–3788.
- Vasiliadou Ifigenia, Breik Omar, Baker Holly, Leslie Isla, van Sim Ren, Hegarty Gemma, Michaelidou Andriana, Nathan Kannon, Hartley Andrew, Good James, Sanghera Paul, Fong Charles, Urbano Teresa G, Lei Mary, Petkar Imran, Ferreira Miguel R, Nutting Chris, Wong Kee H, Newbold Kate, Harrington Kevin, Bhide Shree, Kong Anthony (2021) Safety and Treatment Outcomes of Nivolumab for the Treatment of Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Retrospective Multicenter Cohort Study, *Cancers*, 13.
- Vega Sonia, Morales Aixa V, Ocaña Oscar H, Valdés Francisco, Fabregat Isabel, Nieto M. A (2004) Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death, *Genes Dev*, 18: S. 1131–1143.
- Vermes István, Haanen Clemens, Steffens-Nakken Helga, Reutellingsperger Chris (1995) A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V, *Association of Medical Laboratory Immunologists*, 184 (1): S. 39–51.
- Vesuna Farhad, van Diest Paul, Chen Ji H, Raman Venu (2008) Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer, *Biochem Biophys Res Commun*, 367 (2): S. 235–241.
- Wang Dan, Hu Kebang, Gao Ningning, Zhang Hao, Jiang Yanlin, Liu Caigang, Wang Shouyu, Zhao Zuwei (2015) High throughput screening of cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases in wound fluid induced by mammary surgery, *Oncotarget*, 6: S. 29296–29310.
- Wang Shih-Wei, Wu Hsing-Hsien, Liu Shih-Chia, Wang Po-Chuan, Ou Wen-Chieh, Chou Wen-Yi, Shen Yung-Shuen, Tang Chih-Hsin (2012) CCL5 and CCR5 interaction promotes cell motility in human osteosarcoma, *PloS one*, 7: e35101.
- Wei Lan, Li Kuangfa, Pang Xueli, Guo Bianqin, Su Min, Huang Yunxiu, Wang Nian, Ji Feihu, Zhong Changli, Yang Junhong, Zhang Zhiqian, Jiang Yulin, Liu Yifeng, Chen Tingmei (2016) Leptin promotes epithelial-mesenchymal transition of breast cancer via the upregulation of pyruvate kinase M2, *J Exp Clin Cancer Res*, 35 (1): S. 166.

- Wheelock Margaret J, Shintani Yasushi, Maeda Masato, Fukumoto Yuri, Johnson Keith R (2008) Cadherin switching, *J Cell Sci*, 121: S. 727–735.
- Wienecke Antje, Kraywinkel Klaus (2019) Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland, *Onkologe*, 25 (3): S. 190–200.
- Wilcoxon Frank (1945) Individual Comparisons by Ranking Methods, *Biometrics*, 1: S. 80.
- Wild Thomas, Auböck L (2007) *Manual der Wundheilung. Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung*, Wien: Springer.
- Wittekindt Claus, Klußmann Jens P (2012) Grundlagen der Tumorentstehung und die Bedeutung Humaner Papillomaviren (HPV) bei Kopf-Hals-Karzinomen, *Laryngorhinootologie*: S1-26.
- Xie Tong-Xin, Wei Daoyan, Liu Mingguang, Gao Allen C, Ali-Osman Francis, Sawaya Raymond, Huang Suyun (2004) Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis, *Oncogene*, 23: S. 3550–3560.
- Yadav Arti, Kumar Bhavna, Datta Jharna, Teknos Theodoros N, Kumar Pawan (2011) IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway, *Mol Cancer Res*, 9: S. 1658–1667.
- Yager Dorne R, Kulina Robert A, Gilman Laura A (2007) Wound fluids: a window into the wound environment?, *Int J Low Extrem Wounds*, 6: S. 262–272.
- Yang Jing, Lv Xing, Chen Jinna, Xie Changqing, Xia Weixiong, Jiang Chen, Zeng Tingting, Ye Yanfang, Ke Liangru, Yu Yahui, Liang Hu, Guan Xin-Yuan, Guo Xiang, Xiang Yanqun (2016) CCL2-CCR2 axis promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma by activating ERK1/2-MMP2/9 pathway, *Oncotarget*, 7: S. 15632–15647.
- Yang Jing, Mani Sendurai A, Donaher Joana L, Ramaswamy Sridhar, Itzykson Raphael A, Come Christophe, Savagner Pierre, Gitelman Inna, Richardson Andrea, Weinberg Robert A (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis, *Cell*, 117: S. 927–939.
- Yang Jing, Weinberg Robert A (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis, *Dev Cell*, 14 (6): S. 818–829.
- Yin Zheng-Feng, Kamata Nobouki, Hayashi Eiji, Hoteiya Toshiaki, Ueda Norifumi, Fujimoto Ryoichi, Nagayama Masaru (2001) Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro, *Oral Oncol*, 37: S. 65–71.

Yu Hua, Pardoll Drew, Jove Richard (2009) STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3, *Nat Rev Cancer*, 9: S. 798–809.

Zenner Hans P, Lehner Wolfgang, Herrmann Ingo F (1979) Establishment of carcinoma cell lines from larynx and submandibular gland, *Arch Otorhinolaryngol*, 225: S. 269–277.

Zhong Yazhen, Lin Zechen, Lu Jinhua, Lin Xianlei, Xu Wei, Wang Nan, Huang Siyu, Wang Yuanyuan, Zhu Yuan, Chen Zhu, Lin Shengyou (2019) CCL2-CCL5/CCR4 contributed to radiation-induced epithelial-mesenchymal transition of HPAEpiC cells via the ERK signaling pathways, *Am J Transl Res*, 11: S. 733–743.

APPENDIX

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2
BSA	Albumin aus Rinderserum
CCL 2	CC-Chemokinligand 2
CCL 5	CC-Chemokinligand 5/RANTES
CDH1	E-Cadherin
CDH2	N-Cadherin
Cdk	Cyclin-dependent Kinase
cDNA	Komplementäre DNA
c-Myc	c-Myelocytomatosis
CNTO 328	Siltuximab
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT-Wert	Cycle threshold-Wert/Schwellenwertzyklus
CXCR 1/2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1/2
Dad-1	Dolichyl-Diphosphooligosaccharide-Protein Glycosyltransferase Subunit 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E-box	Enhancer-box
ECM	Extrazellulärmatrix
EGF	Epithelial Growth Factor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERCC 1	Excision Repair Cross Complementation Group 1
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kalbsserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer

APPENDIX

g	Fallbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gp 130	Glycoprotein 130
GRO	CXCL1 (CXC-Chemokinligand 1)
HDAC 1	Histon-Deacetylase 1
HNSCC	Head Neck Squamous Cell Carcinoma/Karzinome von Kopf und Hals
HRP	Horseradish Peroxidase
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
IFN	Interferon
IL-6/IL-8	Interleukin 6/8
IQR	Interquartilenabstand
JAK	Januskinase
MAPK/Erk	Mitogen-activated Protein Kinase
Mcl-1	Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein 1
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
NF-κB	Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of activated B-cells
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphoinositid 3 Kinase
pEMT	partial EMT
PS	Phosphatidylserin

APPENDIX

Rac-GTPase	Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
RANTES	Regulated on Activation, normal T cell expressed and secreted
RhoC	Ras Homolog Gene Family Member C
RNA	Ribonucleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
SH 2	Src Homology 2
Sirt 1	Sirtuin-1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Taq	Thermus aquaticus
TCF 3	Transcription Factor 3
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TSC 2	Tuberous Sclerosis Complex 2
Tyk 2	Tyrosinekinase 2
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WS	Wundsekret
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
ZEB 1/2	Zink Finger (E-box)-binding Homeobox 1/2

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: *Darstellung des Versuchsaufbaus*

Abbildung 2.2: *Schema eines Boxplots*

Abbildung 3.1: *FaDu Wachstum*

Abbildung 3.2: *HlaC78 Wachstum*

Abbildung 3.3: *Dotblot*

Abbildung 3.4: *Relative Konzentration Zytokine WS_{Tag1} mit WS_{Tag2}*

Abbildung 3.5: *G1 Phase FaDu*

Abbildung 3.6: *G1 Phase HlaC78*

Abbildung 3.7: *Zellvitalität FaDu 40 μ M*

APPENDIX

Abbildung 3.8: *Zellvitalität HlaC78 40 µM*

Abbildung 3.9: *PCR FaDu Snail 2*

Abbildung 3.10: *PCR HlaC78 Snail 2*

Abbildung 3.11: *PCR FaDu Cadherin E*

Abbildung 3.12: *PCR HlaC78 Cadherin E*

Abbildung 3.13: *FaDu Spheroid*

Abbildung 3.14: *HlaC78 Spheroid*

Abbildung 3.15: *FaDu Zellmorphologie ohne WS*

Abbildung 3.16: *FaDu Zellmorphologie mit WS*

Abbildung 4.1: *Darstellung der in dieser Arbeit beschriebenen Signalwege*

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: *Verwendete Verbrauchsmaterialien*

Tabelle 2.2: *Verwendete Flüssigkeiten, Chemikalien und Nährmedien*

Tabelle 2.3: *Verwendete Laborgeräte und Software*

Tabelle 2.4: *Tabelle der Zytokine des Dotblot-Assays*

Tabelle 2.5: *Verwendete Zielsequenzen und TaqMan Assay IDs (Applied Biosystems)*

Tabelle IV 1: *Proliferationsassay FaDu*

Tabelle IV 2: *Proliferationsassay HlaC78*

Tabelle IV 3: *Zellzyklus FaDu*

Tabelle IV 4: *Zellzyklus HlaC78*

Tabelle IV 5: *Apoptose FaDu*

Tabelle IV 6: *Apoptose HlaC78*

Tabelle IV 7: *PCR FaDu 1*

Tabelle IV 8: *PCR FaDu 2*

Tabelle IV 9: *PCR HlaC78 1*

Tabelle IV 10: *PCR HlaC78 2*

Tabelle IV 11: *Spheroid FaDu*

Tabelle IV 12: *Spheroid HlaC78*

Tabelle V 1: *Liste der untersuchten Patientinnen und Patienten mit Geschlecht und Alter*

APPENDIX

IV Ergebnistabellen

IV.A Proliferationsassay

Tabelle IV 1: Proliferationsassay FaDu

Ergebnisse des Proliferationsassays von FaDu-Zellen. Relatives Wachstum bei unterschiedlichen Konzentrationen von WS im WS-Medium-Gemisch. Angabe in Prozent. Median, Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Probe	Kontrolle	1%	10%	20%	30%	40%	50%
1	1,26	1,32	1,56	2,19	2,17	2,17	1,67
2	1,42	1,42	1,52	1,58	1,88	1,88	1,52
3	1,40	1,57	1,42	1,82	2,08	1,75	1,67
4	1,35	1,41	1,48	1,79	1,96	1,84	1,75
Median	1,38	1,42	1,50	1,81	2,02	1,86	1,67
Mittelwert	1,36	1,43	1,50	1,85	2,02	1,91	1,65
SD	0,07	0,10	0,06	0,25	0,13	0,18	0,10

60%	70%	80%	90%	100%
1,35	1,20	1,25	1,29	1,23
1,68	1,36	1,41	1,52	1,31
1,52	1,26	1,33	1,42	1,19
1,36	1,24	1,31	1,26	1,45
1,44	1,25	1,32	1,36	1,27
1,48	1,27	1,33	1,37	1,30
0,16	0,07	0,07	0,12	0,11

Tabelle IV 2: Proliferationsassay HlaC78

Ergebnisse des Proliferationsassays von HlaC78-Zellen. Relatives Wachstum bei unterschiedlichen Konzentrationen von WS im WS-Medium-Gemisch. Angabe in Prozent. Median, Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Probe	Kontrolle	1%	10%	20%	30%	40%	50%
1	1,17	1,16	1,19	1,24	1,41	1,24	1,38
2	1,21	1,18	1,10	1,15	1,28	1,29	1,21
3	1,14	1,15	1,17	1,42	1,65	1,45	1,26
4	1,15	1,20	1,18	1,52	1,54	1,46	1,30
Median	1,16	1,17	1,18	1,33	1,48	1,37	1,28
Mittelwert	1,17	1,17	1,16	1,33	1,47	1,36	1,29
SD	0,03	0,02	0,04	0,17	0,16	0,11	0,07

60%	70%	80%	90%	100%
1,29	1,19	1,24	1,10	0,89
1,24	1,19	1,20	1,17	1,08
1,32	1,25	1,05	1,24	1,10
1,26	1,11	1,30	1,15	1,15
1,28	1,19	1,22	1,16	1,09
1,28	1,19	1,20	1,17	1,06
0,04	0,06	0,11	0,06	0,11

IV.B Zellzyklus

Tabelle IV 3: Zellzyklus FaDu

Ergebnisse der Analyse der Verteilung der Zellzyklusphasen von FaDu-Zellen nach Behandlung mit WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2} und ohne Behandlung mit WS per FACS. Angabe in Prozent. Median, Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Probe	G1 Phase			G2/M-Phase			S-Phase		
	ohne WS	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}	ohne WS	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}	ohne WS	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}
1	46,20	43,50	41,30	45,60	48,00	50,50	8,20	8,40	8,20
2	40,50	41,90	42,80	52,30	50,50	51,90	7,20	7,60	5,30
3	46,50	38,60	41,80	47,20	55,70	50,90	6,30	5,70	7,20
4	38,30	52,40	38,30	55,00	31,60	55,50	6,70	16,90	6,20
5	66,10	44,40	64,60	20,80	28,10	26,00	13,10	27,40	9,30
6	46,70	47,80	48,50	31,90	34,70	26,50	21,40	17,20	25,00
7	49,70	43,90	50,30	34,10	29,20	28,20	16,20	26,60	21,30
8	48,80	41,80	49,90	29,70	32,90	29,90	21,50	25,20	20,20
9	48,80	42,80	50,10	31,20	31,30	29,90	20,00	25,90	20,00
10	46,20	46,20	52,10	31,20	32,70	28,40	22,70	21,10	19,50
Median	46,60	43,70	49,20	33,00	32,80	29,90	14,65	19,15	14,40
Mittelwert	47,78	44,33	47,97	37,90	37,47	37,77	14,33	18,20	14,22
SD	7,39	3,79	7,53	11,28	9,96	12,55	6,83	8,43	7,58

Tabelle IV 4: Zellzyklus HLaC78

Ergebnisse der Analyse der Verteilung der Zellzyklusphasen von HLaC78-Zellen nach Behandlung mit WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2} und ohne Behandlung mit WS per FACS. Angabe in Prozent. Median, Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Probe	G1 Phase			G2/M-Phase			S-Phase		
	ohne WS	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}	ohne WS	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}	ohne WS	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}
1	63,50	68,10	67,10	21,20	17,30	17,20	15,30	14,60	15,70
2	61,90	68,30	68,70	30,00	24,60	24,00	8,10	7,10	7,30
3	65,90	66,40	67,90	24,80	24,70	22,90	9,20	8,80	9,20
4	62,70	64,70	67,00	26,00	25,40	22,80	10,80	9,90	10,20
5	61,60	65,70	67,40	21,70	23,30	20,20	16,70	11,00	12,40
6	59,00	59,40	68,00	20,40	18,80	11,50	20,40	21,70	19,80
7	59,60	63,90	58,40	22,00	14,50	18,00	20,40	20,80	23,20
8	59,90	62,00	58,40	21,90	19,60	20,50	18,20	18,40	21,00
9	60,20	61,80	59,50	22,10	18,80	19,60	17,70	19,40	20,90
10	61,40	60,60	62,20	22,10	21,40	20,40	16,50	18,00	17,40
Median	61,50	64,30	67,05	22,05	20,50	20,30	16,60	16,30	16,55
Mittelwert	61,57	64,09	64,46	23,22	20,84	19,71	15,33	14,97	15,71
SD	2,08	3,09	4,31	2,91	3,63	3,59	4,46	5,39	5,63

IV.C Chemoresistenz Apoptose

Tabelle IV 5: Zellvitalität FaDu im Apoptoseassay

Ergebnisse der Messung der Apoptoserate und Vitalität von FaDu-Zellen mit und ohne Behandlung mit Cisplatin in den jeweiligen Konzentrationen 40 µM, 50 µM und 60 µM nach Behandlung mit WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2} und ohne Behandlung mit WS per Annexin-V-Apoptosemessung am FACS. Angabe in Prozent. Median, Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Probe	ohne	ohne WS			WS _{Tag1}			WS _{Tag2}		
	Cisplatin	40 µM	50 µM	60 µM	40 µM	50 µM	60 µM	40 µM	50 µM	60 µM
1	90,70	17,80	14,60	1,40	56,40	37,10	20,00	43,80	46,50	18,30
2	90,90	36,00	18,60	11,40	63,80	43,20	19,20	30,90	30,60	22,40
3	92,40	35,30	29,60	18,80	24,50	30,20	17,00	45,80	23,00	24,40
4	83,10	27,10	23,10	21,10	16,70	19,30	16,70	7,70	7,60	9,20
5	88,90	51,50	39,50	21,40	59,00	53,30	37,30	82,80	62,80	21,90
6	89,40	44,00	44,20	16,90	47,60	48,60	21,40	52,80	25,70	21,60
7	88,30	38,30	37,20	15,30	62,90	55,70	30,00	49,80	48,50	25,80
8	87,30	49,00	41,60	25,80	70,30	52,30	39,30	64,70	44,60	24,80
9	89,40	35,30	29,60	18,80	47,60	48,60	21,40	52,80	25,70	21,60
10	87,80	44,00	44,20	16,90	24,50	30,20	17,00	45,80	23,00	24,20
Median	89,15	37,15	33,40	17,85	52,00	45,90	20,70	47,80	28,15	22,15
Mittelwert	88,82	37,83	32,22	16,78	47,33	41,85	23,93	47,69	33,80	21,42
SD	2,53	10,11	10,78	6,64	18,98	12,15	8,50	19,67	16,32	4,80

Tabelle IV 6: Zellvitalität HLaC78 im Apoptoseassay

Ergebnisse der Messung der Apoptoserate und Vitalität von HLaC78-Zellen mit und ohne Behandlung mit Cisplatin in den jeweiligen Konzentrationen 40 µM, 50 µM und 60 µM nach Behandlung mit WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2} und ohne Behandlung mit WS per Annexin-V-Apoptosemessung am FACS. Angabe in Prozent. Median, Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Probe	ohne	ohne WS			WS _{Tag1}			WS _{Tag2}		
	Cisplatin	40 µM	50 µM	60 µM	40 µM	50 µM	60 µM	40 µM	50 µM	60 µM
1	90,20	71,30	65,50	52,10	56,40	65,30	42,40	62,60	67,80	64,40
2	91,30	51,90	60,40	32,20	78,60	72,70	42,10	42,70	32,60	57,90
3	74,20	42,20	32,50	29,90	79,50	74,00	65,20	71,20	65,50	56,20
4	91,20	65,40	65,00	47,60	34,10	49,40	30,20	59,30	52,60	30,40
5	91,60	63,90	71,50	57,40	82,50	77,10	53,30	83,20	80,00	65,90
6	88,30	53,60	55,90	46,30	70,00	75,70	58,80	63,10	15,10	38,10
7	92,20	80,40	80,00	64,10	89,50	82,70	23,60	93,50	90,80	81,70
8	83,00	59,50	15,80	12,80	71,80	60,40	38,60	68,50	74,10	61,30
9	84,60	56,40	31,70	16,30	74,50	66,40	45,70	69,70	68,50	44,30
10	88,30	53,60	56,90	46,30	70,00	75,70	58,80	63,10	64,70	41,20
Median	89,25	57,95	58,65	46,30	73,15	73,35	44,05	65,80	66,65	57,05
Mittelwert	87,49	59,82	53,52	40,50	70,69	69,94	45,87	67,69	61,17	54,14
SD	5,59	10,88	20,29	17,09	15,61	9,73	13,27	13,69	22,46	15,48

IV.D PCR

Tabelle IV 7: PCR FaDu 1

Ergebnisse der Analyse der Genexpression von Snail 1, Snail 2, Vimentin und Twist von FaDu-Zellen nach Behandlung mit WSTag1 bzw. WSTag2 per RT-PCR. Angabe als relative Genexpression in Bezug auf unbehandelte Zellen. Median, Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Probe	Snail 1		Snail 2		Vimentin		Twist	
	WSTag1	WSTag2	WSTag1	WSTag2	WSTag1	WSTag2	WSTag1	WSTag2
1	0,71	0,49	2,90	3,19	0,98	0,79	0,57	0,91
2	0,71	0,83	3,12	2,65	1,04	0,76	0,65	0,73
3	0,73	0,81	2,99	3,24	0,85	0,72	0,98	1,29
4	1,12	1,13	1,89	2,20	1,58	1,55	0,23	0,63
5	1,16	1,19	1,95	2,19	1,59	1,82	1,19	1,04
6	1,20	1,21	2,07	2,12	1,61	1,81	1,19	1,17
7	0,65	0,58	1,48	1,30	1,55	1,65	0,70	0,82
8	0,62	0,68	1,23	1,44	1,32	1,76	1,66	1,68
9	0,59	0,66	1,14	1,24	1,47	1,81	1,22	1,48
10	1,27	1,16	2,13	1,97	3,53	2,30	0,54	0,65
11	1,29	1,16	2,21	1,96	3,70	2,43	1,12	1,50
12	1,33	1,43	1,97	1,91	3,32	2,33	0,93	1,17
13	0,96	0,66	0,93	0,68	0,20	0,47	9,00	15,87
14	0,88	0,78	0,87	0,64	0,19	0,43	1,46	1,36
15	0,90	0,64	0,97	0,53	0,19	0,62	1,45	0,73
16	2,12	1,15	2,68	1,96	8,18	5,71	1,60	1,05
17	1,82	1,20	2,50	2,17	8,64	5,26	1,37	1,48
18	1,51	1,19	2,21	2,14	8,11	6,24	1,17	1,59
19	1,16	0,86	1,37	1,81	8,08	9,55	0,81	0,30
20	0,85	1,00	1,46	1,95	8,11	9,38	0,87	0,34
21	0,97	0,97	1,60	1,98	7,88	9,70	0,93	0,65
22	0,95	0,67	1,14	1,01	3,43	1,66	0,95	0,86
23	0,78	0,75	1,14	1,02	3,05	1,19	1,58	0,83
24	0,99	0,77	1,25	1,09	2,99	1,46	1,22	1,07
25	1,14	1,11	2,07	2,33	3,53	2,30	0,79	0,80
26	1,11	1,15	1,91	2,30	3,70	2,43	0,59	1,72
27	1,16	1,28	1,89	2,33	3,32	2,33	1,33	1,39
28	1,74	1,83	2,20	2,55	1,87	2,02	0,54	0,65
29	1,52	1,93	2,39	2,12	1,88	2,12	1,12	1,50
30	1,49	2,04	2,31	2,59	1,88	2,12	0,93	1,17
Median	1,12	1,06	1,93	1,98	2,43	1,92	1,05	1,06
Mittelwert	1,11	1,04	1,87	1,89	3,26	2,82	1,29	1,55
SD	0,37	0,39	0,63	0,70	2,71	2,67	1,50	2,73

APPENDIX

Tabelle IV 8: PCR FaDu 2

Ergebnisse der Analyse der Genexpression von E-Cadherin und N-Cadherin von FaDu-Zellen nach Behandlung mit WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2} per RT-PCR. Angabe als relative Genexpression in Bezug auf unbehandelte Zellen. Median, Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Probe	E-Cadherin		N-Cadherin	
	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}
1	0,76	0,79	1,29	1,37
2	0,78	0,67	0,98	1,38
3	0,73	0,74	1,10	1,55
4	0,57	0,69	0,69	0,58
5	0,63	0,73	0,81	0,72
6	0,73	0,96	0,71	0,63
7	0,82	0,46	1,61	0,77
8	0,85	0,48	1,38	0,72
9	0,93	0,50	1,24	0,77
10	0,34	0,54	1,29	0,18
11	0,48	0,51	1,21	0,86
12	0,42	0,59	1,22	0,81
13	6,00	3,60	3,44	2,41
14	5,47	2,74	3,49	2,17
15	4,96	2,28	3,84	2,13
16	0,69	0,96	1,13	1,32
17	0,69	0,90	0,99	1,29
18	0,76	1,06	0,94	1,22
19	0,36	0,51	0,77	0,63
20	0,36	0,38	0,78	0,70
21	0,36	0,39	0,68	0,65
22	1,00	0,74	0,66	0,82
23	0,95	0,77	0,81	0,93
24	0,86	0,86	0,73	0,82
25	0,84	0,70	2,17	1,70
26	0,85	0,71	2,32	1,81
27	0,78	0,78	2,16	1,72
28	0,34	0,54	1,29	0,18
29	0,48	0,51	1,21	0,86
30	0,42	0,59	1,22	0,81
Median	0,75	0,71	1,21	0,84
Mittelwert	1,14	0,89	1,41	1,08
SD	1,49	0,72	0,86	0,57

APPENDIX

Tabelle IV 9: PCR HlaC78 1

Ergebnisse der Analyse der Genexpression von Snail 1, Snail 2, Vimentin und Twist von HlaC78-Zellen nach Behandlung mit WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2} per RT-PCR. Angabe als relative Genexpression in Bezug auf unbehandelte Zellen. Median, Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Probe	Snail 1		Snail 2		Vimentin		Twist	
	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}
1	1,06	1,11	1,40	1,78	2,49	1,81	0,45	0,47
2	0,94	1,10	1,41	1,78	2,42	2,02	0,94	0,92
3	0,93	1,22	1,21	1,74	2,70	1,82	0,93	0,68
4	1,55	1,29	0,81	2,19	2,95	1,60	0,19	0,19
5	1,54	1,29	2,54	2,02	3,28	4,02	0,46	0,34
6	1,44	1,41	1,54	2,06	2,93	2,65	0,32	0,26
7	1,23	1,39	3,38	3,73	3,09	2,09	0,85	0,31
8	1,34	1,28	3,38	3,95	3,37	2,12	1,64	1,54
9	1,34	1,53	3,67	3,37	3,26	2,10	1,43	1,33
10	0,72	0,77	1,50	1,34	2,05	1,88	0,83	1,13
11	0,71	0,87	1,43	1,47	1,30	1,50	0,87	1,14
12	0,72	1,09	1,46	1,45	1,43	1,62	0,95	1,30
13	0,93	0,77	1,19	1,61	1,79	2,76	0,64	1,81
14	0,87	0,77	1,22	1,52	1,64	2,84	1,86	1,77
15	0,95	0,85	1,22	1,37	1,78	2,72	3,21	3,87
16	1,27	1,46	1,66	1,34	2,92	2,08	0,23	1,04
17	1,39	1,65	1,68	1,40	2,89	1,89	0,91	1,66
18	1,47	1,62	1,86	1,38	2,42	2,14	0,96	1,87
19	2,69	3,79	3,88	6,09	4,41	4,26	0,99	1,29
20	2,78	0,96	3,95	5,48	3,97	4,10	1,57	3,08
21	2,54	7,74	4,17	11,24	4,14	4,05	1,92	2,02
22	0,90	0,61	1,78	2,09	3,90	4,91	0,13	0,22
23	0,90	0,55	1,87	2,16	2,76	5,04	0,59	0,81
24	0,86	0,57	1,90	2,01	4,23	4,65	0,61	0,80
25	1,74	1,83	2,20	2,55	1,87	2,02	0,61	0,86
26	1,52	1,93	2,39	2,12	1,88	2,12	1,09	0,71
27	1,49	2,04	2,31	2,59	1,88	2,12	1,09	1,32
28	0,90	0,61	1,78	2,09	3,90	4,91	0,56	0,78
29	0,90	0,55	1,87	2,16	2,76	5,04	1,74	1,73
30	0,86	0,57	1,90	2,01	4,23	4,65	2,15	1,31
Median	1,14	1,16	1,82	2,04	2,82	2,13	0,92	1,14
Mittelwert	1,28	1,44	2,08	2,60	2,82	2,92	1,02	1,22
SD	0,56	1,36	0,93	2,00	0,91	1,25	0,67	0,82

APPENDIX

Tabelle IV 10: PCR HLaC78 2

Ergebnisse der Analyse der Genexpression von E-Cadherin und N-Cadherin von HLaC78-Zellen nach Behandlung mit WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2} per RT-PCR. Angabe als relative Genexpression in Bezug auf unbehandelte Zellen. Median, Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Probe	E-Cadherin		N-Cadherin	
	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}	WS _{Tag1}	WS _{Tag2}
1	0,81	0,74	0,79	1,07
2	0,84	0,71	0,92	1,17
3	0,84	0,71	0,82	1,12
4	0,86	0,92	0,76	2,26
5	0,97	1,09	3,17	2,26
6	0,86	1,02	2,65	2,27
7	0,63	0,40	1,01	0,44
8	0,58	0,41	0,78	0,42
9	0,57	0,42	0,74	0,43
10	0,54	0,59	0,55	0,83
11	0,54	0,57	0,55	0,67
12	0,43	0,62	0,60	0,68
13	1,39	0,96	1,96	1,52
14	1,32	1,06	1,80	1,64
15	1,22	1,21	1,56	1,37
16	0,44	1,48	0,64	1,29
17	0,10	1,37	0,94	1,10
18	0,77	1,52	0,87	1,20
19	0,71	1,17	1,18	1,35
20	0,66	1,16	1,28	1,75
21	0,72	1,20	1,15	1,36
22	0,47	0,77	0,48	0,62
23	0,45	0,75	0,47	0,61
24	0,49	0,87	0,46	0,58
25	0,54	0,73	0,76	0,84
26	0,52	0,67	0,78	0,86
27	0,49	0,73	0,79	0,88
28	1,17	0,52	1,18	0,83
29	1,17	0,70	1,25	0,62
30	1,13	0,80	1,11	0,87
Median	0,69	0,76	0,84	0,97
Mittelwert	0,74	0,86	1,07	1,10
SD	0,31	0,31	0,63	0,53

IV.E Spheroid**Tabelle IV 11: Spheroid FaDu**

Ergebnisse der Untersuchung der Invasionsfläche in die Umgebung von FaDu-Zellen nach Behandlung mit WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2}. Angabe als Fläche in mm². Median, Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Probe	ohne WS	WS _{Tag 1}	WS _{Tag 2}
1	1,91	0,98	1,59
2	2,34	1,42	1,34
3	2,54	2,17	3,05
4	1,55	2,25	2,79
5	0,78	3,04	3,20
6	0,55	1,33	2,68
7	0,52	1,63	2,80
8	0,65	1,17	2,53
9	0,87	1,35	2,65
10	0,92	0,77	0,68
11	1,03	0,89	0,75
12	0,78	0,69	0,71
13	1,26	1,57	2,22
14	0,70	2,90	3,03
15	0,99	1,51	2,32
16	0,80	1,65	2,44
17	1,03	1,54	1,79
18	0,94	1,42	1,96
19	1,68	2,04	0,92
20	1,38	1,51	1,99
21	1,46	2,61	2,43
22	1,23	2,26	3,00
23	1,58	3,26	3,10
24	1,63	3,29	2,55
25	1,22	2,46	1,79
26	1,67	1,65	2,39
27	1,44	2,73	1,86
28	1,79	1,72	1,57
29	0,30	3,06	2,01
30	0,23	2,61	1,60
Median	1,12	1,65	2,27
Mittelwert	1,19	1,92	2,12
SD	0,56	0,76	0,74

APPENDIX

Tabelle IV 12: Spheroid HLaC78

Ergebnisse der Untersuchung der Invasionsfläche in die Umgebung von HLaC78-Zellen nach Behandlung mit WS_{Tag1} bzw. WS_{Tag2}. Angabe als Fläche in mm². Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Probe	ohne WS	WS _{Tag 1}	WS _{Tag 2}
1	1,81	2,66	3,42
2	2,61	1,85	3,37
3	2,74	3,76	2,42
4	1,74	4,44	3,06
5	0,22	3,00	3,97
6	0,16	2,36	3,72
7	1,63	1,47	3,85
8	2,31	1,40	3,92
9	1,28	1,31	3,36
10	0,83	0,65	0,12
11	0,96	0,98	0,12
12	1,48	2,38	2,15
13	1,15	1,41	0,98
14	0,19	1,70	1,11
15	0,76	1,17	2,28
16	0,71	1,72	1,01
17	0,62	0,94	1,64
18	0,86	1,22	3,03
19	0,66	0,77	1,02
20	0,32	1,16	1,48
21	0,82	1,28	3,19
22	0,74	1,39	3,08
23	0,73	1,39	1,58
24	0,67	1,71	1,60
25	0,58	2,06	1,14
26	0,67	3,10	2,12
27	1,46	3,08	2,43
28	1,03	2,26	3,85
29	0,72	3,14	1,92
30	1,64	2,90	2,13
Median	0,83	1,70	2,22
Mittelwert	1,07	1,95	2,30
SD	0,68	0,94	1,14

V Patientinnen und Patienten

Tabelle V 1: Liste der untersuchten Patientinnen und Patienten mit Geschlecht und Alter

1	weiblich	81 Jahre
2	männlich	78 Jahre
3	männlich	67 Jahre
4	männlich	63 Jahre
5	männlich	56 Jahre
6	männlich	60 Jahre
7	männlich	61 Jahre
8	männlich	88 Jahre
9	männlich	68 Jahre
10	weiblich	51 Jahre

VI Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bedanken bei:

- Herrn Univ.-Professor Dr. med. Dr. h.c. Rudolf Hagen für die Möglichkeit, diese Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastischen und ästhetischen Operationen der Universität Würzburg durchführen zu können.
- Herrn Univ.-Professor Dr. med. Norbert Kleinsasser, MHBA, meinem Doktorvater, für die interessante Themenstellung, stetige Motivation und Förderung meiner Arbeit.
- meinen Betreuern, Herrn PD Dr. med. Agmal Scherzad, Herrn Prof. Dr. med. Stephan Hackenberg und insbesondere Herrn Dr. med. Till Meyer, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.
- Herrn Michael Kessler für seine geduldige Hilfe bei labortechnischen Fragen und seine Kollegialität.
- den Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe und dem Laborteam um Frau Petra Joa.
- den Assistentinnen und Assistenten der Klinik und Poliklinik für Hals-, -Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastischen und ästhetischen Operationen der Universität Würzburg für die Hilfe bei der Gewinnung des WS.
- Julia Seidl für den sprachlichen Feinschliff.
- meiner Mutter und meiner Schwester für die aufmerksamen Anmerkungen.
- meiner Familie und meinen Freunden für die unermüdliche Unterstützung, Geduld und Motivation bei der Erstellung dieser Arbeit.

APPENDIX

VII Lebenslauf

VIII Publikation

Scherzad Agmal, Gehrke Thomas, Meyer Till, Ickrath Patrick, Bregenzer Maximilian, Eiter Rafael et al. (2019) Wound fluid enhances cancer cell proliferation via activation of STAT3 signal pathway in vitro, *Oncol Rep* 41: S. 2919–2926. DOI: 10.3892/or.2019.7047.