

**Die Analyse der Inhibition des  
Monozyten chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1) und der  
Stimulation durch MCP-1 auf die Koloniebildung und die  
Zytokinexpression von Plattenepithelkarzinomen der  
Kopf-Hals-Region im FLAVINO-Assay**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von: Carolin Körner  
Geburtsdatum / Geburtsort: 20.01.1988 in Zwickau

Angefertigt an: der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig,  
Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde/  
Plastische Operationen

Betreuer: Prof. Dr. med. A. Dietz, Dr. rer. nat. G. Wichmann

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 21.04.2015

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einführung</b>	01
1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region	01
1.1.1 Epidemiologie der HNSCC	01
1.1.2 Risikofaktoren der HNSCC	01
1.1.3 Molekularbiologische Merkmale der HNSCC	02
1.2 Biomarker	03
1.2.1 Zytokine	03
1.2.1.1 Interleukine	04
1.2.1.1.1 Interleukin-6 (IL-6)	04
1.2.1.2 Wachstumsfaktoren	05
1.2.1.2.1 <i>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</i>	05
1.2.1.3 Chemokine	06
1.2.1.3.1 Interleukin-8 (IL-8)	07
1.2.1.3.2 Monozyten chemotaktisches Protein-1 (MCP-1)	08
1.2.2 Angiogenese und Tumorangiogenese	09
1.3 Therapie der HNSCC	11
1.3.1 Chemotherapie	11
1.3.1.1 Charakterisierung der verwendeten Zytostatika	11
1.3.1.1.1 Cisplatin	12
1.3.1.1.2 Docetaxel	12
1.3.1.1.3 Cilengitide	12
1.3.1.1.4 Temsirolimus	13
1.3.2 Die Wirkstärke eines Pharmakons	14
1.4 Die Rationale für diese Dissertation	15
1.5 Aufgabenstellung und aufgestellte Hypothesen	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Patienten	17
2.1.1 Ethikvotum	17
2.1.2 Einschlusskriterien	17
2.1.3 Patientencharakteristik	17
2.2 Material	20
2.3 Methoden	23
2.3.1 Experimenteller Aufbau dieser Arbeit	23

2.3.2	Flavinschützende Bedingungen	24
2.3.3	Herstellung der Stammlösungen	24
2.3.3.1	Stammlösungen der Zytostatika	24
2.3.3.1.1	Cisplatin (Cis)	24
2.3.3.1.2	Docetaxel (DTX)	24
2.3.3.1.3	Cilengitide (Cil)	25
2.3.3.1.4	Temsirolimus (Tem)	25
2.3.3.2	Stammlösungen der Enzyme und Antikörper	25
2.3.3.2.1	Collagenase	25
2.3.3.2.2	Trypsin	25
2.3.3.2.3	MCP-1	25
2.3.3.2.4	Anti-MCP-1-Antikörper	25
2.3.3.2.5	Cy2™-Antikörper	25
2.3.3.3	Stammlösungen der Beschichtungen	26
2.3.3.3.1	humanes Fibronectin (hF)	26
2.3.3.3.2	Kollagen (K)	26
2.3.3.3.3	Laminin (L)	26
2.3.3.4	Kulturmedien	26
2.3.3.4.1	Tumormedium	26
2.3.3.4.2	KB-Zell-Kulturmedium	26
2.3.3.5	Sonstige Stammlösungen	26
2.3.3.5.1	<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	26
2.3.3.5.2	SDS/ DMF	26
2.3.3.5.3	MTT ( <i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid</i> )	27
2.3.4	FLAVINO-Assay	27
2.3.4.1	Beschichtungen der Zellkulturplatten	27
2.3.4.2	Probengewinnung	27
2.3.4.3	Probeneingang	27
2.3.4.4	Aufarbeitung der Blutproben	27
2.3.4.5	Aufarbeitung der Tumorproben und Kollagenaseverdau	28
2.3.4.6	Abstoppen des Kollagenaseverdau	28
2.3.5	<i>Ex-vivo-Chemoresponse-Testung in Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten (6-Well-Ansatz)</i>	29
2.3.5.1	Untersuchung des Einflusses von Zytostatika auf die Zytokinexpression von HNSCC <i>ex vivo</i>	29

2.3.5.2	Untersuchung des Einflusses der Stimulation durch MCP-1 und der MCP-1-Inhibition auf die Zytokinexpression von HNSCC <i>ex vivo</i>	29
2.3.5.3	Abstoppen des Tumorwachstums und Entnahme der Kulturüberstände	29
2.3.6	<i>Ex-vivo-Chemoresponse</i> -Testung in Zellkulturplatten mit 48 Kavitäten (48-Well-Ansatz)	30
2.3.6.1	Testung der Zytostatika-Effekte auf die Koloniebildung unter Stimulation durch MCP-1 und MCP-1-Inhibition	30
2.3.6.2	Abstoppen des Tumorwachstums und Entnahme der Kulturüberstände	30
2.3.6.3	Fixierung der Kolonien	30
2.3.6.4	Anfärben der Kolonien	31
2.3.6.5	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Koloniebildung	31
2.3.7	KB-Zell-Kontrolltest	32
2.3.7.1	Die KB-Zelllinie	32
2.3.7.2	Kultivierung der KB-Zellen	33
2.3.7.3	Zelldichtebestimmung	33
2.3.7.4	<i>Ex-vivo-Chemoresponse</i> -Testung an KB-Zellen	33
2.3.8	MTT-Vitalitätstest	34
2.3.9	ELISA ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )	35
2.3.9.1	Funktionsprinzip	35
2.3.9.2	Beschichtung	35
2.3.9.3	Waschen der Platten	35
2.3.9.4	Blocken	35
2.3.9.5	Inkubation der Proben und Standards	36
2.3.9.6	Detektionssystem	36
2.3.9.7	Inkubation des Detektionssystems	36
2.3.9.8	Farbreaktion	36
2.3.9.9	Messung der Extinktion	37
2.3.10	Recherche der Patientencharakteristik	37
2.3.11	Statistische Auswertung	37
2.3.12	Bestimmung der Interaktionsmechanismen in den Kombinationsexperimenten zur Stimulation durch MCP-1 und Inhibition von MCP-1	38
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Zytokinquantifizierung in Patientenseren	39

3.1.1	Deskriptive Statistik der Zytokinquantifizierung in Patientenseren	39
3.1.2	Vergleichende Statistik der Zytokinexpression in Patientenseren in Abhängigkeit der Patientencharakteristik	39
3.1.3	Vergleich der Zytokinexpression in Patientenseren und Kulturüberständen	41
3.2	<i>Ex-vivo-Chemoresponse</i> -Testung in Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten (6-Well-Ansatz)	41
3.2.1	Untersuchung der Zytokinexpression in Kulturüberständen in Abhängigkeit der Patientencharakteristik	42
3.2.2	Untersuchung des Einflusses der getesteten Zytostatika auf die Zytokinproduktion in HNSCC <i>ex vivo</i>	42
3.2.3	Untersuchung des Einflusses der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 auf die Zytokinexpression in HNSCC <i>ex vivo</i>	48
3.2.3.1	Deskriptive Statistik	48
3.2.3.2	Vergleichende Statistik	49
3.3	<i>Ex-vivo-Chemoresponse</i> -Testung in Zellkulturplatten mit 48 Kavitäten (48-Well-Ansatz)	51
3.3.1	Deskriptive Statistik	51
3.3.2	Vergleichende Statistik	57
3.3.3	Individuelle Betrachtung der Chemoreaktivität der untersuchten Plattenepithelkarzinome im 48-Well-Ansatz	60
3.3.4	Bestimmung korrelierender Effekte in den Kombinationsexperimenten zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1	62
3.3.5	Betrachtung der Interaktionsmechanismen in den Kombinationsexperimenten zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1	64
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1	Zytokinexpression in Patientenseren	67
4.1.1	Zytokinexpression in Patientenseren in Abhängigkeit der Patientencharakteristik	68
4.1.2	Vergleich der Zytokinexpression in Patientenseren und Kulturüberständen	69
4.2	<i>Ex-vivo-Chemoresponse</i> -Testung in Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten (6-Well-Ansatz)	70
4.2.1	Untersuchung der Zytokinexpression in Kulturüberständen in Abhängigkeit der Patientencharakteristik	70
4.2.2	Untersuchung des Einflusses der getesteten Zytostatika auf die Zytokinexpression in HNSCC <i>ex vivo</i>	71
4.2.2.1	Cisplatin	71
4.2.2.2	Docetaxel	71

4.2.2.3	Cilengitide	72
4.2.2.4	Temsirolimus	72
4.2.3	Untersuchung des Einflusses der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 auf die Zytokinexpression in HNSCC <i>ex vivo</i>	73
4.2.3.1	Stimulation von HNSCC durch MCP-1	73
4.2.3.2	MCP-1-Blockade	73
4.3	<i>Ex-vivo-Chemoresponse</i> -Testung in Zellkulturplatten mit 48 Kavitäten (48-Well-Ansatz)	74
4.3.1	Koloniebildung von HNSCC im 48-Well-Ansatz	74
4.3.1.1	Cisplatin	74
4.3.1.2	Docetaxel	74
4.3.1.3	Cilengitide	75
4.3.1.4	Temsirolimus	76
4.3.1.5	MCP-1	76
4.3.1.6	Anti-MCP-1-Antikörper	77
4.3.2	Zytokinexpression von HNSCC im 48-Well-Ansatz	78
4.3.2.1	Cisplatin	78
4.3.2.2	Docetaxel	78
4.3.2.3	Cilengitide	79
4.3.2.4	Temsirolimus	79
4.3.2.5	MCP-1	79
4.3.2.6	Anti-MCP-1-Antikörper	80
4.3.3	Individuelle Betrachtung der Chemoreaktivität der untersuchten Plattenepithelkarzinome im 48-Well-Ansatz	82
4.3.4	Bestimmung korrelierender Effekte in den Kombinationsexperimenten zur Stimulation durch MCP-1 und Inhibition von MCP-1	82
4.3.5	Betrachtung der Interaktionsmechanismen in den Kombinationsexperimenten zur Stimulation durch MCP-1 und Inhibition von MCP-1	83
4.4	MCP-1, IL-6, IL-8 und VEGF als mögliche Biomarker in HNSCC	84
4.5	Die untersuchten Zytokine als mögliche Angriffspunkte neuer Therapien	86
4.5.1	MCP-1	86
4.5.2	VEGF	88
4.5.3	IL-6	89
4.5.4	IL-8	91
4.6	Abschließende Betrachtungen	91

<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung der Arbeit</b>	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>A</b>
<b>8.</b>	<b>Anlagen</b>	<b>H</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>J</b>

## Bibliographische Beschreibung

Körner, Carolin

### **Die Analyse der Inhibition des Monozyten chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1) und der Stimulation durch MCP-1 auf die Koloniebildung und die Zytokinexpression von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region im FLAVINO-Assay**

Universität Leipzig, Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

106 Seiten, 142 Literaturangaben, 32 Abbildungen, 26 Tabellen, 11 Seiten Anhang

Das Monozyten chemotaktische Protein-1 (MCP-1) ist ein CC-Chemokin, das in seiner Rolle als Chemoattraktor auf Monozyten in der Genese von Malignomen eine wesentliche Rolle spielt. Dabei kann es sowohl zur lokalen Tumorabwehr als auch zur Tumorgenese, Tumorangiogenese und Metastasierung beitragen. Die vorliegende Arbeit untersucht die MCP-1-Inhibition und die Stimulation durch MCP-1 auf die Koloniebildung und die Zytokinexpression von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (HNSCC) im FLAVINO-Assay. Dieser ist ein klonogener, qualitätskontrollierter *Ex-vivo*-Koloniebildungsassay, der an der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität Leipzig etabliert und patentiert wurde und unter flavinschützenden Bedingungen durchgeführt wird. Weiterhin wird die Eignung von MCP-1, Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und des *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) als Biomarker in HNSCC, die mithilfe von ELISA in Serien und Kulturüberständen quantifiziert wurden, untersucht. Durch die Stimulation durch MCP-1 und dessen Blockade sowie durch *in vivo* tolerierbare Konzentrationen von Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus wurde die Expression der untersuchten Zytokine in den Kulturüberständen der HNSCC unterschiedlich moduliert. Cisplatin und MCP-1 supprimierten die Koloniebildung signifikant, während unter Docetaxel und Temsirolimus eine insignifikante Reduktion und durch Cilengitide eine insignifikante Stimulation der Koloniebildung beobachtet wurde. Die MCP-1-Blockade durch einen Anti-MCP-1-Antikörper führte zu keiner signifikanten Modulation der Koloniebildung. MCP-1 und der Anti-MCP-1-Antikörper senkten die Zytokinexpression, während bis auf Cisplatin alle Zytostatika die Zytokinexpressionen steigerten. Bezüglich der kombinierten Testung der Zytostatika und der MCP-1-Blockade bzw. Stimulation unterschieden sich die Proben, sodass additive, synergistische und antagonistische Effekte resultierten. Da durch MCP-1 gesteuerte tumorassoziierte Makrophagen das Mikromilieu eines Tumors wesentlich beeinflussen, gebührt diesen ebenfalls eine besondere Aufmerksamkeit. In dieser Arbeit wurden unter MCP-1 antitumoröse Effekte beobachtet, sodass weitere klinische Testungen der antitumorösen Wirkung des MCP-1 auf HNSCC lohnenswert erscheinen. Die individuelle *Chemoresponse*-Testung kann dabei helfen, das biologisch heterogene Verhalten der HNSCC besser zu verstehen. In diesem Sinne wäre die klinische Validierung solcher Testsysteme wertvoll.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKT	Gene, die für Proteinkinasen B kodieren, Onkogene
CCL2	systematische Bezeichnung von MCP-1
CCR2	Rezeptor von CCL2
Cil	Cilengitide
Cis	Cisplatin
DTX	Docetaxel
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC <sub>50</sub>	<i>Exciting Concentration</i> , mittlere stimulierende Konzentration
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ENA-78	CXC-Chemokin, CXCL5
Erk	Abkürzung für <i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i> , Serin/Threonin-Kinasen, die den Mitogen-aktivierten Kinasen (MAP-Kinasen) angehören
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GRO $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	CXC-Chemokine, CXCL1,-2,-3
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i> - Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region
HPV	humanes Papillomavirus
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibiting Concentration</i> , mittlere inhibitorische Konzentration
ICD-O	<i>International Classification of Diseases for Oncology</i>
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
JAK	Januskinase
kD	Kilodalton
KOF	Körperoberfläche
MAPK	MAPKinase, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein-1
Mek	<i>Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase</i>
min	Minute
MIP-1 $\alpha$	<i>Macrophage inflammatory protein-1<math>\alpha</math></i> , CC-Chemokin, CCL3
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MTD	Klinisch maximal tolerable Plasmadosis
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> , durch Rapamycin hemmbare Proteinkinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAP-2	CXC-Chemokin, CXCL7

## Abkürzungsverzeichnis

---

NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> , Transkriptionsfaktor
PEC	Plattenepithelkarzinom
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
Raf	Abkürzung für <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> oder <i>rat fibrosarcoma</i> , Familie von Proteinkinasen, Serin/Threonin-Proteinkinasen
RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted</i> , CCL5
Ras	Proto-Onkogen, das für ein G-Protein codiert, Ras leitet sich von <i>Rat sarcoma</i> ab.
RT	Raumtemperatur
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
Src-Familie	Familie von Tyrosinkinasen, <i>src</i> ist ein Akronym aus <b>sarcoma</b> und <b>cellular</b>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TARC	CC-Chemokin, CCL17
Tem	Temsirolimus
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
TNM	Klassifikation zur Beschreibung der Tumorausdehnung (T), Lymphknotenmetastasierung (N) und Fernmetastasierung (M)
U	Units
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
w/v	Masse/ Volumen
z.B.	zum Beispiel

## 1. Einführung

### 1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

Bei Malignomen der Kopf-Hals-Region handelt es sich überwiegend um Plattenepithelkarzinome. Im englischen Sprachraum werden sie als *head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC) bezeichnet. Folgende anatomische Regionen sind dabei von Interesse: Nase und Nasennebenhöhlen, Mundhöhle (Cavum oris), Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx (Rousseau *et* Badoual 2011, National Cancer Institute 2013).

#### 1.1.1 Epidemiologie der HNSCC

Maligne Tumoren der Mundhöhle und des Rachens machten im Jahr 2008 bei Männern 3,9% aller Krebsneuerkrankung aus und waren damit die fünfthäufigste Krebserkrankung. Diese Tumoren nahmen bei Frauen mit 1,6% den 15. Platz in der Rangliste ein. 90% dieser Tumoren waren Plattenepithelkarzinome. Mit 1,5% rangierten Malignome des Larynx bei Männern in der Auflistung der Krebsneuerkrankungen in Deutschland auf Platz 16, bei Frauen an 22. Stelle. Hierbei handelte es sich fast ausschließlich um Plattenepithelkarzinome. Die 5-Jahresüberlebensraten von Tumoren der Mundhöhle und des Rachens lagen 2008 bei Männern bei 42% und bei Frauen bei 54%. Mit 55% bei Männern und Frauen war die 5-Jahresüberlebensrate der Tumoren des Larynx ähnlich schlecht (Robert-Koch-Institut 2012). Laut Robert-Koch-Institut haben sich die 5-Jahresüberlebensraten der Larynxmalignome trotz medizinischen Fortschritts in den letzten 20 Jahren kaum verbessert (Bertz 2010). Die Inzidenz der Tumoren des Oropharynx, Hypopharynx, Larynx sowie der Mundhöhle hat zwischen 1996 und 2005 bei Männern signifikant zugenommen, während bei Frauen Tumoren des Hypopharynx und der Mundhöhle häufiger beobachtet wurden. Obwohl Tumoren der Kopf-Hals-Region vermehrt in multimodalen Therapieansätzen, bestehend aus Chirurgie, Chemotherapie und Radiotherapie, behandelt werden, hat sich das *Outcome* nicht signifikant verbessert (Guntinas-Lichius *et al.* 2010). Ein Grund hierfür mag die große biologische Heterogenität der Tumoren dieser Region sein.

#### 1.1.2 Risikofaktoren der HNSCC

Die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms der Kopf-Hals-Region hängt unter anderem von der individuellen Suszeptibilität eines Menschen ab. Diese ist geprägt vom genetischen Hintergrund und dem Zusammenwirken von Lebensstil und Risikofaktoren (Dietz *et* Wichmann 2011). Bekannte Risikofaktoren sind Tabak- und Alkoholabusus. Ramroth *et al.* konnten eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Tabak- und Alkoholkonsum und der Inzidenz von Larynxkarzinomen, insbesondere von Karzinomen der Supraglottis, zeigen. Die Reduktion des Tabak- und Alkoholkonsums kann somit zur Prävention dieser Karzinome beitragen (Ramroth *et al.* 2004). Beispielhaft seien hier die USA genannt:

Die Sterberaten durch Tumoren der Mundhöhle und des Pharynx haben bei Männern und Frauen zwischen 1992 und 2008 abgenommen. Dies wird auf erhöhtes Risikobewusstsein und auf eine Verhaltensänderung aufgrund Risiken adressierender Gesundheitskampagnen zurückgeführt (Eheman *et al.* 2012). Schlechte Mund- und Zahnhygiene sind unter anderem verantwortlich für die Entstehung von Oro- und Hypopharynxkarzinomen (Boeninghaus *et Lenarz* 2007). Die Infektion mit humanen Papillomviren, insbesondere des Typs 16 (HPV 16), ist ein Risiko- und Prognosefaktor für Oropharynxkarzinome. Neben Tabak- und Alkoholabusus stellen auch Asbestfaserstäube ein Risiko für die Entstehung eines Asbest-assoziierten Larynxkarzinoms dar (Dietz *et Flentje* 2010).

### 1.1.3 Molekularbiologische Merkmale der HNSCC

Die Tumorgenese von HNSCC stellt einen multifaktoriellen Prozess dar, der durch die Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen charakterisiert ist. Histopathologisch sind Stadien zunehmender Veränderungen ehemals gesunder Mukosa zu beobachten. Aus einer Hyperplasie entsteht eine Dysplasie, die über ein *Carcinoma in situ*, genauer über eine squamöse intraepitheliale Neoplasie 3. Grades (SIN III), zu einem invasiven Karzinom führt. Gleichzeitig steigt die Anzahl genetischer Alterationen (Califano *et al.* 1996). In intraepithelialen Läsionen treten oft Deletionen der Chromosomen 3p und 9p, auf denen Tumorsuppressorgene liegen, auf. Dabei sei p16<sup>INK4a</sup> als Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor genannt, der den Zellzyklus in der G1-Phase stoppt. Alterationen dieser Areale führen somit zu unkontrollierter Zellproliferation (Dietz *et Flentje* 2010, Yavrouian *et Sinha* 2012). In HNSCC wurde auch die Reaktivierung der Telomerase beobachtet. Dieses Enzym verlängert Telomere, die bei jeder Zellteilung physiologischerweise verkürzt werden. Eine erhöhte Telomeraseaktivität wirkt der Zellalterung entgegen, wodurch genetisch alterierte Zellen positiv selektiert werden (Kunicka *et al.* 2008). Weitere beobachtete Alterationen sind die Überexpression von Cyclin D1, wodurch der Zellzyklus verkürzt wird (Wang *et al.* 1995), Mutationen des Tumorsuppressorgens TP53 und des von ihm codierten p53 sowie dessen Regulator MDM2 (*mouse double minute 2*), wodurch Zellen mit DNS-Schäden nicht an der Fortführung des Zellzyklus gehindert werden (Denaro *et al.* 2011), sowie die Überexpression des EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Kalyankrishna *et Grandis* 2006) und *downstream* des EGF-Rezeptors auch die Überexpression des PI3K-AKT-Signalings (Phosphatidylinositol-3-Kinase und Proteinkinase B-Signalweg). Der PI3K-AKT-Signalweg spielt eine wesentliche Rolle in der Kanzerogenese, die jedoch noch nicht vollständig verstanden ist. So stehen am Ende der Signaltransduktion die Invasion und Metastasierung, Proliferation, Proteinsynthese, Antiapoptose und Angiogenese (Psyrris *et al.* 2013). Die Aktivierung mitogen aktivierter Kinasen (MAPK-Signalweg) und die Aktivierung

von Januskinasen und der nachfolgenden *Signal Transducers and Activators of Transcription* (JAK-STAT-Signalweg), insbesondere des JAK-STAT3-Signalwegs, sind in HNSCC und anderen Neoplasien oft überexprimiert (Sansone *et Bromberg* 2012, de Carvalho *et al.* 2013).

### 1.2 Biomarker

Biomarker sind wichtige biologische Moleküle, die zur Verbesserung der Tumordetektion, Prognose und Therapie im Sinne der gezielten Therapie (*targeted therapy*) genutzt werden können. Potentielle Biomarker können Moleküle sein, die eine wichtige Rolle in Prozessen der Tumorgenese, Signaltransduktion und Angiogenese spielen. Auch onkogene Viren können Biomarker sein. Für HNSCC charakteristische biologische Makromoleküle, die in verschiedenen Subgruppen von Tumoren auftreten, können sich potentiell als Biomarker eignen (Yavrouian *et Sinha* 2012). Dabei sind prognostische von prädiktiven Biomarkern zu unterscheiden. Ein prognostischer Biomarker liefert Informationen über das *Outcome* der Krebserkrankung eines Patienten unabhängig von der Therapie. Das Vorhandensein oder Fehlen eines solchen Markers kann für die Patientenselektion bezüglich einer bestimmten Therapie zwar hilfreich sein, sagt jedoch nichts über den Therapieerfolg aus. Ein prädiktiver Biomarker dagegen liefert Informationen über den Effekt einer Therapie und kann somit ein Angriffspunkt von Therapien sein (Oldenhuis *et al.* 2008). Prognostische Biomarker erlauben eine Beurteilung der Prognose im Vergleich zu HNSCC ohne diesen Marker. Dabei können sowohl allgemein bessere Prognosen bei Anwesenheit von beispielsweise HPV16 in Tonsillenzarzinomen als auch allgemein schlechtere Verläufe bei Überexpression des EGFR mit diesen Biomarkern assoziiert sein. Prädiktive Biomarker erlauben einen Rückschluss auf die Eignung einer bestimmten Subgruppe von HNSCC für bestimmte Therapiemodalitäten. Insofern sind die zuvor genannten Biomarker auch prädiktive Biomarker, denn HPV16-positive HNSCC reagieren stärker auf Bestrahlung als andere HNSCC. HNSCC mit Überexpression des EGFR-Signalweges reagieren dagegen stärker auf eine zielgerichtete Therapie gegen EGFR oder dessen Tyrosinkinaseaktivität als HPV16-positive Tumoren. Insofern können Biomarker in HNSCC für die Stratifizierung der Therapie herangezogen werden, um den Therapieerfolg zu erhöhen (Ang *et Sturgis* 2012). Eher offen ist die Frage, ob Zytokine und insbesondere Chemokine als Biomarker bei HNSCC eine Rolle spielen können.

#### 1.2.1 Zytokine

Zytokine sind Mediatoren des Immunsystems. Als Proteine oder Glykoproteine vermitteln sie ihre Wirkung über membranständige Rezeptoren. Der Begriff der Zytokine wird seit 1974 verwendet und subsumiert dabei die Interleukine, Chemokine, Interferone, Lymphokine,

Tumornekrosefaktoren, koloniestimulierende Faktoren und Wachstumsfaktoren (Kirchner *et al.* 1994, Burgis 2008). Zu ihren Funktionen gehören die Regulation der Immunantwort und der Entzündungsreaktion. Zytokine weisen einen Pleiotropismus auf. Das bedeutet, dass sie auf verschiedene Zelltypen wirken. Zum einen haben Zytokine verschiedene Effekte auf dieselbe Zelle. Zum anderen wirken sie auch redundant: Verschiedene Zytokine bewirken denselben Effekt in einer Zelle. Die Wirkung der Zytokine kann autokrin, parakrin oder endokrin erfolgen (Abbas *et al.* 1996). Die teils verwirrende Nomenklatur der Zytokine liegt in der Historie der Erforschung dieser Mediatoren begründet. Der Begriff „Lymphokine“ wurde eingeführt, um Regulatoren der Lymphozytenkommunikation zu beschreiben. Komplementär dazu wurde der Begriff „Monokine“ eingeführt, da sich zeigte, dass auch Monozyten Lymphozyten-aktivierende Faktoren produzieren (Nicola 1997). Da sich die Funktionen der Zytokine teilweise überschneiden, fällt es schwer, eindeutige Definitionen für die einzelnen Subgruppen zu finden. So wird z.B. Interleukin-8 den Interleukinen zugeordnet, gleichzeitig ist es aufgrund seiner chemotaktischen Wirkung auch in die Gruppe der Chemokine einzuordnen (Callard *et al.* 1994). Interleukine, Wachstumsfaktoren und Chemokine sollen nachfolgend genauer betrachtet werden.

### 1.2.1.1 Interleukine

Die Nomenklatur der Interleukine wurde 1979 eingeführt, um eine Gruppe von Mediatoren zu beschreiben, die die Kommunikation zwischen Leukozyten vermitteln (Nicola 1997).

#### 1.2.1.1.1 *Interleukin-6 (IL-6)*

IL-6 spielt als multifunktionales Zytokin eine zentrale Rolle in der Immunantwort. Es wird von Monozyten/ Makrophagen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Mesangiumzellen produziert. IL-6 induziert die Differenzierung der B-Lymphozyten zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Dabei fördert es die Bildung von Antikörpern der Typen IgM, IgG und IgA. Durch IL-6 wird die Phagozytosefähigkeit der Monozyten/ Makrophagen gesteigert. Als inflammatorisches Zytokin induziert es die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in Hepatozyten. IL-6 bewirkt zusammen mit Interleukin-1 die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Helferzellen. Außerdem nimmt es gemeinsam mit Interleukin-2 Einfluss auf die Teilung und Differenzierung zytotoxischer T-Zellen. IL-6 und Interleukin-3 regen Stammzellen zur Proliferation an (Kirchner *et al.* 1994). Auch Stromazellen des Knochens, Keratinozyten und Astrozyten produzieren IL-6 (Callard *et al.* 1994). IL-6 bindet am IL-6-Rezeptor (IL-6R), der aus zwei Membranproteinen besteht. Am IL-6R wird IL-6 gebunden, die Signaltransduktion erfolgt jedoch über gp130. Nach der Bindung am IL-6R erfolgt die Homodimerisation von gp130, das mit einer Tyrosinkinase assoziiert ist, die gp130 phosphoryliert (Nicola 1997). Im Folgenden ist das

JAK-STAT-System an der Signaltransduktion beteiligt. Dieses besteht aus einer Januskinase (JAK) und den *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT). IL-6 kann auch über einen löslichen Rezeptor sIL-6R via *Transsignaling* die Signaltransduktion an gp130 auslösen. Als inflammatorisches Zytokin ist IL-6 an chronisch entzündlichen Prozessen wie der rheumatoiden Arthritis, Asthma und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn, beteiligt. Auch bei Darmkrebs (Scheller *et al.* 2006) und in HNSCC scheint IL-6 eine wichtige Rolle zu spielen (Pries *et Wollenberg* 2006). Monozyten produzieren mehr IL-6, wenn sie mit HNSCC-Proben kokultiviert werden, als Monozyten, die mit gesunder Mukosa kokultiviert werden (Kross *et al.* 2005). IL-6 soll auch an der Entstehung von Knochenmetastasen beteiligt sein, schließlich reguliert es die Knochenhomöostase. Durch Dysregulationen der IL-6-Expression können Störungen dieser Homöostase, wie Osteoporose, entstehen (Tawara *et al.* 2011).

### 1.2.1.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind mitogene Faktoren. Das bedeutet, dass sie die Proliferation von Zellen induzieren können. Nach Bindung eines Wachstumsfaktors am komplementären Rezeptor wird eine Signalkaskade ausgelöst, an deren Ende die Aktivierung bestimmter Gene steht, deren Genprodukte den Zellzyklus steuern. Wichtige Wachstumsfaktoren sind unter anderem hämatopoetische Wachstumsfaktoren, aber auch EGF (*Epidermal Growth Factor*), FGF (*Fibroblast growth factor*), PDGF (*Platelet-derived growth factor*), IGF (*Insulin-like growth factor*) und VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (Lüllmann-Rauch 2006). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die benannten Wachstumsfaktoren häufig weitere Strukturvarianten beinhalten, die durch alternatives Spleißen der RNA oder über Genduplikation evolvierte Gene und Genprodukte repräsentieren, die über gleiche Rezeptoren identische oder ähnliche Signalkaskaden triggern. Insofern finden sich sowohl Redundanz, als auch eine Vielzahl von durch Rezeptorligation ausgelösten Effekten.

#### 1.2.1.2.1 *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*

VEGF ist ein Mitogen für Endothelzellen. Es bewirkt die Chemotaxis gegenüber Monozyten und aktiviert diese. Außerdem erhöht es die Permeabilität von Blutgefäßen und wirkt als Prokoagulant. VEGF wird unter anderem von Zellen der Hypophyse, von Monozyten/Makrophagen, glatten Muskelzellen und Keratinozyten produziert (Callard *et Gearing* 1994). VEGF gehört zu einer Genfamilie, zu der neben VEGFA als Hauptvertreter auch VEGFB, VEGFC, VEGFD und PLGL (*placental growth factor*) gehören (Ferrara *et al.* 2003). VEGFA, -B, -C, -D stimulieren die Angiogenese und erhöhen die Gefäßpermeabilität (Dreys 2010). VEGFA ist der Hauptregulator des Wachstums von Blutgefäßen, während VEGFC und VEGFD die Lymphangiogenese regulieren (Ferrara *et al.* 2003). VEGF wirkt über

membranständige Rezeptoren, die von Endothelzellen, primitiven hämatopoetischen Stammzellen, Monozyten und leukämischen Zellen exprimiert werden. Es gibt drei bekannte VEGF-Rezeptoren: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR) und VEGFR-3 (Flt-4). Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Rezeptor-Tyrosin-Kinasen mit sieben extrazellulären Immunglobulin-Domänen und einer intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne. Nach der Ligandenbindung erfolgt die Rezeptordimersation, Tyrosin-Phosphorylierung, Autophosphorylierung und folgend ein Calciumeinstrom (Callard *et Gearing* 1994). Phosphorylierte Proteine des VEGF-*Signalings* sind unter anderem die Phospholipase C- $\gamma$  (PLC), die PI3K, das *Ras GTPase activating protein* und die Src-Familie. Das Wachstum von Endothelzellen wird über die Aktivierung des Raf-Mek-Erk-Signalwegs realisiert, antiapoptotische Effekte gehen auf den PI3K-AKT-Signalweg zurück. Die überwiegend von Blutgefäß-Endothelzellen exprimierten Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 bedingen die Organisation der Vaskulogenese. VEGFR-3 ist auf Endothelzellen von Lymphgefäßen anzutreffen, woraus sich die Stimulation der Lymphangiogenese ergibt. VEGFA bindet sowohl an VEGFR-1, als auch an VEGFR-2, während PLGF und VEGFB nur an VEGFR-1 binden. VEGFC und VEGFD interagieren mit VEGFR-2 und VEGFR-3 (Ferrara *et al.* 2003). VEGF spielt auch eine entscheidende Rolle in der Tumorangio-genese: Das vom Tumor sezernierte VEGF führt zur Endothelzellmigration, zu deren Proliferation und zur Ausbildung kapillärer Röhrenformationen. Gleichzeitig werden auch endotheliale Proteasen aktiviert, wodurch die Gefäßpermeabilität erhöht wird. Dies ist wiederum eine Voraussetzung für die hämatogene Metastasierung (Dreves 2010). VEGF hat aufgrund der initiierten Angiogenese und Metastasierung eine große Bedeutung in der Entstehung von HNSCC (Pries *et Wollenberg* 2006).

### 1.2.1.3 Chemokine

Chemokine sind Zytokine, die Chemotaxis vermitteln. Diese große Familie strukturell homologer Zytokine mit einer Größe von 8 bis 10 kD führt zu einer zielgerichteten Wanderung von Zellen (Abbas *et al.* 1996). Sie sind Chemoattraktoren für Monozyten, Leukozyten, Neutrophile und weitere Effektorzellen des Blutes und steuern die Wanderung der Lymphozyten und die Angiogenese. Ihre Signaltransduktion erfolgt über G-Proteingekoppelte Rezeptoren, die aus sieben transmembranären Helices aufgebaut sind (Murphy *et al.* 2009). Chemokine und ihre Rezeptoren verhalten sich promiskuitiv. Damit ist gemeint, dass verschiedene Chemokine an verschiedenen Rezeptoren binden und ihre Rezeptoren wiederum unterschiedliche Chemokine binden können (Rollins 1997). Entsprechend ihres molekularen Aufbaus werden die CXC- oder  $\alpha$ -Chemokine, die auf dem menschlichen Chromosom 4 kodiert sind, von den CC- oder  $\beta$ -Chemokinen, die auf dem Chromosom 17 lokalisiert sind, unterschieden. Bei den CXC-Chemokinen werden zwei aminoterminal

Cysteine durch eine weitere Aminosäure voneinander getrennt, bei den CC-Chemokinen liegen die beiden Cysteine dagegen direkt nebeneinander. Während CXC-Chemokine überwiegend Neutrophile anlocken, bewirken CC-Chemokine überwiegend die Chemotaxis von Monozyten (Callard *et al.* 1994).

Ein wichtiger Vertreter der CXC-Chemokine ist Interleukin-8 (IL-8), während das Monozyten chemotaktische Protein-1 (MCP-1) den CC-Chemokinen angehört. Die Chemokine beider Unterfamilien sind in der Lage, an heparinisierte Sulfidoproteoglykane an Endotheloberflächen zu binden, womit sie einen Stimulus für die Chemokinese bilden (damit ist die Leukozytenmotilität gemeint) und somit einen entscheidenden Faktor für die Extravasation von Leukozyten darstellen (Abbas *et al.* 1996). So überführen IL-8 und MCP-1 das „Rollen“ der Leukozyten entlang des Gefäßendothels durch die Konformationsänderung der Leukozytenintegrine in eine stabile Bindung, die die Durchwanderung der Gefäßwand seitens der Leukozyten begünstigt. MCP-1 ist auch für die Monozytenwanderung aus den Blutgefäßen ins Gewebe verantwortlich, wo diese ihrer Funktion als Gewebsmakrophagen nachgehen. Weitere Unterfamilien der Chemokine sind die C-Chemokine und die CX<sub>3</sub>C-Chemokine. Lymphotactin (XCL1) lockt als C-Chemokin T-Zell-Vorläufer über den Rezeptor XCR1 in den Thymus. Fraktalkin, ein Vertreter der CX<sub>3</sub>C-Chemokine, ist ein transmembranäres Adhäsionsmolekül für Leukozyten und bewirkt die Diapedese von dendritischen Zellen in Lymphgefäße (Johnson *et al.* 2013).

### 1.2.1.3.1 Interleukin-8 (IL-8)

IL-8 ist ein inflammatorisches Zytokin, das unter vielen Namen bekannt ist, so z.B. *Neutrophil attractant/ activating protein* (NAP-1), *Neutrophil activating factor* (NAF), *Monoocyte derived neutrophil activating peptide* (MONAP), *Monoocyte derived neutrophil chemotactic factor* (MDNCF), *Granulocyte chemotactic protein* (GCP) und *Leucocyte adhesion inhibitor* (LAI). Aus diesen Bezeichnungen geht die wesentliche Funktion des IL-8 hervor, nämlich die Chemotaxis gegenüber Neutrophilen, weswegen IL-8 auch zu den Chemokinen, genauer zu den CXC-Chemokinen, gezählt wird. IL-8 wird von Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Hepatozyten, Chondrozyten, Mesangiumzellen und bronchialen Epithelzellen produziert. Es bindet am IL-8-Rezeptor, einem G-Proteingekoppelten Rezeptor der Rhodopsin-Superfamilie mit sieben transmembranären Helices, der von Neutrophilen, Basophilen, Eosinophilen, Lymphozyten, Monozyten, Endothelzellen und Erythrozyten exprimiert wird. Die Signaltransduktion erfolgt über einen intrazellulären Calciumanstieg. Durch Inhibition der Phosphokinase C (PKC) kann die IL-8 bedingte Neutrophilenaktivierung gehemmt werden (Callard *et al.* 1994). IL-8 bindet am CXCR1 (IL-8RA) allein und auch am CXCR2 (IL-8RB), an dem auch GRO- $\alpha$ , GRO- $\beta$ , GRO- $\gamma$ , NAP-2 und ENA-78 binden können (Rollins 1997). IL-8 besitzt multiple Wirkungen: Neutrophile

werden angelockt, verändern ihre Form, degranulieren, vollziehen einen „*respiratory burst*“ und weisen nach Aktivierung durch IL-8 eine erhöhte Adhäsion am Endothel auf. Letzteres trifft auch auf Monozyten zu. Auf T-Zellen und Basophile wirkt IL-8 ebenfalls chemotaktisch und bewirkt bei Basophilen zudem die Histamin- und Leukotrienfreisetzung. Keratinozyten und Endothelzellen proliferieren unter IL-8-Einfluss, unreife myeloische Vorläuferzellen werden dagegen supprimiert. IL-8 und andere  $\alpha$ -Chemokine tragen über die Leukozytenakkumulation zu Entzündungsprozessen bei (Nicola 1997). So finden sich z.B. erhöhte IL-8-Konzentrationen in der Gelenkflüssigkeit von rheumatoider Arthritis betroffener Gelenke (Koch *et al.* 1992a, Loetscher *et al.* 1994). Als angiogener Faktor fördert IL-8 die Vaskularisation im Rahmen der Wundheilung und der Tumorangio-genese (Koch *et al.* 1992b). Aufgrund der IL-8 induzierten Angiogenese wird IL-8 auch in HNSCC eine entscheidende Rolle zugesprochen (Pries *et Wollenberg* 2006).

### 1.2.1.3.2 *Monozyten chemotaktisches Protein-1 (MCP-1)*

Humanes MCP-1 (CCL2) ist ein zur Gruppe der CC-Chemokine gehörendes basisches Protein mit einer Länge von 76 Aminosäuren. Es wurde zunächst als LDCF (*lymphocyte derived chemotactic factor*) beschrieben. Weitere Bezeichnungen sind TDCF (*tumour cell-derived chemotactic factor*), GDCF (*glioma-derived monocyte chemotactic factor*), SMC-CF (*smooth muscle cell-derived chemotactic factor*) und MCAF als *monocyte chemotactic and activating factor*. Mit diesen Bezeichnungen wird die wesentliche Funktion des MCP-1 beschrieben, nämlich die Chemotaxis gegenüber Monozyten zu Orten einer Inflammation (Nicola 1997). Auch Basophile werden von MCP-1 angelockt. MCP-1 wird von Monozyten, T-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Keratinozyten und auch Tumorzellen produziert (Callard *et Gearing* 1994). So wurde MCP-1 in Ovarialkarzinomen (Negus *et al.* 1995), Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Koide *et al.* 2004) und auch in HNSCC (Kross *et al.* 2005) nachgewiesen. MCP-1 soll zudem ein entscheidender Faktor für die Fernmetastasierung fortgeschrittener Kolonkarzinome darstellen (Wolf *et al.* 2012). Wichtige Funktionen besitzt MCP-1 in Entzündungsprozessen: Im Rahmen der rheumatoiden Arthritis unterstützt es die Entzündungsreaktion über die Rekrutierung von Monozyten (Koch *et al.* 1992a, Hayashida *et al.* 2001). Seine physiologische Funktion erfüllt MCP-1 auch in der Angiogenese (Niu *et al.* 2008). Dort unterstützt es unter anderem die Bildung von Kollateralen (Carmeliet 2003). MCP-1 wird im Zusammenhang mit der Entstehung der Arteriosklerose diskutiert. In arteriosklerotisch veränderten Gefäßen sind MCP-1 und sein Rezeptor CCR2 hochreguliert. Die dadurch induzierte Monozyteninvasion in die Gefäßwand unterhält die Entstehung der Arteriosklerose (Zernecke *et Weber* 2010). MCP-1 bindet an den Rezeptoren CCR2, an dem auch MCP-2, -3 und MCP-4 binden (Rodriguez-Frade *et al.* 2000), sowie am CCR4, an dem auch MIP-1 $\alpha$ , RANTES und TARC

binden (Rollins 1997). CCR2 wird von Monozyten/ Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, NK-Zellen, aber auch Basophilen, Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert. Durch alternatives Spleißen der CCL2-mRNA entstehen die zwei Rezeptortypen CCR2A und CCR2B (Rodriguez-Frade *et al.* 2000). Vaskuläre glatte Muskelzellen exprimieren den CCR2A; CCR2B wird überwiegend von Monozyten und aktivierten NK-Zellen exprimiert (Ansari *et al.* 2011). CCR2 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der aus sieben transmembranären Helices besteht. Das aminoternale Ende liegt außerhalb der Zelle und ist für die Ligandenbindung zuständig, während der carboxyterminale Teil intrazellulär liegt und an der Signaltransduktion beteiligt ist. Nach der Ligandenbindung erfolgt die Rezeptordimerisierung, die zur Auslösung des JAK-STAT-Signalwegs führt, wodurch eine veränderte Genexpression resultiert. Über die Aktivierung eines G-Proteins werden die MAPK, PLC und PI3K aktiviert. Dies wiederum bewirkt Chemotaxis und Zelladhäsion. Über die Aktivierung von GRK/ Arrestin erfolgt die Rezeptorinternalisation (Rodriguez-Frade *et al.* 2000).

### 1.2.2 Angiogenese und Tumorangiogenese

Blutgefäße können durch Vaskulogenese, Angiogenese, Intussuzeption oder *Vascular mimicry* entstehen. Die Vaskulogenese ist die *de novo* Synthese von Blutgefäßen aus endothelialen Progenitorzellen, die tubuläre Strukturen bilden und somit in Ischämiegebieten VEGF-getriggert zur Gefäßneubildung führen. Dagegen ist die Angiogenese das Wachstum von Blutgefäßen aus bereits existierenden Gefäßen, wobei die Migration und Proliferation bereits differenzierter Endothelzellen entscheidend sind. Chemokine nehmen darauf einen wesentlichen Einfluss. Blutgefäße können auch durch Intussuzeption, der Teilung bestehender Blutgefäße, entstehen, wobei die Basalmembran hier nicht aufgelöst wird. Eine erfolgreiche Angiogenese setzt die Interaktionen zwischen Endothelzellen, Perizyten, umgebenden Zellen, extrazellulärer Matrix und der vaskulären Basalmembran voraus. Hypoxie ist ein starker angiogener Stimulus. In hypoxischem Gewebe werden Sauerstoff registrierende Mechanismen aktiviert. Dazu gehören die HIFs (*Hypoxia inducible factors*), die als Transkriptionsfaktoren die Hochregulation der Genexpression proangiogener Faktoren wie VEGFA bewirken (Pugh *et al.* 2003, Gibbons 2010). Zu Beginn der Angiogenese kommt es durch lösliche und zellgebundene Matrixmetalloproteinasen (MMP) zur Degradation der Basalmembran und dem Auflösen der Zellkontakte zwischen Endothelzellen. Es folgt die Zellpenetration durch die Basalmembran, wodurch die penetrierenden Zellen Kontakt zum interstitiellen Kollagen erhalten und somit eine Signalkaskade ausgelöst wird, in der VEGFA als ein potenter angiogener Faktor eine entscheidende Rolle spielt (Chung *et al.* 2010). VEGFA lockt Endothelzellen entlang eines Konzentrationsgradienten in avaskuläre Regionen. Dieser Gradient führt zur

Ausbildung eines Zellschlauches mit einer Spitze. Endothelzellen differenzieren sich durch VEGFA zu sogenannten „*tip-cells*“, die den Weg für die Gefäßneubildung navigieren. Das Gefäßlumen wird durch die sich strangförmig ausrichtenden „*stalk cells*“ gebildet, die den durch die „*tip cells*“ vorgegebenen Weg nachempfinden (Dreves 2010). Dadurch bildet sich ein Gefäßschlauch, dessen Zellen durch *tight junctions* verbunden sind. Von den „*tip cells*“ werden Matrixmetalloproteinasen produziert, die die umgebende Matrix eröffnen. Erneuter Zellkontakt zwischen Endothelzellen und Perizyten induziert die Bildung von Inhibitoren der MMPs, die somit herunterreguliert werden. Endothelzellen und umgebende Zellen produzieren nun Laminin, Perlecan, Kollagen und Nidogen als Bestandteile der Basalmembran. Die jungen Gefäße reifen somit zu Kapillaren heran (Chung *et Ferrara* 2010). Ist die Perfusion des Gefäßes durch ausreichende Stabilisierung erreicht, steigt der Sauerstoffgehalt des umgebenden Gewebes, wodurch folgend die VEGFA-Konzentration sinkt. Damit ist der Zyklus der Angiogenese zunächst beendet (Darland *et D'Amore* 1999). Neben bekannten physiologischen Prozessen ist die Angiogenese auch für die Entwicklung von Tumoren entscheidend. Im Rahmen des *Vascular mimicry* können Tumoren selbst Blutgefäße ausbilden. Die Gefäßauskleidung stellt dann ein Mischbild aus Tumor- und Endothelzellen dar. Tumorgefäße unterscheiden sich von normalen Blutgefäßen: Während normale Blutgefäße im Ruhezustand eine geringe Proliferationsrate aufweisen, überwiegen bei Tumorgefäßen proangiogene Faktoren. Insgesamt ist das Tumorgefäßsystem zwar stark verzweigt, aber dadurch auch unstrukturiert bei fehlender Gefäßhierarchie. Aufgrund des Fehlens der *Lamina muscularis* und stabilisierender Perizyten sind Tumorgefäße instabil, dünnwandig, passiv dilatiert und weisen eine hohe Permeabilität auf, wodurch die hämatogene Metastasierung begünstigt wird. Auch in Tumoren wird durch Hypoxie die Tumorangiogenese induziert, nämlich dann, wenn die Neoplasie zu groß ist (ca. 2 mm<sup>3</sup>), um sich über Diffusion vom umgebenden Gewebe zu ernähren. Die Sekretion proangiogener Faktoren steigt dann an, wofür der Begriff „angiogener *Switch*“ steht. Ist der Tumor ausreichend vaskularisiert, steigt auch die Proliferation der Tumorzellen und es werden durch das Einschwemmen von Tumorzellen in die Blutbahn hämatogene Metastasen begünstigt. Demnach sind das Wachstum, die Metastasierung und der Progress der Tumorerkrankung abhängig von der vom Tumor betriebenen Angiogenese (Dreves 2010). Letztlich ist die Angiogenese während reaktiver und pathologischer Prozesse an eine Inflammation gebunden, an der Makrophagen und dendritische Zellen beteiligt sind. Diese produzieren Wachstumsfaktoren und Zytokine, die sowohl proangiogene, als auch antiangiogene Wirkungen besitzen (David Dong *et al.* 2009). Strauss *et al.* haben die Tumorangiogenese der HNSCC im Mausmodell untersucht. Sie haben die Hypothese aufgestellt, dass die Makrophageninvasion in den Tumor eine Schlüsselrolle darstellt, da Makrophagen über die Expression von VEGFA die Angiogenese induzieren. Strauss *et al.*

untersuchten die Hemmung der Makrophageninvasion durch Retinsäure. Mit Retinsäure behandelte Mäuse zeigten eine Tumorregression und einen Rückgang der MCP-1- und VEGFA-Expression im Serum. Um die Tumorangiogenese zu hemmen, sei demnach eine Inhibition der Makrophageninvasion nötig (Strauss *et al.* 2005).

### 1.3 Therapie der HNSCC

Die klassischen Säulen der Therapie von HNSCC sind Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie. Zur Verbesserung des Therapieerfolgs ist es nötig, von einer begrenzt wirksamen Monotherapie auf multimodale Therapiekonzepte umzusteigen. Dieses Konzept vereint die chirurgische Intervention, Radiatio und Chemotherapie und wird zunehmend durch zielgerichtete biologische Therapeutika als *targeted therapy* ergänzt (Dietz *et al.* 2010). Da in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Chemotherapie auf HNSCC untersucht wurde, wird an dieser Stelle lediglich auf die Chemotherapie eingegangen.

#### 1.3.1 Chemotherapie

Die Deutsche Krebsgesellschaft verweist zur palliativen Chemotherapie von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes auf die wirksamen Zytostatika Carboplatin, Cisplatin (P), 5-Fluorurazil (F), Methotrexat, Ifosfamid, Cyclophosphamid sowie Paclitaxel und Vincaalkaloide. Bevorzugte Substanzen in der Radiochemotherapie sind Cisplatin/ Carboplatin, Mitomycin, Taxane und 5-Fluorourazil (Bootz *et al.* 2008).

##### 1.3.1.1 Charakterisierung der verwendeten Zytostatika

Entsprechend den Empfehlungen der Deutschen Krebsgesellschaft und der aktuellen Studienlage wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Zytostatika auf das Wachstum und die Zytokinproduktion von HNSCC *ex vivo* untersucht. Im Folgenden sollen Cisplatin und Docetaxel als Standardtherapeutika für HNSCC und Cilengitide und Temsirolimus als mögliche neue Therapeutika gegen HNSCC vorgestellt werden. Cilengitide wird als gut tolerierbares Therapeutikum beschrieben (Hariharan *et al.* 2007), das aufgrund der Blockade von in HNSCC überexprimierten  $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen für die Therapie von HNSCC interessant ist (Alghisi *et al.* 2009, Fabricius *et al.* 2011). Auch Inhibitoren von mTOR (*mammalian target of rapamycin*) gewinnen zunehmend an Bedeutung, da gezeigt werden konnte, dass Rapamycin antiproliferative Effekte gegenüber HNSCC-Zelllinien aufweist (Aissat *et al.* 2008). Somit ist Temsirolimus als ein Vertreter der mTOR-Inhibitoren für die HNSCC-Therapie von Interesse, da es den mTOR-Signalweg hemmt, der in HNSCC oft überexprimiert ist (Nguyen *et al.* 2012).

#### 1.3.1.1.1 *Cisplatin*

Cisplatin ist ein Alkylanz, das phasenunspezifisch in den Zellzyklus eingreift, indem es zu DNS-Vernetzungen führt. Dies erfolgt durch zweiwertiges Platin als Zentralatom, das in wässriger Lösung elektrophile Aquakomplexe bildet, die vor allem Guanin am N7-Stickstoff-Atom binden und somit zu DNS-Einzelstrangvernetzungen führen. Cisplatin findet breite Anwendung in der Therapie von Hoden-, Prostata-, Harnblasen-, Endometrium-, Ovarial-, und Bronchialkarzinomen. Für die Therapie von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region ist es ebenfalls zugelassen und Erstlinien-Chemotherapeutikum. Bekannte Nebenwirkungen des Cisplatins sind die Neuro-, Oto-, und Nephrotoxizität. Außerdem wirkt Cisplatin myelodepressiv und ist stark emetogen. Gegenüber Cisplatin werden Resistenzen beobachtet (Burgis 2008, Gómez-Ruiz *et al.* 2012).

#### 1.3.1.1.2 *Docetaxel*

In den Experimenten wurde Taxotere (Sanofi Aventis, Antony Cedex, Frankreich) eingesetzt, das zur Induktionschemotherapie von lokal fortgeschrittenen HNSCC in Kombination mit Cisplatin und 5-Fluorurazil zugelassen ist. Weitere Anwendung findet Taxotere in der Therapie von Brustkrebs, dem Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, dem hormonrefraktären Prostatakarzinom und dem Adenokarzinom des Magens. Vom Hersteller angegebene Nebenwirkungen des Docetaxels sind Myelotoxizität, Neurotoxizität und anaphylaktische Reaktionen durch Histaminfreisetzung und die Bildung von Ödemen (Sanofi-Aventis 2010). Docetaxel greift als Taxan in den Zellzyklus ein. In der G2-Phase wird die Ausbildung des Spindelapparates beschleunigt. Durch Bindung an die  $\beta$ -Tubulinuntereinheit erfolgt eine Desaggregationshemmung des Spindelapparates, wodurch es zum Arrest des Zellzyklus in der G2- und M-Phase kommt. Unter der Therapie mit Taxanen wurde insbesondere bei niedriger Dosierung die Bildung von Resistenzen beobachtet (Burgis 2008).

#### 1.3.1.1.3 *Cilengitide*

Durch Cilengitide wird eine Inhibition der Tumorangio-genese erzielt. Cilengitide (EMD 121974; Merck, Darmstadt) ist ein zyklisches Peptid, das als selektiver Antagonist für  $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrine wirkt (Alghisi *et al.* 2009). Integrine spielen eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion. Außerdem haben sie wichtige Funktionen in der Entstehung, dem Progress und der Metastasierung solider Tumoren (Desgrosellier *et al.* 2010). Integrine stellen eine Verbindung der extrazellulären Matrix zur Zelle her. Über Ligandenbindung wird ein intrazelluläres *Signaling* ausgelöst. Dabei ist für die Ligandenbindung die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD-Sequenz) wichtig, die von Cilengitide geblockt wird (Goodman *et al.* 2002), wodurch die Zelladhäsion inhibiert wird. Außerdem stört Cilengitide die  $\beta_1$ -Integrin-vermittelte Zelladhäsion über einen transdominanten negativen Effekt, der durch

aktiviertes  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin ausgelöst wird. Weiterhin stimuliert es die Phosphorylierung von VE-Cadherin und unterbricht somit Zell-Zell-Kontakte (Alghisi *et al.* 2009). Die Blockade von  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin hat demnach antiangiogene und antitumorale Effekte, die in Kombination mit Bestrahlung verstärkt werden (Abdollahi *et al.* 2005). In vielen klinischen Studien wurde die Wirkung von Cilengitide bei Glioblastom-Patienten untersucht, darunter auch die CENTRIC-Studie, die die Wirkung von Cilengitide plus Temozolomid und Bestrahlung analysiert (Stupp *et al.* 2010, Reardon *et al.* Cheresch 2012). In der randomisierten, kontrollierten Phase I/II ADVANTAGE-Studie wurde die Wirksamkeit und Sicherheit von Cilengitide bei rezidivierenden oder metastasierten HNSCC in Kombination mit Cisplatin, 5-Fluorurazil und Cetuximab getestet. Eine intravenöse Gabe von 2000 mg Cilengitide zweimal wöchentlich wurde für sicher befunden (Vermorken *et al.* 2011). Die Auswertung der Phase II zeigte jedoch keine Vorteile bezüglich der Zugabe von Cilengitide gegenüber Cisplatin, 5-Fluorurazil und Cetuximab allein (Vermorken *et al.* 2012).

### 1.3.1.1.4 *Temsirolimus*

In dieser Arbeit wurde Torisel (Wyeth®, Münster) eingesetzt, das bisher zur Therapie von fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen zugelassen ist (Wyeth Pharmaceuticals Inc. 2012). Temsirolimus ist ein mTOR-Inhibitor. Bei mTOR handelt es sich um eine Proteinkinase, die durch Rapamycin, einem bakteriellen Gift, gehemmt werden kann. Das mTOR-Signaling spielt eine zentrale Rolle in Prozessen des Zellwachstums und der Proliferation über die Steuerung des Überganges der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus. Transkription, Translation und Proteinstabilität sowie Apoptose sind ebenfalls mTOR-reguliert. Eine Blockade von mTOR ist durch Rapamycin (Sirolimus) und Analoga wie Temsirolimus und Everolimus möglich und wirkt folglich antiproliferativ und zytostatisch. *Upstream-pathways* von mTOR sind in vielen Tumoren hochreguliert. Die Ursache hierfür könnte eine erhöhte Aktivität insbesondere des PI3K-AKT-Signalings sein (Bjornsti *et al.* Houghton 2004). Temsirolimus hemmt in seiner Rolle als mTOR-Inhibitor die Produktion von VEGF. Daraus erklären sich auch dessen antiangiogene Eigenschaften (Del Bufalo *et al.* 2006). Hudes *et al.* zeigten, dass Temsirolimus das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom und schlechter Prognose verlängern kann. Unerwünschte Effekte der Therapie mit Temsirolimus sind Asthenie, Anämie, Hautausschlag, Übelkeit, Dyspnoe, Diarrhoe, periphere Ödembildung, Hyperlipidämie und Hyperglykämie (Hudes *et al.* 2007). Nachdem die Wirksamkeit der mTOR-Inhibitoren bei vielen soliden Tumoren beschrieben wurde (Nguyen *et al.* 2012), gewinnt Temsirolimus auch in der Therapie fortgeschrittener, platinrefraktärer HNSCC zunehmend an Bedeutung (Grünwald *et al.* 2012).

### 1.3.2 Die Wirkstärke eines Pharmakons

Um die Wirkstärke eines Pharmakons beschreiben zu können, wurde der Begriff der Potenz (*Potency*) eingeführt. Dabei wird diejenige Konzentration des Pharmakons gemessen, bei der ein Effekt zu beobachten ist. Je höher die Potenz eines Pharmakons ist, desto geringere Konzentrationen sind zur Erzielung einer bestimmten Wirkung nötig. Der Begriff der Potenz wird durch die Angabe der  $EC_{50}$  für Agonisten und der  $IC_{50}$  für Antagonisten ergänzt. Die  $EC_{50}$  (*Exciting Concentration*) ist dabei die molare Konzentration des Agonisten, bei der 50% der maximal erreichbaren Reaktion ausgelöst werden. Dagegen ist die  $IC_{50}$  (*Inhibiting Concentration*) die molare Konzentration des Antagonisten, bei der 50% der maximal erzielbaren inhibitorischen Wirkung erreicht werden. Gerade in der Chemotherapie von Malignomen sind sich verstärkende Effekte der Kombination von Therapeutika erwünscht, um die Wirkung bei möglichst geringer Nebenwirkung zu erhöhen. Zu diesen Effekten gehören die Begriffe des Synergismus und der Potenzierung. Unerwünscht sind dagegen antagonistische Effekte, die zur Abschwächung der Wirkung führen. Synergismus wird unterschieden in additiven, überadditiven und funktionellen Synergismus. Für den additiven Synergismus gilt, dass zwei Pharmaka mit einer bestimmten Wirkstärke niedriger dosiert werden können und dennoch dieselbe Wirkstärke erreichen, wenn sie gemeinsam verabreicht werden. Beim überadditiven Synergismus kommt es zur gegenseitigen Verstärkung der Wirkung der Pharmaka bezüglich eines bestimmten Effektes, sodass der Gesamteffekt größer ist als die Summe der Einzelwirkungen (Burgis 2008). Die Effekte der Interaktion lassen sich mathematisch beschreiben. Zheng-jun Jin entwickelte eine Formel, mit deren Hilfe die Effekte der Interaktion als Additivität, Synergismus oder Antagonismus beschrieben werden können (Jin 2004). Unter der Berücksichtigung experimentell bedingter Unsicherheit der Datenlage definierte Jin, dem Modell der unabhängigen Wirkung zweier Therapeutika entsprechend, das Intervall für Additivität des Effekts in Mischung als nur in den Grenzen von 85% bis 115% gegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Begriff der Additivität (85% bis 115% des zu erwartenden Effekts) für den additiven Synergismus synonym verwendet. Der überadditive Synergismus wird dem Begriff des Synergismus (>115%) synonym gesetzt, während Effekte <85% als Antagonismus bezeichnet werden. Natürlich liegt Antagonismus der Effekte unabhängig vom gemeinsamen Effekt auch dann vor, wenn die Wirkungen der Therapeutika individuell gegenläufig sind.

#### **1.4 Die Rationale für diese Dissertation**

Da HNSCC eine große biologische Heterogenität aufweisen und geeignete prädiktive Biomarker, bis auf p16, bislang fehlen, wäre zum einen eine prädiktive prätherapeutische Testung der Chemoreaktivität der Tumoren zur Verbesserung der individualisierten Therapie der Patienten wünschenswert. Zum anderen müssen weitere Angriffspunkte identifiziert werden (Wichmann *et al.* 2011). Biomarker, die Metastasierung, Krankheitsprogress oder Rezidive widerspiegeln, sind interessante Ziele. Bereits seit langem besteht die Hypothese, dass maligne Tumoren Zytokine produzieren, um die lokale Immunantwort auf die Neoplasie zu modulieren (Mann *et al.* 1992). Die vorliegende Arbeit untersucht daher die Zytokine MCP-1, IL-6, IL-8, und VEGF als mögliche Biomarker von Malignomen der Kopf-Hals-Region. MCP-1 kontrolliert in Malignomen die Rekrutierung tumorassoziierter Monozyten und Makrophagen und kann daher sowohl inhibierend als auch stimulierend auf das Tumorstadium wirken (Nesbit *et al.* 2001). So wurde MCP-1 z.B. in Kolonkarzinomen ein erhöhtes Metastasierungspotential zugesprochen (Wolf *et al.* 2012). Auch Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und erhöhter MCP-1-Expression im Tumor zeigten schlechtere 5-Jahresüberlebensraten als Patienten mit geringerer MCP-1-Expression. Koide *et al.* wiesen dabei höhere venöse Infiltrationen, Lymphknoten- und Fernmetastasierungen von Tumoren vermehrter MCP-1-Expression als bei Tumoren verringerter MCP-1-Expression nach (Koide *et al.* 2004). Ob diese Charakteristika auch bei HNSCC präsent und unabhängig von therapieinduzierten Effekten sind, ist bisher nicht untersucht. IL-6 kann durch die Vermittlung einer akuten Inflammation einen therapeutischen Effekt erzielen. Es begünstigt jedoch auch eine chronische Inflammation, die zur Kanzerogenese führen kann (Aggarwal *et al.* 2006). Zudem vermittelt es antiapoptische Effekte. IL-8 und VEGF sind aufgrund ihrer Rolle in der Neoangiogenese und Metastasierung von HNSCC interessant (Pries *et al.* 2006).

#### **1.5 Aufgabenstellung und aufgestellte Hypothesen**

Ziel dieser Dissertation war es folglich, die Rolle des MCP-1 in der Kanzerogenese der Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region sowie Korrelationen mit weiteren Zytokinen zu untersuchen. Dazu wurden zum einen mittels ELISA Zytokinkonzentrationen in Patientenseren quantifiziert und diese Ergebnisse in Abhängigkeit der Patienten- und Tumorcharakteristik beleuchtet. Zum anderen wurde mithilfe des FLAVINO-Assays, einem klonogenen *Ex-vivo*-Koloniebildungsassay, die Chemoreaktivität biotisch gewonnener Tumorproben gegenüber antineoplastischen Substanzen *ex vivo* untersucht. Dabei sollte herausgearbeitet werden, welchen Einfluss die MCP-1-Stimulation und dessen Inhibition auf die Koloniebildung und die Zytokinexpression der untersuchten Plattenepithelkarzinome allein und in Kombination mit antineoplastischen Substanzen hat.

Folgende Hypothesen galt es im Rahmen dieser Dissertation zu prüfen:

1. Die Zytokinexpression in Patientenseren differiert in Abhängigkeit klinisch-epidemiologischer Patientencharakteristika sowie der Exposition gegenüber Risikofaktoren und der Tumorcharakteristik, wie z.B. Stadium nach UICC, Tumorgröße, Lymphknotenbeteiligung und Fernmetastasierung (TNM) sowie der Lokalisation.
2. Zytostatika, die *ex vivo* an Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region getestet werden, nehmen Einfluss auf die Koloniebildung und die Zytokinexpression der Tumoren im FLAVINO-Assay.
3. Auf individueller Ebene existieren Unterschiede bezüglich der Chemoreaktivität der untersuchten Tumoren auch hinsichtlich der Beeinflussung der Zytokinproduktion.
4. Die Stimulation durch MCP-1 und dessen Inhibition durch einen Anti-MCP-1-Antikörper nehmen Einfluss auf die Koloniebildung und die Zytokinexpression der Tumoren im FLAVINO-Assay und modulieren die Chemoreaktivität der untersuchten Tumoren auf die getesteten Zytostatika.
5. Durch die Kombination der getesteten Zytostatika mit MCP-1 bzw. einem Anti-MCP-1-Antikörper treten Interaktionsmechanismen auf. Ob diese bei HNSCC allgemein als Additivität, Synergismus oder Antagonismus zu beschreiben sind oder aber bezogen auf die Koloniebildung und die Zytokinexpression der untersuchten Plattenepithelkarzinome *ex vivo* abweichend dazu auf individueller Ebene differente Effekte resultieren, ist wahrscheinlich und daher zu prüfen.

## 2. Material und Methoden

Im Folgenden werden die Materialien und die Methoden, die für diese experimentelle Arbeit genutzt wurden, dargestellt.

### 2.1 Patienten

#### 2.1.1 Ethikvotum

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig erteilte für die durchgeführten Untersuchungen ein Ethikvotum.

#### 2.1.2 Einschlusskriterien

Es wurden nur aufklärungsfähige Patienten in die Untersuchung eingeschlossen, die schriftlich ihr Einverständnis für die Probeentnahme und deren Untersuchung zu wissenschaftlichen Zwecken gaben. Weiterhin mussten die Narkosefähigkeit des Patienten, die Operabilität des Tumors bzw. der Zugang zur Probe im Rahmen der Panendoskopie und ausreichende Probenmengen gewährleistet sein. Es wurden nur histologisch gesicherte Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region einbezogen.

#### 2.1.3 Patientencharakteristik

Es wurden 73 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region von 62 Patienten der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Leipzig untersucht. Tabelle 1 charakterisiert die eingeschlossenen Patienten hinsichtlich Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation und *Staging* entsprechend der TNM-Klassifikation nach UICC-Kriterien (*Union internationale contre le cancer*). Nikotinabusus und Alkoholkonsum größer als 30 g/d werden je mit der Ziffer 1 wiedergegeben. Die Ziffer 0 steht für Nonabusus bzw. negative Risikoanamnese. Zu vier Patienten liegen keine anamnestisch gesicherten Angaben zum Konsumverhalten vor, da diese von den Patienten nicht angegeben wurden (k. A.). Die Histologie wird nach dem ICD-O-M-Schlüssel klassifiziert:

- ICD-O-M 8070/3: Plattenepithelkarzinom o.n.A.\*,
- ICD-O-M 8070/6: Plattenepithelkarzinom-Metastase o.n.A.\*,
- ICD-O-M 8071/3: verhornendes Plattenepithelkarzinom o.n.A.\*,
- ICD-O-M 8083/3: basaloides Plattenepithelkarzinom.

Außerdem ist angegeben, ob es sich bei dem untersuchten Material um einen Teil des Primärtumors oder einer lokoregionären Lymphknotenmetastase handelte.

---

\* o.n.A.: ohne nähere Angabe

## Material und Methoden

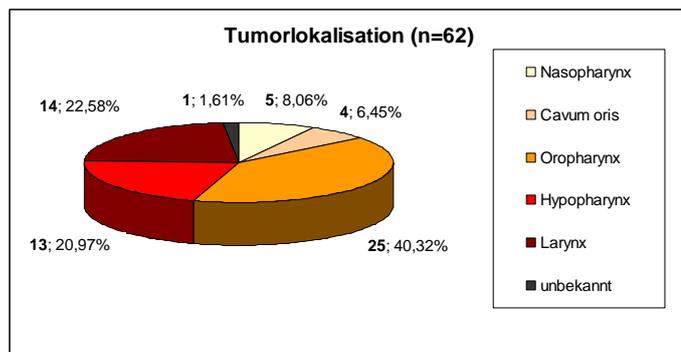
**Tab. 1:** Übersicht zu Alter und Geschlecht der eingeschlossenen Patienten sowie Lokalisation des Primums, *Staging* (TNM) und Tumorstadium (UICC), *Grading* (G), Risikoanamnese, Histologie sowie Art der untersuchten Probe. Vorbehandelte (y) oder rezidivierende (r) HNSCC sind gelb markiert.

Pat.-Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht	Tumorlokalisation	T	N	M	Stadium [UICC]	G	Alkoholabusus	Nikotinabusus	Histologie ICD-O-M	Probe
1	72	männlich	Larynx	2	0	0	II	2	0	1	8070/3	Primärtumor
2	44	männlich	Hypopharynx	3	2b	0	IVA	3	1	1	8070/3	Primärtumor
3	55	männlich	Oropharynx	r1	r0	r0	I	3	1	1	8070/3	Primärtumor
4	58	männlich	Larynx	2	3	0	IVB	3	1	1	8070/3 8070/6	Primärtumor Metastase
5	49	weiblich	Oropharynx	4a	0	0	IVA	2	1	1	8070/3	Primärtumor
6	62	männlich	Larynx	rx	r2c	r1	IVC	3	k. A.	k. A.	8070/6	Metastase
7	62	männlich	Larynx	r3	r0	r1	IVC	2	1	1	8070/3	Primärtumor
8	70	männlich	Cavum oris	4a	0	0	IVA	3	1	1	8070/3	Primärtumor
9	76	männlich	Hypopharynx	3	1	0	III	2	0	1	8070/3	Primärtumor
10	68	männlich	Hypopharynx	r2	r0	r0	II	2	0	0	8070/3	Primärtumor
11	77	weiblich	Oropharynx	2	0	0	II	3	1	1	8070/3	Primärtumor
12	45	männlich	Oropharynx	4a	2c	0	IVA	2	0	1	8070/3 8070/6	Primärtumor Metastase
13	59	männlich	Oropharynx	2	1	0	III	2	1	1	8070/3	Primärtumor
14	51	männlich	Larynx	2	0	0	II	2	1	1	8070/3	Primärtumor
15	50	männlich	Hypopharynx	4b	3	1	IVC	3	1	1	8070/3	Primärtumor
16	63	männlich	Cavum oris	1	3	0	IVB	2	1	1	8070/6	Metastase
17	65	männlich	Larynx	2	2b	0	IVA	3	1	1	8070/3	Primärtumor
18	53	männlich	Nasopharynx	4a	0	0	IVA	2	1	1	8070/3	Primärtumor
19	64	männlich	Oropharynx	4a	2c	0	IVA	3	0	0	8070/3	Primärtumor
20	57	männlich	Oropharynx	4a	2c	0	IVA	3	1	1	8071/3	Primärtumor
21	74	männlich	Oropharynx	2	1	0	III	3	0	1	8070/3	Primärtumor
22	74	männlich	Larynx	4a	1	0	IVA	2	0	0	8070/3	Primärtumor
23	50	männlich	Oropharynx	y1	y2b	y0	IVA	3	0	1	8070/3	Primärtumor
24	46	männlich	Nasopharynx	4a	0	0	IVA	2	0	1	8070/3	Primärtumor
25	75	männlich	Larynx	4a	2a	0	IVA	2	0	1	8070/3	Primärtumor
26	61	weiblich	Hypopharynx	3	0	0	III	3	1	1	8070/3	Primärtumor
27	58	männlich	Larynx	4a	2b	0	IVA	3	0	0	8083/3	Primärtumor
28	82	männlich	Oropharynx	3	2b	0	IVA		0	1	8070/3	Primärtumor
29	84	weiblich	Oropharynx	4a	2c	1	IVC	1	1	1	8070/3	Primärtumor
30	77	männlich	Larynx	2	2b	0	IVA	3	1	1	8070/3	Primärtumor
31	56	männlich	Oropharynx	r0	r2c	r0	IVA	3	1	1	8070/6	Metastase
32	40	männlich	Oropharynx	4a; y4a	2c; y2c	0; y0	IVA	2	1	1	8070/3	Primärtumor
33	50	männlich	Hypopharynx	2	1	0	III	2	0	1	8070/3	Primärtumor
34	86	weiblich	Oropharynx	r4a	r2c	r0	IVA	1	0	0	8070/3	Primärtumor
35	76	männlich	Oropharynx	r1	r0	r0	I	2	1	1	8070/3	Primärtumor
36	60	männlich	Nasopharynx	r4	r2c	r0	IVA	3	k. A.	k. A.	8070/3	Primärtumor
37	66	weiblich	Cavum oris	4a	2c	0	IVA	2	1	1	8070/3	Primärtumor
38	71	männlich	Hypopharynx	2; y2	0; y0	0; y0	II	3	1	1	8070/3	Primärtumor
39	50	weiblich	Nasopharynx	4a	0	0	IVA	3	1	0	8070/3	Primärtumor
40	40	männlich	Larynx	4a	2c	0	IVA	2	1	1	8070/3 8070/6	Primärtumor Metastase
41	66	weiblich	Hypopharynx	4a	2b	0	IVA	2	0	1	8070/3	Primärtumor
42	42	männlich	Cavum oris	4a	0	0	IVA	3	0	0	8070/3	Primärtumor
43	50	männlich	Oropharynx	3	0	0	III	3	1	1	8070/3	Primärtumor
44	48	männlich	Oropharynx	1	2a	0	IVA	2	1	1	8070/3 8070/6	Primärtumor Metastase
45	76	männlich	Larynx	3	2c	0	IVA	3	0	1	8070/3	Primärtumor
46	67	männlich	Hypopharynx	r4b	r2b	r0	IVB	3	0	1	8070/3	Primärtumor
47	58	männlich	Hypopharynx	yr0	yr2a	yr1	IVC	3	1	1	8070/6	Metastase
48	73	männlich	Oropharynx	3	2b	0	IVA	2	0	0	8070/3 8070/6	Primärtumor Metastase
49	56	männlich	Oropharynx	4a	2b	0	IVA	3	1	1	8083/3	Primärtumor
50	50	weiblich	Larynx	3	2c	0	IVA	2	k. A.	1	8070/3 8070/6	Primärtumor Metastase
51	56	männlich	Oropharynx	r4b	r2b	r0	IVB	2	1	1	8070/3	Primärtumor
52	50	weiblich	Nasopharynx	3	1	0	III	3	k. A.	k. A.	8070/3	Primärtumor
53	55	männlich	Hypopharynx	3	2b	0	IVA	2	1	0	8070/3	Primärtumor
54	49	männlich	Hypopharynx	4a	2c	1	IVC	3	1	1	8070/3	Primärtumor
55	71	weiblich	Oropharynx	3	0	0	III	3	1	1	8070/3	Primärtumor
56	52	männlich	Oropharynx	4b	2c	0	IVB	2	1	1	8070/3	Primärtumor
57	58	männlich	Oropharynx	4a	2c	0	IVA	3	0	1	8070/3	Primärtumor
58	60	männlich	Oropharynx	yr0	yr3	yr1	IVC	3	0	1	8070/6	Metastase
59	47	männlich	Hypopharynx	4a	2c	1	IVC	2	1	1	8070/3	Primärtumor
60	57	männlich	Larynx	4a	0	0	IVA	3	1	1	8070/3	Primärtumor
61	67	männlich	unbekannt	0	2b	0	IVA	2	1	0	8070/6	Metastase
62	70	weiblich	Oropharynx	4a	0	0	IVA	3	0	0	8070/3	Primärtumor

Der Anteil männlicher Patienten betrug 80,65% (n=50), der Anteil der Patientinnen lag bei 19,35% (n=12). Am Tag der Probeentnahme waren die Patienten im Mittel 60,5 Jahre alt (Standardabweichung:  $\pm 11,57$  Jahre). Die Altersspanne erstreckte sich von 40 bis 86 Lebensjahren. Von sechs Patienten wurden sowohl der Primärtumor, als auch die Lymphknotenmetastase untersucht. Bei drei Patienten wurden Proben aus der Panendoskopie und der Tumorexzision stammend analysiert. Bei zwei weiteren Patienten wurden Proben vor und nach Therapiebeginn gewonnen. Der Anteil chemo-naiver Tumoren lag bei 79,45% (n=58). 20,55% (n=15) der Proben entstammten HNSCC, die bereits vortherapiert waren. 61 Proben entstammten den Primärtumoren (83,56%), 12 Proben entstammten Lymphknotenmetastasen (16,44%).

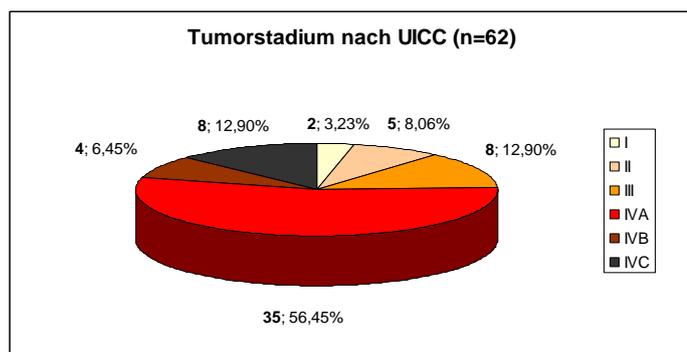
Die untersuchten Plattenepithelkarzinome (PEC) waren im Nasopharynx (n=5; 8,06%), Cavum oris (n=4; 6,45%), Oropharynx (n=25; 40,32%), Hypopharynx (n=13; 20,97%) und Larynx (n=14; 22,58%) lokalisiert. Ein PEC (1,61%) wurde als *Cancer of unknown Primary* (CUP) klassifiziert, bei unbekanntem Primum wurde daher die Lymphknotenmetastase untersucht. PEC des Mundbodens und Mundes allgemein wurden als PEC des Cavum oris zusammengefasst. PEC der Zunge, der Tonsillen, des Zungengrundes und des Gaumens wurden zu den Oropharynxkarzinomen gezählt.

**Abb. 1:** Verteilung der primären Lokalisationen der untersuchten Tumoren



Die Tumorstadien nach UICC verteilten sich wie folgt: Stadium I: 2 Patienten (3,23%), Stadium II: 5 Patienten (8,06%), Stadium III: 8 Patienten (12,90%), Stadium IVA: 35 Patienten (56,45%), Stadium IVB: 4 Patienten (6,45%), Stadium IVC: 8 Patienten (12,90%).

**Abb. 2:** Verteilung der Tumorstadien nach UICC



Hinsichtlich der Risikoanamnese bzw. des Konsumverhaltens ergab sich folgende Verteilung: Acht Patienten (12,90%) mit Nonabusus, drei Patienten (4,84%) ausschließlich mit Alkoholabusus größer 30 g/d, 15 Patienten (24,19%) ausschließlich mit Nikotinabusus bei verneintem Alkoholkonsum und 33 Patienten (53,23%), die sowohl Tabak rauchten, als auch Alkohol größer 30 g/d konsumierten.

## 2.2 Material

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die genutzten Materialien und Geräte.

**Tab. 2:** Reagenzien

Reagenz	Produzent/ Lieferant
1-Step™ Ultra TMB-ELISA	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Amikacin (5 mg/ml), Infusionslösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Delta Select, Dreieich
BD OptEIA™ Substrate Reagent A + B	BD Biosciences, San Diego, USA
Casyton®-Lösung	Casy® Technology, Reutlingen
Collagenase C5138 (354 U, 518 U)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Darmstadt
Fibronektin (pure, 1 mg)	Roche Diagnostics, Mannheim
Glycerol (Ultrapure™)	Invitrogen, Darmstadt
Kollagen (10 mg)	Roche Diagnostics, Mannheim
L-Alanyl-L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin
Laminin EHS sarcoma mouse (1 mg/ 2 ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
N, N-Dimethylformamid DMF (99,9%)	Carl Roth, Karlsruhe
Nystatin Suspension N1638 (10.000 U/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penstrep (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS) Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
RPMI 1640 Medium (1x)	Biochrom AG, Berlin
Schwefelsäure 98%	Merck, Darmstadt
SDS ultra pure (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S)	Carl Roth, Karlsruhe
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizol Reagent	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin (2,5% 10x, 100 ml)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
Tween20™	Sigma-Aldrich, Steinheim

**Tab. 3:** Zytostatika

Zytostatikum	Produzent/ Lieferant
EMD 121974 15 mg/ml, (Cilengitide)	Merck, Darmstadt
cis-Diammineplatinum(II)dichloride P4394 (Cisplatin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Taxotere 80 mg, (Docetaxel)	Sanofi Aventis, Antony Cedex, Frankreich
Torisel 25 mg/ml (Temsirolimus)	Wyeth®, Münster

**Tab. 4:** Antikörper und Zytokine

Antikörper und Zytokine	Produzent/ Lieferant
anti-human MCP-1 rabbit pAb	Relia Tech, Wolfenbüttel
Cy2™-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK
pan-Cytokeratin (C11) sc-8018, mouse monoclonal IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
rh-MCP-1 (20 µg)	Relia Tech, Wolfenbüttel

**Tab. 5:** ELISA-Kits

ELISA-Kits	Produzent/ Lieferant
Duo Set Human VEGF	R&D Systems, Abingdon, GB
Human IL-6 ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Human IL-8 ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Human MCP-1 ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, USA

**Tab. 6:** Einmalartikel

Einmalartikel	Produzent/ Lieferant
Casy Cups	Schärfe System, Reutlingen
Deepwellplatte (96 Well; 0,5 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Einmalkanülen Sterican	Braun, Melsungen
Einmalspritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml)	BD Discardit™, Heidelberg
ELISA-Mikrotiterplatte (Half Area, 96 Well)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Masterblock Cap Mats (96 Well)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Objektträger	Thermo Scientific, Braunschweig
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe

Petrischale (60x15 steril)	TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Pipettenspitzen (1-10, 20-200, 201-1000 µl)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (2,0 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Skalpell Größe 10	Braun, Tuttlingen
Stericup + Steritop Filtration System (0,22 µl)	Millipore, Billerica, USA
Sterilfilter (0,20 µl)	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Zellkulturschale (100 mm)	TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale (60 mm)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkultur-Testplatte (6, 48, 96 Well)	TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen

**Tab. 7:** Glaswaren

Glaswaren	Produzent/ Lieferant
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Messbecher	Schott, Mainz
Messzylinder	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Petrischale	Schott, Mainz
Weithalsflaschen aus Braunglas	Schott, Mainz

**Tab. 8:** Geräte

Geräte	Produzent/ Lieferant
Achtkanalpipette	VWR, Darmstadt
Brutschrank BBD 6220 Heraeus	Heraeus, Hanau
Brutschrank Hera Cell 150	Heraeus, Hanau
Eppendorf Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Forschungsmikroskop Zeiss Primo Vert	Zeiss, Jena
Gelblicht-Lampen OSRAM L 36W/62 gelb	OSRAM, München
Heraeus Multifuge 1L	Heraeus, Hanau
IKA Heizungs- und Elektrorührer	IKA, Staufen
Forschungsmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg

Kolbenhubpipetten	VWR, Darmstadt
Membran-Vakuumpumpe BVC 21	Vaccubrand, Wertheim
Micropublisher 3.3 Kamera	Q-Imaging, Surrey, Canada
Photometer Synergy 2	BioTek Deutschland, Bad Friedrichshall
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Präzisionswaage Mettler AJ150	Mettler Toledo, Giessen
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore, Schwalbach
Schüttler Grant-bio PMR-30	Grant Instruments, Cambridgeshire, GB
Sicherheitswerkbank Herasafe KS	Thermo Scientific, Bonn
Tecan™ Hydroflex® -Washer	Tecan, Männedorf, Schweiz
Vortexer Heidolph Reax-Top	Heidolph, Schwabach
Wasserbad WB10	Medingen, Dresden
Zellanalysegerät Casy TT®	Schärfe System, Reutlingen

**Tab. 9:** Software

Software	Produzent/ Lieferant
Casystat®-Software	Schärfe System, Reutlingen
Gen5 vers. 1.08	BioTek Instruments, Highland Park, USA
Microsoft Excel, Word 2003	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
Velocity Imaging Software 4.0.0	PerkinElmer, Rodgau
WinSTAT®	R. Fitch Software, Bad Krozingen

## 2.3 Methoden

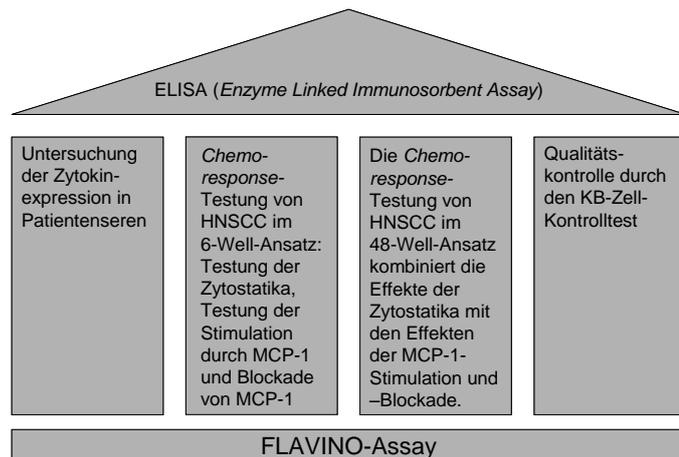
### 2.3.1 Experimenteller Aufbau dieser Arbeit

Diese Arbeit basiert auf vier Säulen: In Patientenseren wurden mithilfe von ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) die Zytokine MCP-1, IL-6, IL-8 und VEGF quantifiziert. Im nächsten Schritt wurden unter den Bedingungen des FLAVINO-Assays Experimente zur *Chemoresponse*-Testung im 6-Well-Ansatz durchgeführt, um zu klären, welchen Einfluss die Inkubation von HNSCC mit Zytostatika auf die Zytokinexpression von HNSCC *ex vivo* hat. Im 6-Well-Ansatz wurden weiterhin die Effekte einer Stimulation durch MCP-1 und einer Inhibition von MCP-1 durch einen Anti-MCP-1-Antikörper auf die Zytokinexpression von HNSCC *ex vivo* untersucht. In dem größeren 48-Well-Ansatz zur *Chemoresponse*-Testung wurden die Untersuchungen der Effekte der Zytostatika und der Stimulation durch MCP-1 bzw. der Inhibition von MCP-1 miteinander kombiniert. Zu diesem 48-Well-Ansatz wurde, den Bedingungen des FLAVINO-Assays entsprechend, ein KB-Zell-Kontrolltest als Qualitätskontrolle mitgeführt.

In Kulturüberständen der 6-Well- und 48-Well-Ansätze wurden mithilfe von ELISA die Zytokine MCP-1, IL-6, IL-8 und VEGF quantifiziert.

Folgendes Schema soll helfen, den experimentellen Aufbau der Arbeit zu visualisieren.

**Abb. 3:** Der experimentelle Aufbau der Arbeit beinhaltet die *Chemoresponse*-Testung von HNSCC *ex vivo* unter den Bedingungen des FLAVINO-Assays. Dieser erfährt durch den KB-Zell-Kontrolltest seine Qualitätskontrolle. Zytokine in Seren und Kulturüberständen wurden über ELISA quantifiziert.



### 2.3.2 Flavinschützende Bedingungen

Alle Arbeitsschritte wurden unter Vermeidung natürlichen Lichts durchgeführt, um die unerwünschte Photoaktivierung von Bestandteilen der Zellkultur inklusive Beeinflussung der Tumoren durch kurzwelliges Licht zu verhindern und photosensible Zytostatika zu schützen. Die Experimente fanden unter der Verwendung monochromatischen Lichts der Wellenlänge  $\lambda=589$  nm bzw. Gelblicht mit  $\lambda>550$  nm statt. Allgemein wurden Gelblichtlampen des Typs OSRAM L36W/62 gelb (OSRAM, München) verwendet. Flavin- und phenolrotfreies RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin) wurde als Kulturmedium genutzt.

### 2.3.3 Herstellung der Stammlösungen

#### 2.3.3.1 Stammlösungen der Zytostatika

##### 2.3.3.1.1 Cisplatin (Cis)

Durch Lösen von Cisplatin in *Aqua ad iniectabilia* wurde eine Stammlösung (6,4 mM) hergestellt, die nach Sterilfiltration aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Nach Auftauen des Aliquots wurde Cisplatin durch Verdünnen mit Tumormedium in einer Konzentration von  $3,33\ \mu\text{M}$  eingesetzt. Dies entspricht 50% der tolerierbaren Plasmakonzentration *in vivo* (Desoize *et al.* 1996).

##### 2.3.3.1.2 Docetaxel (DTX)

Durch Lösen von Docetaxel in Ethanol wurde eine Stammlösung (1,33 mM) hergestellt, die aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Nach Verdünnen dieser Stammlösung mit Tumormedium wurde Docetaxel in der Konzentration von  $0,275\ \mu\text{M}$  getestet. Dies entspricht der Hälfte der maximal ohne Toxizität Grad 4 tolerierbaren Plasmakonzentration (Bissett *et al.* 1993).

#### 2.3.3.1.3 *Cilengitide (Cil)*

Cilengitide wurde entsprechend der  $IC_{50}$  in einer Konzentration von 10  $\mu$ M getestet. Dazu wurde die Cilengitide-Stammlösung (15 mg/ml) mit Tumormedium verdünnt.

#### 2.3.3.1.4 *Temsirolimus (Tem)*

Nach Verdünnen der Temsirolimus-Stammlösung (25 mg/ml) mit Tumormedium wurde Temsirolimus entsprechend der  $IC_{50}$  in einer Konzentration von 500 nM zur Testung eingesetzt.

### 2.3.3.2 Stammlösungen der Enzyme und Antikörper

#### 2.3.3.2.1 *Collagenase*

Das Enzym Collagenase wurde in Tumormedium gelöst, nach Filtration aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Collagenase wurde in einer Konzentration von 230 mU/ml eingesetzt, um über Verdau der Basalmembran die Tumorzellen und Agglomerate von Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen.

#### 2.3.3.2.2 *Trypsin*

Für die Herstellung 0,17%igen Trypsins wurde 2,5%iges Trypsin mit PBS verdünnt. Aliquote wurden bei -20°C gelagert.

#### 2.3.3.2.3 *MCP-1*

Rh-MCP-1 wurde in 2000  $\mu$ l Tumormedium gelöst (10  $\mu$ g/ml). Durch Verdünnen mit Tumormedium wurde eine rh-MCP-1-Stammlösung mit einer Konzentration von 600 ng/ml (60-fach) hergestellt. Für die *Ex-vivo-Chemoresponse*-Testung im 48-Well-Ansatz wurde eine Konzentration von 10 ng/ml rh-MCP-1 eingesetzt.

#### 2.3.3.2.4 *Anti-MCP-1-Antikörper*

Der Anti-MCP-1-Antikörper wurde mit 100  $\mu$ l *Aqua dest.* gelöst (10  $\mu$ g/ml). Durch Verdünnen mit Tumormedium wurde eine Anti-MCP-1-Antikörper-Stammlösung mit einer Konzentration von 6  $\mu$ g/ml (60-fach) hergestellt. Im 48-Well-Ansatz wurde eine Konzentration von 100 ng/ml getestet.

#### 2.3.3.2.5 *Cy2™-Antikörper*

Der Cy2™-Antikörper wurde in RPMI 1640 mit 10% FKS und Glycerol zu gleichen Teilen verdünnt. Aliquote wurden bei -20°C gelagert.

### 2.3.3.3 Stammlösungen der Beschichtungen

#### 2.3.3.3.1 *humanes Fibronektin (hF)*

Das bei 4°C gelagerte humane Fibronektin wurde unter sterilen Bedingungen mit 5 ml *Aqua ad iniectabilia* gelöst. Zur Herstellung der hF-Beschichtung (1 µg/ml) wurden nach Durchmischen 250 µl der hF-Stammlösung (1 mg/ml) in 250 ml PBS gegeben.

#### 2.3.3.3.2 *Kollagen (K)*

Das bei -20°C gelagerte Kollagen wurde unter sterilen Bedingungen mit 5 ml 0,2%iger Essigsäure gelöst. Für die Beschichtung (1 µg/ml) wurden 125 µl der Stammlösung (2 mg/ml) in 250 ml PBS gelöst.

#### 2.3.3.3.3 *Laminin (L)*

Das bei -20°C gelagerte Laminin (0,5 mg/l) wurde nach dem Auftauen unter sterilen Bedingungen in Eppendorftubes zu je 500 µl aliquotiert. Für die Beschichtung (1 µg/ml) wurden 500 µl der Stammlösung (0,5 mg/ml) in 250 ml PBS gelöst.

### 2.3.3.4 Kulturmedien

#### 2.3.3.4.1 *Tumormedium*

Für die Kultivierung der Tumorzellen wurde kundenspezifisch hergestelltes flavin- und phenolrotfreies RPMI 1640 verwendet. Diesem wurden 10% fetales Kälberserum (FKS), 1% Glutamin (200 mM), 2% Amikacin (5 mg/ml), 2% Nystatin (10.000 U/ml) sowie 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung (Penicillin 10.000 U/ml, Streptomycin 10.000 µg/ml) hinzugefügt. Das Tumormedium wurde bei 4°C gelagert.

#### 2.3.3.4.2 *KB-Zell-Kulturmedium*

Für die KB-Zell-Kultur wurde flavin- und phenolrotfreies RPMI 1640 mit 10% FKS und 1% Glutamin mit Penicillin und Streptomycin, jedoch ohne Amikacin und Nystatin, verwendet.

### 2.3.3.5 Sonstige Stammlösungen

#### 2.3.3.5.1 *Phosphate-buffered saline (PBS)*

Für die Herstellung einer einfachen PBS-Lösung wurden 9,55 g Dulbecco's PBS in einem Liter destillierten Wassers gelöst.

#### 2.3.3.5.2 *SDS/DMF*

100 g SDS wurden in 500 ml bidestillierten Wassers unter Rühren vollständig gelöst und dann mit 500 ml N, N'-Dimethylformamid (99,9%) vereint.

#### 2.3.3.5.3 MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid*)

Zur Herstellung einer MTT-Stammlösung wurden 2 g MTT-Pulver (Sigma-Aldrich, Steinheim) in einem Liter PBS lichtgeschützt gelöst. Danach erfolgte die Aliquotierung und die Lagerung bei -20°C.

### 2.3.4 FLAVINO-Assay

Der FLAVINO-Assay ist ein klonogener *Ex-vivo*-Koloniebildungsassay, der an der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität Leipzig etabliert und 2009 patentiert wurde. Die unter 2.3.2 genannten flavinschützenden Bedingungen werden hierbei berücksichtigt. Schäden der Zelloberfläche durch tryptischen Verdau werden durch die Verwendung von Kollagenase IV verhindert. Dieser Assay erfährt durch die parallele Testung der Zytostatika an der KB-Zelllinie seine Qualitätskontrolle und ist somit reproduzierbar. Durch differenzierte Färbungen können Epithel- und Stromazellen voneinander unterschieden werden (Dietz *et al.* 2009). Für eine repräsentative *Chemoresponse*-Testung in HNSCC genügen Tumorbiopsate von ca. 100 mg (Wichmann *et al.* 2009).

#### 2.3.4.1 Beschichtungen der Zellkulturplatten

Für die *Ex-vivo-Chemoresponse*-Testung wurden Zellkulturplatten mit 48 Kavitäten mit humanem Fibronectin, Kollagen und Laminin zu je 200 µl der jeweiligen Lösung (1 µg/ml) beschichtet. Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten wurden mit 500 µl hF-Lösung beschichtet.

#### 2.3.4.2 Probengewinnung

Nach der schriftlich informierten Einverständnigabe der Patienten wurden im Rahmen einer Panendoskopie oder Tumorexzision Tumorproben gewonnen und in Tumormedium enthaltenden Probenröhrchen ins Forschungslabor gesandt. Auch EDTA- und Serum-Monovetten wurden nach Blutentnahme durch venöse Punktion schnellst möglich ins Labor geschickt.

#### 2.3.4.3 Probeneingang

Im Labor wurde der Probe eine Patienten-Identifikationsnummer zugewiesen. Der Probeneingang wurde sowohl schriftlich, als auch in digitalisierter Form in einer laboreigenen Datenbank dokumentiert.

#### 2.3.4.4 Aufarbeitung der Blutproben

Die Aufarbeitung der Blutproben erfolgte entsprechend SOP im Zeitfenster von 60 bis 90 min nach Blutentnahme. Die EDTA- und Serum-Monovetten wurden bei 3443 rpm für 10 min mithilfe der Heraeus Multifuge 1L (Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Nach Entnahme von

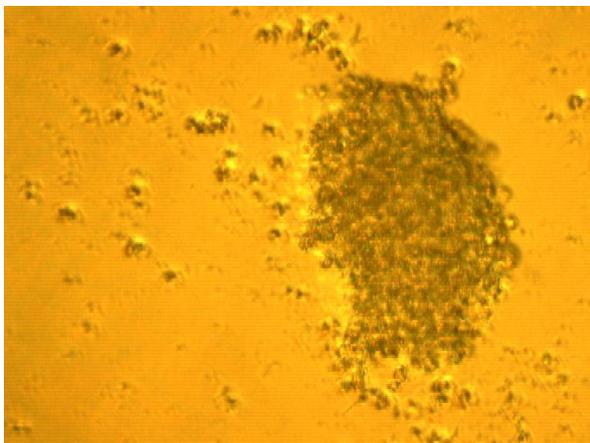
Plasma wurden mononukleäre Zellen über Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Alle Probenmaterialien wurden für spätere Messungen zu je 500 µl Serum und Plasma bei -80°C konserviert.

### 2.3.4.5 Aufarbeitung der Tumorproben und Kollagenaseverdau

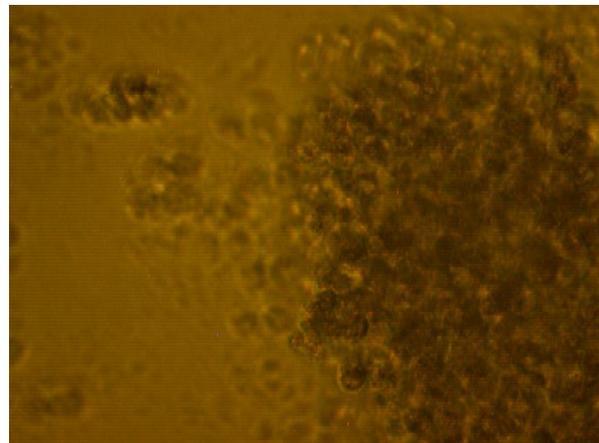
Nach dem Wiegen der Tumorprobe mithilfe der Präzisionswaage Mettler AJ150 (Mettler Toledo, Giessen) wurden 50 mg der Probe in einem Eppendorftube als Trockenpellet bei -20°C konserviert. Weitere 50 mg wurden mit 500 µl Trizol versetzt bei -20°C tiefgefroren. Diese Rückstellproben wurden später in eine -80°C-Tiefkühleinheit umgelagert. Der Rest der Tumorprobe wurde mit einem Skalpell mechanisch auf ca. 1 mm<sup>3</sup> messende Stücke zerkleinert und mit 24 ml Tumormedium versetzt. Die Suspension inkubierte für 30 min im Heraeus Brutschrank BBD 6220 (Heraeus, Hanau) unter den Standardbedingungen von 36,5°C und 3,5% CO<sub>2</sub>. Die Digestion wurde durch die Zugabe von 6 ml Kollagenase IV-Lösung gestartet. Es folgte eine 16-stündige Inkubation unter den beschriebenen Standardbedingungen.

### 2.3.4.6 Abstoppen des Kollagenaseverdaus

Zur Homogenisierung der Tumorzellsuspension wurde diese mit einer Kolbenhubpipette mehrmals gemischt. Mithilfe des inversen Forschungsmikroskops Zeiss Primo Vert (Zeiss, Jena) wurden Qualität und Reinheit der Tumorzellsuspension beurteilt. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert, wodurch die Digestion abgestoppt wurde. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet erneut in Tumormedium aufgenommen, resuspendiert und wie beschrieben zentrifugiert, bis die Suspension frei von Verunreinigungen war.



**Abb. 4:** Lichtmikroskopische Darstellung frei flottierender Zellen und eines Zellkonglomerats nach Kollagenase-Verdau, 200-fache Vergrößerung



**Abb. 5:** Lichtmikroskopische Darstellung frei flottierender Zellen und eines Zellkonglomerats nach Kollagenase-Verdau, 400-fache Vergrößerung

### 2.3.5 *Ex-vivo-Chemoresponse-Testung in Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten (6-Well-Ansatz)*

#### 2.3.5.1 Untersuchung des Einflusses von Zytostatika auf die Zytokinexpression von HNSCC *ex vivo*

Insgesamt wurden 65 Tumorproben im 6-Well-Ansatz untersucht. Dieser Versuch diente der Beantwortung der Frage, welchen Einfluss Zytostatika auf die Zytokinproduktion der untersuchten Tumoren *ex vivo* nehmen. Für den Ansatz einer Zellkulturplatte mit 6 Kavitäten wurden 60 mg der Tumorprobe benötigt (10 mg/ Kavität). In eine hF-beschichtete Zellkulturplatte wurden in zwei Kontrollkavitäten je 2 ml Tumormedium vorgelegt. In die vier verbliebenen Kavitäten wurden je 1,5 ml Tumormedium vorgelegt und je 500 µl der einzeln zu testenden Zytostatika hinzupipettiert. Die Zytostatika wurden in folgenden Konzentrationen getestet: 3,33 µM Cisplatin, 0,275 µM Docetaxel, 10 µM Cilengitide und 500 nM Temsirolimus. Nach 30 min Präinkubation im Brutschrank (36,5°C, 3,5% CO<sub>2</sub>) wurde je Kavität 1,0 ml der Tumorzellsuspension (10 mg/ml) hinzupipettiert (die Zahl vitaler Zellen pro mg Tumor liegt üblicher Weise im Bereich von  $5 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^5$  vitaler Zellen). Danach erfolgte die Inkubation der Zellkulturplatte für 72 h unter Standardbedingungen.

#### 2.3.5.2 Untersuchung des Einflusses der Stimulation durch MCP-1 und der MCP-1-Inhibition auf die Zytokinexpression von HNSCC *ex vivo*

Durch diesen Versuch sollten die Effekte einer Stimulation durch MCP-1 und einer MCP-1-Blockade durch einen Anti-MCP-1-Antikörper auf die Zytokinproduktion von HNSCC *ex vivo* untersucht werden. Dazu wurden 8 Tumorproben getestet. Die Kulturüberstände von 5 dieser Tumorproben wurden für die Zytokinquantifizierung mittels ELISA genutzt. Die Vorbereitung der Kontrollkavitäten erfolgte wie in 2.3.5.1 beschrieben. In die vier verbliebenen Kavitäten wurden je 1,950 ml Tumormedium vorgelegt. Statt der Zytostatika wurden nun in zwei Kavitäten je 50 µl rh-MCP-1 (600 ng/ml, 10 ng/ml/Kavität) und in zwei weitere Kavitäten je 50 µl Anti-MCP-1 (6 µg/ml, 100 ng/ml/Kavität) pipettiert. Nach Zugabe von 1 ml Tumorzellsuspension erfolgte die Inkubation unter den beschriebenen Standardbedingungen.

#### 2.3.5.3 Abstoppen des Tumorwachstums und Entnahme der Kulturüberstände

Nach 72-stündiger Inkubation wurden die Kulturüberstände in Eppendorftubes pipettiert. Nach deren Zentrifugation (3 min bei 3000 rpm mit Eppendorf-Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) wurden Überstände und Pellets von einander separiert. Die am Plattenboden adhärenen Zellen wurden mit Trizol gelöst und nach 30-minütiger Inkubation auf Eis ebenfalls in Eppendorftubes aufgenommen. Die Reaktionsgefäße wurden zunächst bei -20°C und später bei -80°C gelagert.

### **2.3.6 Ex-vivo-Chemoresponse-Testung in Zellkulturplatten mit 48 Kavitäten (48-Well-Ansatz)**

#### **2.3.6.1 Testung der Zytostatika-Effekte auf die Koloniebildung unter Stimulation durch MCP-1 und MCP-1-Inhibition**

Für diesen Ansatz wurden hF-, K-, L-beschichtete Zellkulturplatten mit 48 Kavitäten verwendet. Es wurden 32 Tumoren getestet. Die Aufteilung der Zellkulturplatte erlaubte die simultane Testung derselben Tumorprobe in zweimal 24 Kavitäten. Dies ermöglichte die Berücksichtigung einer eventuellen Beeinflussung der Kultur aufgrund einer bestimmten Position auf der Platte, z.B. durch Verdunstungseffekte am Plattenrand. Ein weiterer Vorteil war die simultane Testung unter den exakt gleichen Inkubationsbedingungen. Es sollte der Einfluss einer Stimulation durch MCP-1 und einer Inhibition von MCP-1 durch einen Anti-MCP-1-Antikörper auf die Wirkung der Zytostatika Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus auf die Koloniebildung untersucht werden. Für diesen Test wurden 100 mg der Tumorprobe benötigt (circa 2 mg/ Kavität). Die Kontrollkavitäten beinhalteten je 400 µl Tumormedium und je 200 µl Tumorzellsuspension. Die Kavitäten für die alleinige MCP-1- und Anti-MCP-1-Antikörper-Testung enthielten je 300 µl Tumormedium, je 100 µl rh-MCP-1 (10 ng/ml) oder 100 µl Anti-MCP-1 (100 ng/ml) und je 200 µl Tumorzellsuspension. In die Kavitäten für die Evaluation alleiniger Zytostatika-Effekte wurden je 100 µl Tumormedium und je 200 µl Cis (3,33 µM) oder 200 µl DTX (0,275 µM) oder 200 µl Cil (10 µM) oder 200 µl Tem (500 nM) und je 200 µl Tumorzellsuspension pipettiert. In den Kavitäten für die kombinierte Testung fanden sich je 100 µl Tumormedium, je 100 µl rh-MCP-1 (10 ng/ml) oder 100 µl Anti-MCP-1 (100 ng/ml), je 200 µl Cis (3,33 µM) oder 200 µl DTX (0,275 µM) oder 200 µl Cil (10 µM) oder 200 µl Tem (500 nM) und je 200 µl Tumorzellsuspension. Zunächst wurden Tumormedium und Zytostatika vorgelegt. Vor der Auftragung der Tumorzellsuspension inkubierte die Zellkulturplatte 30 min unter Standardbedingungen. Nach der Zugabe der Tumorzellsuspension inkubierte die Zellkulturplatte für 72 h im Brutschrank. Das Koloniewachstum wurde täglich lichtmikroskopisch kontrolliert.

#### **2.3.6.2 Abstoppen des Tumorwachstums und Entnahme der Kulturüberstände**

Nach erfolgter Inkubation wurden die Kulturüberstände vorsichtig in eine Deepwellplatte überführt (je 400 µl). Die Überstände wurden bei -20°C für weitere Untersuchungen, z.B. zur Zytokinquantifizierung mittels ELISA, konserviert. Für eine verbesserte Qualität der Färbung durch weniger Verunreinigung wurde jede Kavität vorsichtig mit je 200 µl PBS gespült.

#### **2.3.6.3 Fixierung der Kolonien**

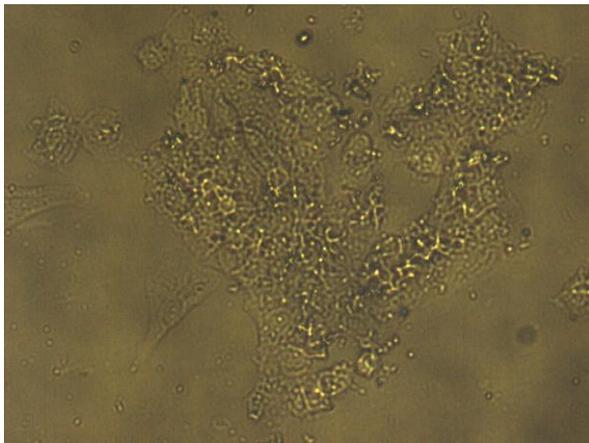
Die Fixierung der Kolonien erfolgte für 10 min mit 200 µl 40%igen Ethanol je Kavität. Nach dem Abgießen der Überstände wurde schließlich für 15 min mit je 200 µl 90%igen Ethanol fixiert. Nach der Fixierung mit 90%igem Ethanol wurden die Platten luftgetrocknet.

#### 2.3.6.4 Anfärben der Kolonien

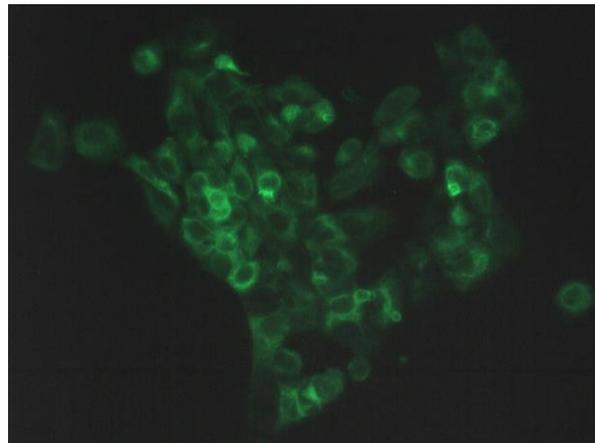
Zur Vermeidung der unspezifischen Bindung des Primärantikörpers am Plattenmaterial wurde zunächst für 30 min mit je 200 µl Blocklösung (1% FKS und 0,05% Tween in PBS) geblockt. Nach dem Abgießen der Überstände erfolgte die Färbung mit je 100 µl des pan-Cytokeratin-Antikörpers (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA) in einer 1:400-Verdünnung. Dieser Antikörper wurde nach einer Inkubationszeit von 2 bis 4 h bei RT zweimal mit je 200 µl Waschlösung (0,05% Tween 20 in PBS) ausgewaschen. Danach erfolgte die Färbung mit je 100 µl des murinen Cy2<sup>TM</sup>-Antikörpers (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK). Nach zweistündiger Inkubation wurde erneut zweimal gewaschen und schließlich mit je 200 µl *bidest. Aqua* gespült.

#### 2.3.6.5 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Koloniebildung

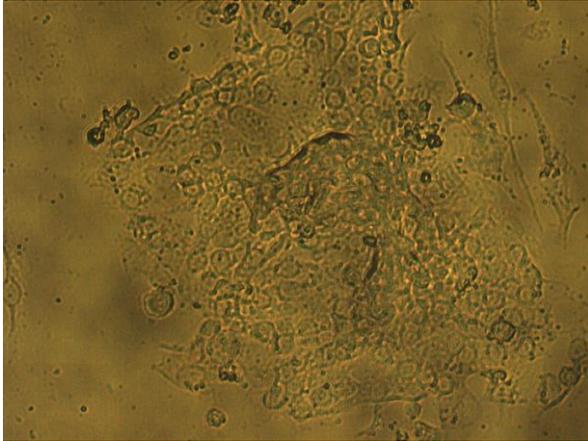
Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Koloniebildung erfolgte am Forschungsmikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Jena) bei 100- bzw. 200-facher Vergrößerung unter der Verwendung des FITC-Filters. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit Licht der Wellenlänge  $\lambda=488$  nm. Die Fluoreszenz des Cy2<sup>TM</sup>-Antikörpers wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda=519$  nm detektiert. In jeder Kavität wurden die Kolonien gezählt. Eine Gruppe von mindestens sechs miteinander in Verbindung stehenden Zellen wurde als Kolonie gewertet. Gezählt wurden nur vitale Zellen, deren Zellkern sich deutlich vom Zytoplasma unterschied und deren Zellmembran intakt schien. Wurden mindestens 4 Kolonien je Kontrollkavität gezählt, galt der Test als evaluierbar und somit als positiv.



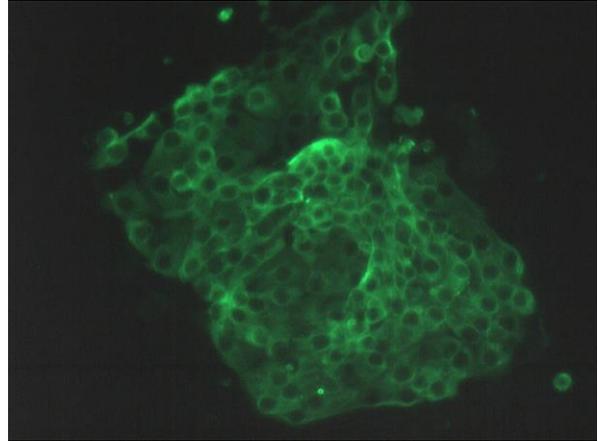
**Abb. 6:** Lichtmikroskopischer Nachweis fixierter Zellkolonien nach 72-stündiger Kultur. Die exakte Differenzierung zwischen epithelialen Zellen und Stromazellen wird erst in der Fluoreszenzfärbung möglich. 200-fache Vergrößerung, Pat.-Nr. 43



**Abb. 7:** Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis epithelialer Kolonien nach 72-stündiger Kultur in 200-facher Vergrößerung, Pat.-Nr. 43



**Abb. 8:** Lichtmikroskopischer Nachweis fixierter Zellkolonien nach 72-stündiger Kultur. Die exakte Differenzierung zwischen epithelialen Zellen und Stromazellen wird erst in der Fluoreszenzfärbung möglich. 200-fache Vergrößerung, Pat.-Nr. 17



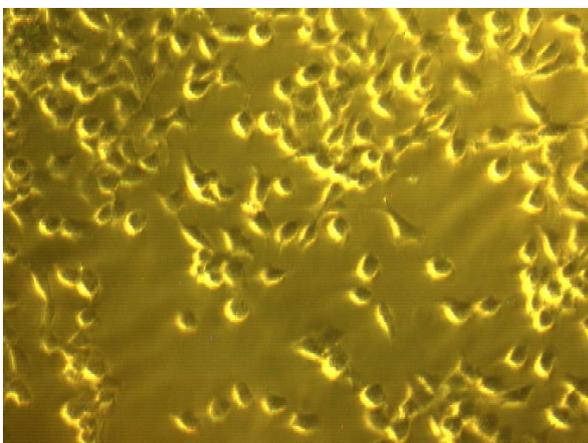
**Abb. 9:** Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis epithelialer Kolonien nach 72-stündiger Kultur in 200-facher Vergrößerung, Pat.-Nr. 17

### 2.3.7 KB-Zell-Kontrolltest

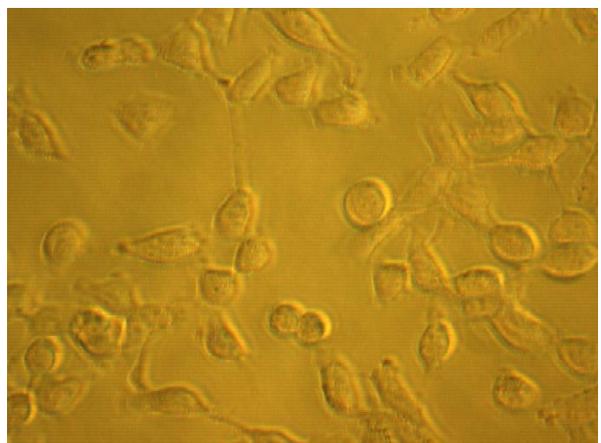
Parallel zur *Chemoresponse*-Testung an HNSCC wurden die Zytostatika unter denselben Bedingungen an der KB-Zelllinie getestet. Dadurch erfährt der FLAVINO-Assay seine Qualitätssicherung und Reproduzierbarkeit.

#### 2.3.7.1 Die KB-Zelllinie

Die KB-Zelllinie wird als Modell für Keratinozyten verwendet. Es handelt es sich hierbei um eine Subzelllinie von HeLa-Zellen, die einem Adenokarzinom der Zervix entstammen (Masters 2000, NCBI 2013b). Die HeLa-Zelllinie war die erste kontinuierlich kultivierte Zelllinie humaner maligner Zellen (NCBI 2013a).



**Abb. 10:** Lichtmikroskopische Darstellung von KB-Zellen nach eintägiger Kultur, 200-fache Vergrößerung



**Abb. 11:** Lichtmikroskopische Darstellung von KB-Zellen nach eintägiger Kultur, 400-fache Vergrößerung

### 2.3.7.2 Kultivierung der KB-Zellen

Die Kultivierung der KB-Zellen erfolgte in Gewebekulturflaschen einer Größe von 25 cm<sup>2</sup>. Wechseltägig wurde das KB-Zell-Kulturmedium (flavin- und phenolrotfreies RPMI 1640 mit 10% FKS und 1% Glutamin) erneuert. Die Passagierung und Subkultivierung der KB-Zellen erfolgte, sobald ein Zellrasen den Boden der Kulturflasche bedeckte. Dazu wurden die Zellen zunächst zweimalig mit PBS gespült und danach mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Nach erfolgter Zelldichtebestimmung (vgl. 2.3.7.3) wurden  $2,5 \times 10^5$  KB-Zellen der Zellsuspension in Kulturflaschen mit frischem KB-Zell-Kulturmedium transferiert. Die Gewebekulturflaschen inkubierten unter den beschriebenen Standardbedingungen.

### 2.3.7.3 Zelldichtebestimmung

Die Bestimmung der Zelldichte der KB-Zellen erfolgte mit dem Zellanalysegerät Casy TT<sup>®</sup> und der dazugehörigen Casystat<sup>®</sup>-Software (Schärfe System, Reutlingen). Nach Trypsinierung und Zentrifugation der KB-Zellen wurde das Zellpellet erneut in Tumormedium gelöst. Aus dieser Zellsuspension wurden 100 µl in 10 ml isotonische Casyton<sup>®</sup>-Elektrolytlösung (Casy<sup>®</sup>-Technology, Reutlingen) pipettiert. Nach der Reinigung der Zählvorrichtung mit Casyton<sup>®</sup>-Lösung wurde in drei Messdurchgängen die Zelldichte bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der Casystat<sup>®</sup>-Software.

### 2.3.7.4 *Ex-vivo-Chemoresponse*-Testung an KB-Zellen

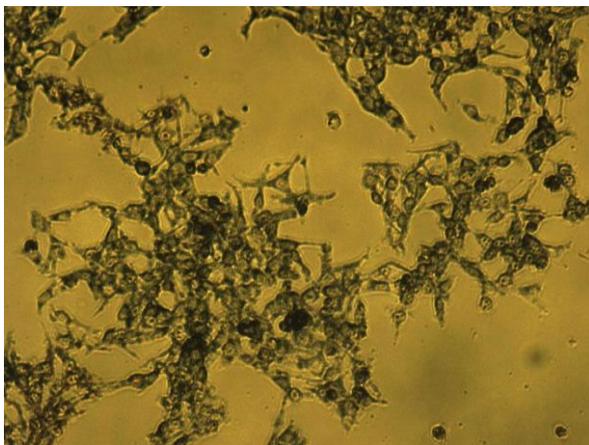
Die Zytostatika Cisplatin (800 nM), Docetaxel (1,24 nM), Cilengitide (10 µM) und Temsirolimus (500 nM) wurden in den auf KB-Zellen adaptierten Konzentrationsbereichen entsprechend dem Vierfachen der IC<sub>50</sub>-Werte (Angaben in den Klammern) und sechs Konzentrationsstufen darunter getestet. Für die Testung wurden unbeschichtete Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten genutzt. In jede Kavität wurden 100 µl Tumormedium vorgelegt. In die Kavitäten mit der höchsten Zytostatika-Konzentration wurden 100 µl des Zytostatikums pipettiert und mit einer Mehrkanalpipette kräftig durchmischt. Indem 100 µl aus jeder Kavität entnommen und auf die nächste Reihe überführt wurden, erfolgte die serielle Verdünnung um den Faktor 2. Nach Herstellung der niedrigsten Konzentration wurden 100 µl verworfen. Eine Reihe mit nur 100 µl Tumormedium als Kontrolle wurde beim Verdünnen übersprungen. Nach dreißigminütiger Vorinkubation im Brutschrank unter Standardbedingungen wurde die KB-Zell-Suspension mit 200 µl je Kavität ( $10^4$  KB-Zellen / Kavität) pipettiert. Die Zellkulturplatte inkubierte für 72 h bei 36,5°C und 3,5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Nach der Entnahme von 240 µl Überstand je Kavität folgte die Durchführung des unter 2.3.8 beschriebenen MTT-Vitalitätstests. Die Tabelle 10 fasst die Konzentrationen der Verdünnungsstufen zusammen.

**Tab. 10:** Konzentrationen der im MTT-Vitalitätstest getesteten Zytostatika

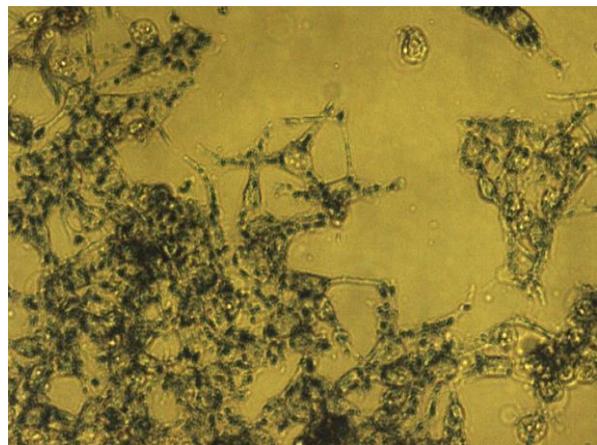
Cisplatin [nM]	Docetaxel [nM]	Cilengitide [nM]	Temsirolimus [nM]
12,5	0,019375	156,25	78,125
25	0,03875	312,5	156,25
50	0,0775	625	312,5
100	0,155	1250	625
200	0,31	2500	1250
400	0,62	5000	2500
800	1,24	10000	5000

### 2.3.8 MTT-Vitalitätstest

Der MTT-Assay ist ein nicht-klonogener Assay, bei dem im Gegensatz zum klonogenen Assay nicht die Koloniebildung beurteilt wird (Wichmann *et al.* 2011b). Stattdessen ermöglicht er die Beurteilung der Proliferation und metabolischen Aktivität von Zellen sowie deren Zytotoxizität. Hierbei wird das Tetrazoliumsalz MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*) genutzt, dessen Tetrazoliumring in Stoffwechsel-aktive Mitochondrien aufgenommen wird. Dort wird MTT durch Dehydrogenasen oxidiert, die nur eine geringe Stabilität haben (Halbwertszeit ca. 30 min). Die Oxidation erfolgt demnach fast ausschließlich in lebenden Zellen. Je aktiver die Zellen sind und je größer die Anzahl lebender Zellen ist, desto höher ist die Metabolisierung des MTT. Es entsteht ein dunkelblaues Formazan als Oxidationsprodukt (Mosmann 1983). Dies ist nur bedingt im Medium löslich. Da für die Messung der Extinktion eine homogene Lösung erforderlich ist, wurden die Formazan-Kristalle mit SDS/DMF (10% w/v SDS in 50%iger wässriger DMF-Lösung) gelöst. Die Extinktion wurde bei  $\lambda=570$  nm mithilfe des Photometers Synergy 2 (BioTek Deutschland, Bad Friedrichshall) gemessen.



**Abb. 12:** Lichtmikroskopische Darstellung von KB-Zellen nach Zugabe von MTT unter Herausbildung violetter Formazan-Kristalle, 100-fache Vergrößerung



**Abb. 13:** Lichtmikroskopische Darstellung von KB-Zellen nach Zugabe von MTT unter Herausbildung violetter Formazan-Kristalle, 200-fache Vergrößerung

### 2.3.9 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Mithilfe von ELISA erfolgte die Quantifizierung der Zytokine MCP-1, IL-6, IL-8 und VEGF in den Kulturüberständen aus der *Ex-vivo-Chemoresponse*-Testung in Zellkulturplatten mit 6 und 48 Kavitäten sowie in Patientenseren. Für die Quantifizierung von MCP-1, IL-6 und IL-8 wurden ELISA-Kits von BD (BD Biosciences, San Diego, USA) verwendet. Die VEGF-Quantifizierung wurde mit einem ELISA-Kit von R&D (R&D Systems, Abingdon, GB) durchgeführt.

#### 2.3.9.1 Funktionsprinzip

Die verwendeten Assays waren als indirekte Sandwich-ELISA aufgebaut, um unter Nutzung der hohen Spezifität monoklonaler Antikörper sowohl für die Anreicherung des Analyten an der festen Phase (ELISA-Platte), als auch für die Detektion des Analyten (hier biotinylierte Detektionsantikörper) ein geeignetes Enzym (hier: Meerrettich-Peroxidase, HRP) für den enzymkatalysierten Umsatz eines chromogenen Substrates (hier: Peroxid plus TMB als Wasserstoffdonator) für die colorimetrische Quantifizierung durch Extinktionsmessung zu nutzen.

#### 2.3.9.2 Beschichtung

96-Well-Half-Area-ELISA-Platten (Greiner Bio-one, Frickenhausen) wurden mit den Beschichtungsantikörpern (murine monoklonale Antikörper gegen *humanes* MCP-1, IL-6, IL-8 oder VEGF) beschichtet und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer gelagert. Dazu wurden die Beschichtungsantikörper in PBS verdünnt (MCP-1 1:500, IL-6 1:1000, IL-8 1: 500 und VEGF 1:183) und je 50 µl/well dieser Verdünnung pipettiert.

#### 2.3.9.3 Waschen der Platten

Die ELISA-Platten zur Quantifizierung von MCP-1, IL-6 und IL-8 wurden nach dem Beschichten, Blocken und der Inkubation der Proben und Standards dreimal mit je 200 µl Waschlösung (0,025% Tween in PBS) pro Kavität gewaschen. Hierfür wurde der Tecan™ Hydroflex®-Washer (Tecan, Männedorf, Schweiz) verwendet. Nach der Inkubation des Detektionssystems wurden die Platten sechsmal gewaschen.

Abweichend zum oben beschriebenen Vorgehen wurden die Platten zur VEGF-Quantifizierung nach der Inkubation des Detektionsantikörpers dreimal und nach der Inkubation der Meerrettich-Peroxidase (HRP) sechsmal gewaschen.

#### 2.3.9.4 Blocken

Das Blocken erfolgte mit 100 µl Assaypuffer (5% FKS in PBS) je Kavität unter Inkubation in einer feuchten Kammer für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

### 2.3.9.5 Inkubation der Proben und Standards

Die Standards (*recombinant human MCP-1, IL-6, IL-8, VEGF*) wurden mit Assaypuffer in absteigender Reihenfolge seriell mit Faktor 2 verdünnt. Die Tabelle 11 gibt die Konzentration der Standards wieder. Für die Quantifizierung von IL-6 und IL-8 wurden die Proben im Verhältnis 1:5 mit Assaypuffer verdünnt. MCP-1 und VEGF wurden in unverdünnten Proben gemessen. Es wurden je 50 µl/well der Probe bzw. des Standards aufgetragen und für 2 h inkubiert (RT, feuchte Kammer).

**Tab. 11:** Konzentrationen der zur Zytokinquantifizierung genutzten Standards

Standard	MCP-1 [pg/ml]	IL-6, IL-8 [pg/ml]	VEGF [pg/ml]
S1	2000	5000	1000
S2	1000	2500	500
S3	500	1250	250
S4	250	625	125
S5	125	312,5	62,5
S6	62,5	156,25	31,25
S7	31,25	78,125	15,625
S8	15,625	39,063	7,8125
S9	7,8125	19,531	3,9063
S10	3,9063	9,7656	1,9531
S11	1,9531	4,8828	0,97656
S12	0,97656	2,4414	0,48828

### 2.3.9.6 Detektionssystem

Um eine optimale Kombination von biotinyliertem Detektionsantikörper und Streptavidin-HRP-Konjugat zu erzielen und um Detektions-AK-HRP-Komplexe möglichst einheitlicher Größe (und Enzymaktivität) zu erzielen, mussten beide 30 min vor Verwendung in Assaypuffer verdünnt vorinkubiert werden (RT). Für die Detektion von MCP-1 wurden Detektionsantikörper im Verhältnis 1:2000 und HRP 1:500 in Assaypuffer verdünnt. Das Detektionssystem für IL-8 wurde je 1:500, für IL-6 je 1:1000 verdünnt.

### 2.3.9.7 Inkubation des Detektionssystems

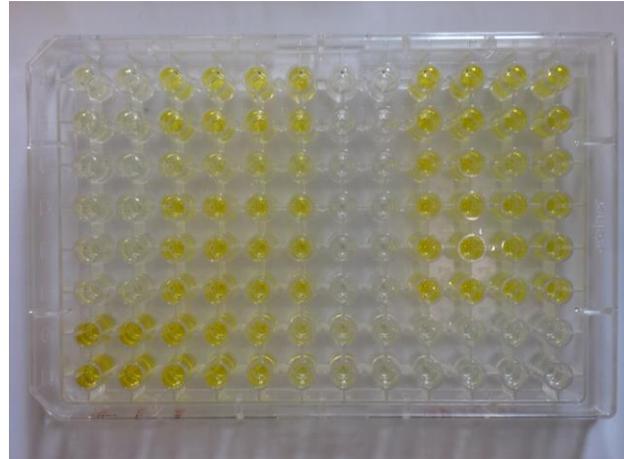
Es wurden 50 µl/well des Detektionssystems eingesetzt. Danach folgte eine einstündige Inkubation bei RT (feuchte Kammer). Beim VEGF-ELISA erfolgte abweichend zum oben beschriebenen Vorgehen zunächst die Inkubation des 1:200-verdünnten Detektionsantikörpers (*biotinylated goat anti-human VEGF*). Nach dem Waschen der Platte wurde die 1:400-verdünnte HRP-Konjugat-Lösung aufgetragen. In beiden Schritten wurden je 50 µl/well pipettiert und die Platten für 30 min inkubiert (RT, feuchte Kammer).

### 2.3.9.8 Farbreaktion

Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe des chromogenen Substrats 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (Thermo Fisher Scientific, Bonn) für den MCP-1- und VEGF-Nachweis und BD OptEIA™ Substrate Reagent A+B (BD Biosciences, San Diego, USA) für den Nachweis von

IL-6 und IL-8 gestartet. Nach 30 min Inkubation (RT, dunkle Kammer) wurde die Farbreaktion mit 1 M  $H_2SO_4$  abgestoppt. Nach Farbumschlag entstand die gelbe Färbung des oxidierten TMB (Abb. 14).

**Abb. 14:** Konzentrationsabhängig differente Farbintensität der gelben Färbung des Oxidationsproduktes von TMB im sauren pH-Bereich (Farbumschlag von blau nach gelb durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure), gezeigt am Beispiel eines ELISA von Kulturüberständen aus dem 6-Well-Ansatz zur Quantifizierung von IL-6. Duplikate der Proben wurden in den Zeilen A bis F gemessen, während in G und H die jeweiligen Duplikate der für die Erstellung der Kalibrierkurve genutzten Standard-Konzentrationen aufgetragen wurden. Die mit der Verminderung der IL-6-Konzentration einhergehende Verminderung der Farbintensität belegt die für die Quantifizierung nutzbare Korrelation.



#### 2.3.9.9 Messung der Extinktion

Die Extinktion der Proben wurde mithilfe des Photometers Synergy 2 (BioTek Deutschland, Bad Friedrichshall) bei  $\lambda=450$  nm und  $\lambda=620$  nm gemessen. Die Verarbeitung der Daten erfolgte mithilfe des Programms Gen5 1.08 (BioTek). Die  $E_{450nm}$  wurde um die  $E_{620nm}$  der Referenzfiltermessung korrigiert ( $E_{450nm} - E_{620nm}$ ), bevor die Vier-Parameter-Kalibrierkurve optimal angepasst und aus ihr über Interpolation die zu den Extinktionen korrespondierenden Zytokinkonzentrationen errechnet wurden. Die Messdaten wurden in Microsoft Excel 2003 exportiert und weiter bearbeitet.

#### 2.3.10 Recherche der Patientencharakteristik

Durch Recherche in den Patientenakten der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Leipzig wurden Angaben zu Alter und Geschlecht der Patienten sowie Tumorlokalisation, Tumorstadium nach UICC und *Staging* inklusive Tumorausdehnung (T), Lymphknotenbefall (N) und Fernmetastasierung (M) gesammelt. Außerdem wurden Informationen zum *Grading* (G), histopathologischen Befund und Tabak- und Alkoholkonsum zusammengetragen. Der Recherche zugängliche Quellen waren hierbei das Handarchiv der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, die klinikinterne Tumordatenbank und das Patientenverwaltungsprogramm SAP.

#### 2.3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Visualisierung der Ergebnisse der Zytokinquantifizierung und der Koloniebildung erfolgte mithilfe von Microsoft Excel 2003 und WinSTAT. Sofern nicht

andere bezeichnet, sind in den Diagrammen Mediane und der Interquartilenbereich der 25. und 75. Perzentile gezeigt. Mithilfe des  $H$ -Tests nach Kruskal-Wallis wurden Signifikanzniveaus der Zytokinmessungen in Patientenseren und Kulturüberständen unter Berücksichtigung gruppierender Variablen berechnet. Um signifikante Rangfolgen zu bestätigen, wurde der  $U$ -Test nach Mann-Whitney genutzt. Dabei wurde angenommen, dass die Zytokinexpression in Patientenseren und Kulturüberständen keiner Normalverteilung folgt. Diese Annahme wurde durch den Kolmogorov-Smirnov-Test für kontinuierliche Variablen und den Chi-Quadrat-Test für diskrete Variablen bestätigt. Mithilfe des  $t$ -Tests für gepaarte Proben wurden Signifikanzniveaus für Vergleiche im 48-Well-Ansatz errechnet. Für Korrelationen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman errechnet. Eine statistische Sicherheit von  $p < 0,05$  galt als statistisch signifikant,  $p < 0,001$  als statistisch hoch signifikant.

### **2.3.12 Bestimmung der Interaktionsmechanismen in den Kombinationsexperimenten zur Stimulation durch MCP-1 und Inhibition von MCP-1**

Für die mathematische Beschreibung von Interaktionsmechanismen wie Additivität, Synergismus oder Antagonismus wurde die Methode nach Zheng-jun Jin verwendet (Jin 2004). Es handelt sich hierbei um eine Summenformel der Wahrscheinlichkeiten für beobachtete und erwartete Effekte. Dabei wird der Quotient  $q$  aus dem beobachteten und dem erwarteten Effekt ermittelt:  $q = (P_A + P_B) / (P_A + P_B - P_A * P_B)$ . Der Quotient  $q$  wird zur Bewertung des Interaktionsmechanismus herangezogen. Auf die Experimente im 48-Well-Ansatz bezogen, ist dabei der beobachtete Effekt das Ergebnis des Kombinationsexperiments aus Zytostatikum und dem Anti-MCP-1-Antikörper oder zusätzlichem MCP-1 ( $P_A + P_B$ ). Der nach dem Modell der unabhängigen Wirkung zweier Pharmaka erwartete Effekt ist die Summe der Einzeleffekte vermindert um das Produkt der Einzeleffekte, d.h. der in der Testung der Substanzen allein ermittelten Effekte:  $(P_A + P_B - P_A * P_B)$ . Ein  $q = 1$  entspricht Additivität,  $q > 1$  bedeutet Synergismus und  $q < 1$  steht für Antagonismus. Da wegen experimenteller Schwankungen  $q$  selten genau 1 ist, sondern vielmehr innerhalb eines Konfidenzintervalls zu vermuten ist, wird entsprechend üblicher Fehlergrenzen ( $\alpha = 0,05$ ;  $\beta = 0,05$ ) eine Toleranz von 0,15 angegeben, sodass Additivität besteht, wenn  $q$  im Intervall zwischen 0,85 und 1,15 liegt. Ein  $q < 0,85$  spricht für Antagonismus, während bei  $q > 1,15$  Synergismus vorliegt. Als Maß der Effekte wurden Koloniebildung und Zytokinexpression in Kulturüberständen auf die unbehandelte Kontrolle normiert, sodass zunächst relative Werte generiert wurden, die der Anzahl überlebender Tumorzellen relativ zum Mittelwert der Kontrolle entsprachen. Überlebten alle Zellen oder wurde die Koloniebildung nicht beeinflusst, war der Effekt gleich 0 (0%). Wurden dagegen alle Tumorzellen abgetötet (oder die Koloniebildung komplett unterdrückt), entsprach dies einer Effektstärke von 1 (oder 100%).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Zytokinquantifizierung in Patientenseren

##### 3.1.1 Deskriptive Statistik der Zytokinquantifizierung in Patientenseren

Die Zytokinquantifizierung erfolgte in 45 Patientenseren. Die mittlere Serumkonzentration von VEGF (1407,33 pg/ml) war höher als diejenigen von MCP-1 (822,05 pg/ml), IL-8 (85,22 pg/ml) und IL-6 (55,43 pg/ml). Die Tabelle 12 zeigt Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane sowie die 25. und 75. Perzentilen für die Serumkonzentrationen von MCP-1, IL-6, IL-8 und VEGF in Seren von 45 HNSCC-Patienten.

**Tab. 12:** Deskriptive Statistik der Zytokinquantifizierung in Patientenseren (n=45)

	MCP-1 [pg/ml]	IL-6 [pg/ml]	IL-8 [pg/ml]	VEGF [pg/ml]
Mittelwert	822,05	55,43	85,22	1407,33
Standardabweichung	512,96	142,46	91,37	3444,02
Median	757,79	20,91	51,79	659,00
25. Perzentile	451,87	3,50	30,96	227,70
75. Perzentile	1022,96	55,53	108,60	1571,63

##### 3.1.2 Vergleichende Statistik der Zytokinexpression in Patientenseren in Abhängigkeit der Patientencharakteristik

Für die vergleichende Statistik der Zytokinexpression in Patientenseren in Abhängigkeit der Patientencharakteristik wurde der *H*-Test nach Kruskal-Wallis verwendet, um Unterschiede in den Subgruppen der Patienten entsprechend verschiedener Charakteristika auf Signifikanz zu prüfen. Es wurde nach Unterschieden in der Zytokinexpression in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht der Patienten sowie Tumorlokalisierung, Tumorstadium nach UICC und *Staging* inklusive Tumorausdehnung (T), Lymphknotenbefall (N) und Fernmetastasierung (M) gesucht. Weitere gruppierende Variablen waren *Grading* (G), der histopathologische Befund sowie Tabak- und Alkoholkonsum. Die Tabelle 13 zeigt die *p*-Werte für die beschriebenen Vergleiche unter Verwendung des *H*-Tests nach Kruskal-Wallis.

**Tab. 13:** *H*-Test (Kruskal-Wallis) für Patientencharakteristik

Kriterium	MCP-1	IL-6	IL-8	VEGF
UICC	<i>p</i> =0,8604	<i>p</i> =0,6014	<i>p</i> =0,4201	<i>p</i> =0,0540
T	<i>p</i> =0,5105	<i>p</i> =0,1457	<i>p</i> =0,5351	<i>p</i> =0,1824
N	<i>p</i> =0,4194	<i>p</i> =0,2707	<i>p</i> =0,2491	<i>p</i> =0,4488
M	<i>p</i> =0,5309	<i>p</i> =0,2207	<i>p</i> =0,2475	<b><i>p</i>=0,0080</b>
Lokalisation	<i>p</i> =0,6099	<i>p</i> =0,2725	<i>p</i> =0,1445	<i>p</i> =0,5243
Geschlecht	<i>p</i> =0,7440	<i>p</i> =0,8466	<i>p</i> =0,7893	<i>p</i> =0,5727
Grading	<i>p</i> =0,5147	<i>p</i> =0,9129	<i>p</i> =0,7260	<i>p</i> =0,7527
Alter	<i>p</i> =0,9048	<i>p</i> =0,1937	<i>p</i> =0,9682	<i>p</i> =0,2998
Histologie	<i>p</i> =0,9048	<i>p</i> =0,1937	<i>p</i> =0,9682	<i>p</i> =0,2998
Alkoholkonsum	<i>p</i> =0,7468	<i>p</i> =0,0553	<i>p</i> =0,9901	<i>p</i> =0,9802
Tabakkonsum	<i>p</i> =0,9273	<i>p</i> =0,1233	<i>p</i> =0,3376	<i>p</i> =0,1527

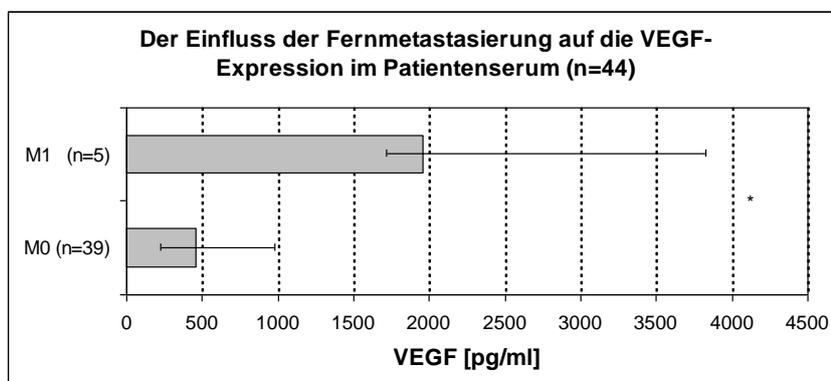
Signifikante Unterschiede wurden im *H*-Test nach Kruskal-Wallis nur für den Vergleich der VEGF-Konzentration in Patientenseren fernmetastasierter und nicht fernmetastasierter

Tumoren gefunden ( $p=0,0080$ ). Für VEGF wurde der Trend zu höheren Konzentrationen in Patientenseren fortgeschrittener Tumorstadien beobachtet ( $p=0,0540$ ).

Mithilfe des *U*-Tests nach Mann-Whitney wurde die Zytokinexpression in den Subgruppen untereinander verglichen. Dabei wurde angenommen, dass die Zytokinexpression in Patientenseren nicht normalverteilt ist. Im Kolmogorov-Smirnov-Test für kontinuierliche Variablen und im Chi-Quadrat-Test für diskrete Variablen wurde diese Annahme bestätigt. Es zeigten sich folgende Ergebnisse: Die MCP-1- und IL-8-Konzentrationen in Patientenseren stiegen stadienabhängig an. Im *U*-Test zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen. Für IL-6 wurde ein solcher Trend nicht beobachtet. In Seren von HNSCC-Patienten im Stadium UICC IVB, IVC wurde signifikant mehr VEGF gemessen als in Seren der Stadien UICC I, II, III ( $p=0,0263$ ). Patientenseren der Stadien IVB, IVC wiesen signifikant mehr VEGF auf als Seren des Stadiums IVA ( $p=0,0166$ ). In der Betrachtung des Einflusses der Tumorgröße (T) wiesen Patientenseren des Tumorstadiums T4b (inoperable Primärtumoren mit entsprechender Gewebsinfiltration) höhere IL-6-Konzentrationen als Tumoren der Stadien T3 ( $p=0,0335$ ) und T4a ( $p=0,0493$ ) auf. Weitere signifikante Unterschiede fanden sich in Abhängigkeit der Tumorlokalisation. Patienten mit Hypopharynxkarzinomen hatten höhere IL-6- und IL-8-Serumlevel als Patienten mit Larynxkarzinomen ( $p=0,0272$  für IL-6 und  $p=0,0143$  für IL-8). Bei Patienten mit Oropharynxkarzinomen fanden sich höhere IL-8-Konzentrationen als bei Patienten mit Larynxkarzinomen ( $p=0,0445$ ).

In Patientenseren fernmetastasierter Tumoren (M1) wurde mit 1961,22 pg/ml signifikant mehr VEGF gemessen als bei nicht fernmetastasierten Tumoren (M0) ( $p=0,0033$ ), bei denen im Median 455,65 pg/ml gemessen wurden. Die Abbildung 15 verdeutlicht diesen Unterschied.

**Abb. 15:** Gezeigt ist der signifikante Unterschied ( $p=0,0033$ ) der VEGF-Expression in Patientenseren fernmetastasierter Tumoren (M1) und nicht fernmetastasierter Tumoren (M0).

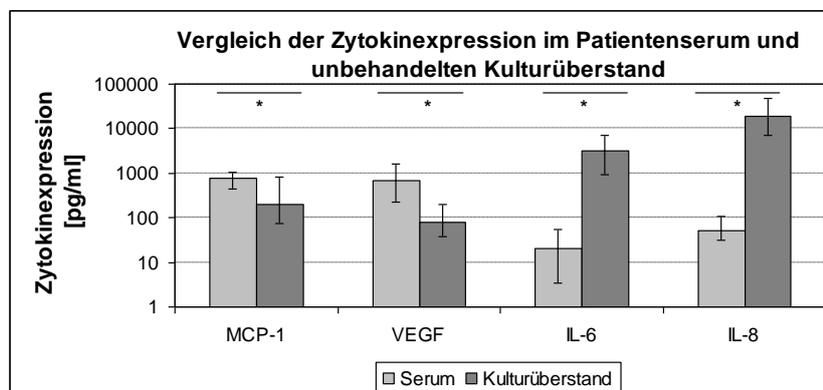


Hinsichtlich Geschlechts, Lymphknotenbefalls (N0 gegenüber N+), *Gradings* (G2 gegenüber G3), der Histologie (Primum gegenüber Metastase) und des Tabak- und Alkoholkonsums wurden im *U*-Test keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinexpression im Patientenserum festgestellt.

### 3.1.3 Vergleich der Zytokinexpression in Patientenserum und Kulturüberständen

Bei 45 Patienten wurde mithilfe des *U*-Tests ein Vergleich der MCP-1-, IL-6- und IL-8-Expression im Serum und im Kulturüberstand angestellt. Für VEGF wurden die Ergebnisse von 44 Patienten einbezogen. Die Abbildung 16 veranschaulicht die Konzentrationen der Zytokine im Patientenserum und Kulturüberstand.

**Abb. 16:** Gezeigt sind signifikante Unterschiede der Konzentrationen für MCP-1, VEGF, IL-6 und IL-8 im Patientenserum und im Kulturüberstand.



Es zeigten sich signifikant höhere MCP-1- und VEGF-Konzentrationen im Patientenserum als im Kulturüberstand ( $p=0,0010$  für MCP-1,  $p=8,98 \cdot 10^{-8}$  für VEGF). Für IL-6 und IL-8 wurden dagegen höhere Konzentrationen im Kulturüberstand als im Serum gemessen ( $p=3,11 \cdot 10^{-15}$  für IL-6,  $p=6,66 \cdot 10^{-16}$  für IL-8).

### 3.2 *Ex-vivo-Chemoresponse*-Testung in Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten (6-Well-Ansatz)

Insgesamt wurden 65 *Chemoresponse*-Testungen im 6-Well-Ansatz durchgeführt. In die statistische Auswertung wurden die Zytokinquantifizierungen von 57 Testungen einbezogen. Fünf Testungen wurden aufgrund einer abweichenden Tumorentität ausgeschlossen. Drei Testungen flossen wegen infizierter Zellkulturen nicht in die Auswertung ein. Im Folgenden wird die Auswertung zweier Datensätze dargestellt:

Im ersten Datensatz kommen 57 Testungen mit Cisplatin und Docetaxel, bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle, zur Darstellung. Hierbei steht eine vergleichende statistische Aufarbeitung in Abhängigkeit der Patientencharakteristik im Vordergrund. Im zweiten Datensatz werden 20 Testungen mit Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus, bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle, dargestellt. Dabei soll besonders der Effekt der Zytostatika auf die Zytokinexpression von HNSCC *ex vivo* betrachtet werden. Aufgrund der geringen Fallzahlen in den Subgruppen der Patientencharakteristik war die oben beschriebene vergleichende statistische Aufarbeitung für den zweiten Datensatz nicht möglich.

### 3.2.1 Untersuchung der Zytokinexpression in Kulturüberständen in Abhängigkeit der Patientencharakteristik

Die folgende Darstellung der Ergebnisse bezieht sich auf den ersten Datensatz von 57 getesteten Tumoren. Analog zur Untersuchung der Zytokinexpression in Patientenseren in Abhängigkeit der Patientencharakteristik wurde für die statistische Aufarbeitung der Zytokine in Kulturüberständen der *H*-Test nach Kruskal-Wallis verwendet, um signifikante Unterschiede in den Subgruppierungen der Patientencharakteristik zu detektieren. Wurden Signifikanzniveaus  $p \leq 0,05$  gefunden, erfolgte die Bestätigung der Rangfolge durch den *U*-Test. Hinsichtlich der Tumorlokalisation zeigten sich folgende Verhältnisse:

Unbehandelte Hypopharynxkarzinome wiesen signifikant höhere MCP-1-, IL-6-, und VEGF-Konzentrationen als unbehandelte Oropharynxkarzinome auf ( $p=0,0340$  für MCP-1,  $p=0,0403$  für IL-6 und  $p=0,0371$  für VEGF). Diese Unterschiede blieben auch unter dem Einfluss von Cisplatin und Docetaxel bestehen (für Cisplatin: MCP-1:  $p=0,0083$ ; IL-6:  $p=0,0101$ ; VEGF:  $p=0,0091$ ; für Docetaxel: MCP-1:  $p=0,0476$ ; IL-6:  $p=0,0403$ ; VEGF:  $p=0,0476$ ). Für die IL-8-Expression wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (unbehandelte Kontrolle:  $p=0,0886$ , Cisplatin:  $p=0,0606$ , Docetaxel:  $p=0,2239$ ). Bezogen auf die individuelle Kontrolle konnte Docetaxel die MCP-1-Produktion in Kulturen von Larynxkarzinomen stärker supprimieren als in denen von Oropharynxkarzinomen ( $p=0,0262$ ). Die IL-6-Produktion wurde durch Docetaxel in Hypopharynxkarzinomen stärker reduziert als in Oropharynxkarzinomen ( $p=0,0371$ ). Bezogen auf die individuelle Kontrolle wurde MCP-1 durch Cisplatin in den Kulturüberständen nicht fernmetastasierter Tumoren (M0) signifikant stärker supprimiert als bei fernmetastasierten Tumoren (M1) ( $p=0,0344$ ).

Im *H*-Test zeigte sich, dass die MCP-1-, IL-6- und IL-8-Konzentrationen im unbehandelten Kulturüberstand der Proben der Patienten mit positiver Raucheranamnese signifikant niedriger waren als bei den Proben der Nichtraucher (MCP-1:  $p=0,0058$ ; IL-6:  $p=0,0168$ ; IL-8:  $p=0,0194$ ). Dieser Umstand zeigte sich auch unter dem Einfluss von Cisplatin (MCP-1:  $p=0,0431$ ; IL-6:  $p=0,0312$ ; IL-8:  $p=0,0380$ ) und Docetaxel (MCP-1:  $p=0,0030$ ; IL-6:  $p=0,0063$ ; IL-8:  $p=0,0168$ ). Sowohl unter Cisplatin als auch unter Docetaxel wurden in den Kulturüberständen der Tumoren der Patienten mit einem Alkoholkonsum größer als 30 g/d signifikant weniger IL-8 und VEGF gemessen als in Tumoren der Patienten ohne Alkoholkonsum.

### 3.2.2 Untersuchung des Einflusses der getesteten Zytostatika auf die Zytokinproduktion in HNSCC *ex vivo*

Die folgende Darstellung der Ergebnisse bezieht sich auf den zweiten Datensatz von 20 getesteten Tumoren. Die Tabelle 14 zeigt Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane sowie die 25. und 75. Perzentilen von MCP-1, IL-6, IL-8 und VEGF in Kulturüberständen.

Ergebnisse

**Tab. 14:** Deskriptive Statistik für 20 Testungen mit Cisplatin (Cis), Docetaxel (DTX), Cilengitide (Cil) und Temsirolimus (Tem) in pg/ml und bezogen auf die individuelle unbehandelte, nur mit Tumormedium versetzte Kontrolle (K) in Prozent.

Zytokin	n=20	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	25. Perzentile	75. Perzentile
		[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]
MCP-1	K	3360,28 100,00	13048,60 15,82	133,54 100,00	41,58 89,63	378,01 110,37
	Cis	1231,20 57,64	4568,42 30,10	43,07 54,33	19,12 33,09	414,15 73,12
	DTX	2284,21 107,51	8627,99 64,63	179,24 93,54	57,13 71,68	360,35 111,21
	Cil	2057,56 106,34	7448,82 37,41	173,09 102,06	43,99 79,00	457,84 126,43
	Tem	1842,20 80,44	7171,20 40,71	110,78 71,53	24,16 50,80	427,20 101,34
IL-6	K	5300,74 100,00	8559,17 14,30	1828,60 100,00	811,04 91,70	6762,90 108,30
	Cis	2881,92 55,83	5085,98 28,46	725,17 50,86	414,85 37,66	3480,77 64,56
	DTX	3795,78 89,40	5170,36 33,67	1945,12 80,37	845,83 65,32	4692,64 100,93
	Cil	4429,16 99,48	6052,45 35,21	2111,48 93,13	922,12 75,70	5610,51 114,69
	Tem	3405,80 76,15	5367,40 25,33	1460,95 77,18	544,98 60,28	3948,76 97,17
IL-8	K	32292,05 100,00	44666,03 12,87	11978,40 100,00	5950,35 93,07	38003,63 106,93
	Cis	17551,27 62,88	28145,35 24,12	6431,57 58,80	3454,09 49,66	20313,25 75,23
	DTX	21623,01 79,55	30355,43 36,19	9188,03 69,06	5669,52 56,58	28373,54 89,89
	Cil	36309,25 102,11	63358,10 52,62	10473,01 81,99	6862,58 63,64	27710,54 121,14
	Tem	25090,88 80,23	43076,51 27,03	9795,17 79,67	5023,01 65,18	26164,47 98,85
VEGF	K	172,40 100,00	361,79 17,94	48,04 100,00	25,21 84,17	100,64 115,32
	Cis	134,59 94,36	274,22 44,34	48,52 79,85	19,31 72,49	85,97 96,79
	DTX	164,11 101,75	354,24 35,62	51,99 96,46	24,15 72,58	72,26 112,93
	Cil	160,80 119,98	275,47 51,23	62,85 105,17	35,82 78,40	93,82 146,32
	Tem	142,82 76,55	323,78 26,64	30,67 79,74	16,12 60,16	76,38 93,25

Die verwendeten Zytostatika zeigten eine Modulation der Zytokinexpression im Kulturüberstand. Cisplatin erwies sich dabei als stärkster Inhibitor. Im Mittel wurde durch Cisplatin die MCP-1-Konzentration im Vergleich zur individuellen Kontrolle auf 57,64% gesenkt. IL-6 wurde auf 55,83% reduziert. IL-8 erfuhr eine Reduktion auf 62,88%, während VEGF nur auf 94,36% erniedrigt wurde. Docetaxel erhöhte die Konzentration von MCP-1 (107,51%) und VEGF (101,75%). IL-6 und IL-8 wurden durch Docetaxel gesenkt (IL-6: 89,40%, IL-8: 79,55%). Dagegen erhöhte Cilengitide die Konzentrationen von MCP-1 (106,34%), IL-8 (102,11%) und VEGF (119,98%). IL-6 wurde durch Cilengitide kaum moduliert (99,48%). Temsirolimus supprimierte alle untersuchten Zytokine (MCP-1: 80,44%; IL-6: 76,15%; IL-8: 80,23% und VEGF: 76,55%). Temsirolimus war demnach das Zytostatikum, dass die VEGF-Produktion am stärksten supprimierte, im Mittel noch stärker als Cisplatin, das dagegen der potenteste Inhibitor der MCP-1-, IL-6- und IL-8-Expression war.

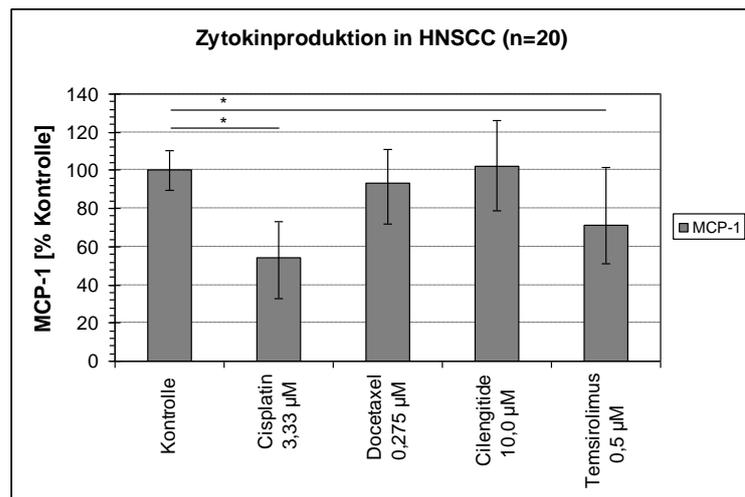
Mithilfe des *U*-Tests wurden die Effekte der antineoplastischen Substanzen auf die Zytokinproduktion der untersuchten Plattenepithelkarzinome *ex vivo* verglichen. Signifikante Unterschiede wurden erst deutlich, als die Effekte der Zytostatika auf die individuelle, unbehandelte Kontrolle normiert wurden. Cisplatin und Temsirolimus senkten die Produktion von MCP-1, IL-6, IL-8 und VEGF in den Kulturüberständen signifikant. Docetaxel gelang die signifikante Reduktion von IL-6 und IL-8, während unter Cilengitide keine signifikante Modulation der Zytokinexpression zu beobachten war. Cisplatin war generell der potenteste Inhibitor der Expression von MCP-1, IL-6 sowie IL-8 und war Docetaxel in der Reduktion von MCP-1 und IL-6 überlegen. Gegenüber Cilengitide war Cisplatin in der Reduktion von MCP-1, IL-6 und IL-8 überlegen, während es gegenüber Temsirolimus in der IL-6- und IL-8-Reduktion überlegen war. Die VEGF-Produktion wurde stärker durch Temsirolimus reduziert als durch Docetaxel, das die VEGF-Produktion nicht signifikant modulierte. Temsirolimus verringerte die MCP-1-, IL-6- und VEGF-Expression stärker als Cilengitide, das IL-6 und IL-8 kaum moduliert und bei MCP-1 und VEGF zu einer Zunahme (jedoch ohne statistische Signifikanz) führte. Die *p*-Werte der durchgeführten *U*-Tests sind der Tabelle 15 zu entnehmen. Diese belegt eindrucksvoll, dass zur Bestimmung der Effekte auf die Zytokinproduktion eine Normierung der ermittelten Konzentrationen auf den Mittelwert der unbehandelten Kontrollen unabdingbar ist, um die durch die individuelle Heterogenität der HNSCC bedingten Niveauunterschiede als störenden Einflussfaktor zu relativieren, der der Beschreibung der signifikanten Effekte entgegensteht.

**Tab. 15:** Gezeigt sind die *p*-Werte des *U*-Tests für 20 Testungen mit Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Tamsirolimus in pg/ml und bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent.

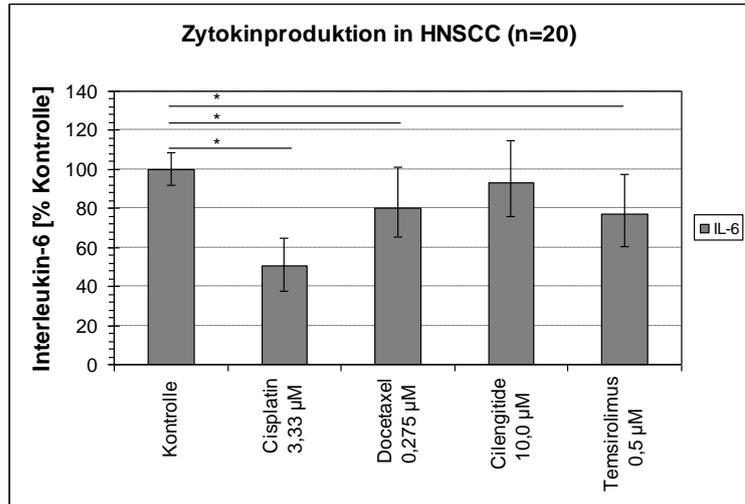
Vergleich	MCP-1	IL-6	IL-8	VEGF
	[pg/ml] [% Kontrolle]	[pg/ml] [% Kontrolle]	[pg/ml] [% Kontrolle]	[pg/ml] [% Kontrolle]
Kontrolle / Cisplatin	<i>p</i> =0,2036 <b><i>p</i>=8,69*10<sup>-6</sup></b>	<i>p</i> =0,1368 <b><i>p</i>=4,04*10<sup>-7</sup></b>	<i>p</i> =0,2235 <b><i>p</i>=3,72*10<sup>-6</sup></b>	<i>p</i> =0,7815 <b><i>p</i>=0,0020</b>
Kontrolle / Docetaxel	<i>p</i> =0,9569 <i>p</i> =0,2662	<i>p</i> =0,7251 <b><i>p</i>=0,0049</b>	<i>p</i> =0,6263 <b><i>p</i>=0,0005</b>	<i>p</i> =0,9418 <i>p</i> =0,4422
Kontrolle / Cilengitide	<i>p</i> =0,9138 <i>p</i> =0,5783	<i>p</i> =1 <i>p</i> =0,5734	<i>p</i> =0,8924 <i>p</i> =0,2475	<i>p</i> =0,5844 <i>p</i> =0,9248
Kontrolle / Tamsirolimus	<i>p</i> =0,6073 <b><i>p</i>=0,0054</b>	<i>p</i> =0,4989 <b><i>p</i>=0,0049</b>	<i>p</i> =0,5518 <b><i>p</i>=0,0038</b>	<i>p</i> =0,3891 <b><i>p</i>=0,0002</b>
Cisplatin / Docetaxel	<i>p</i> =0,2914 <b><i>p</i>=0,0007</b>	<i>p</i> =0,2235 <b><i>p</i>=0,0003</b>	<i>p</i> =0,4989 <i>p</i> =0,1046	<i>p</i> =0,9418 <i>p</i> =0,2736
Cisplatin / Cilengitide	<i>p</i> =0,1941 <b><i>p</i>=0,0002</b>	<i>p</i> =0,2134 <b><i>p</i>=3,10*10<sup>-5</sup></b>	<i>p</i> =0,2134 <b><i>p</i>=0,0035</b>	<i>p</i> =0,3782 <i>p</i> =0,0888
Cisplatin / Tamsirolimus	<i>p</i> =0,5518 <i>p</i> =0,0787	<i>p</i> =0,4328 <b><i>p</i>=0,0074</b>	<i>p</i> =0,5518 <b><i>p</i>=0,0215</b>	<i>p</i> =0,5891 <i>p</i> =0,3578
Docetaxel / Cilengitide	<i>p</i> =0,9569 <i>p</i> =0,4989	<i>p</i> =0,7868 <i>p</i> =0,3169	<i>p</i> =0,6073 <i>p</i> =0,1595	<i>p</i> =0,3949 <i>p</i> =0,3307
Docetaxel / Tamsirolimus	<i>p</i> =0,7049 <i>p</i> =0,0742	<i>p</i> =0,6652 <i>p</i> =0,3169	<i>p</i> =0,8287 <i>p</i> =0,4488	<i>p</i> =0,4221 <b><i>p</i>=0,0396</b>
Cilengitide / Tamsirolimus	<i>p</i> =0,4989 <b><i>p</i>=0,0284</b>	<i>p</i> =0,4328 <b><i>p</i>=0,0483</b>	<i>p</i> =0,6263 <i>p</i> =0,4017	<i>p</i> =0,1715 <b><i>p</i>=0,0082</b>

Die Abbildungen 17 bis 20 zeigen folglich die Effekte von Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Tamsirolimus auf die Zytokinproduktion in HNSCC *ex vivo*, normiert auf die individuelle Kontrolle in Prozent.

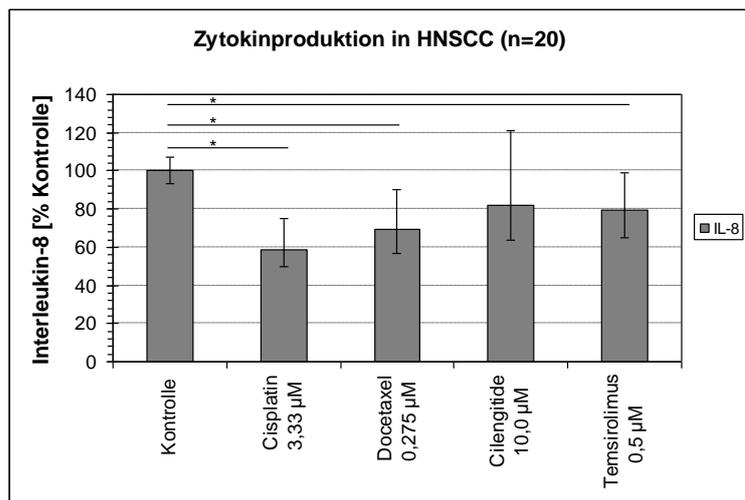
**Abb. 17:** Gezeigt sind die Effekte von Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Tamsirolimus auf die MCP-1-Produktion in HNSCC *ex vivo*, normiert auf die individuelle Kontrolle in Prozent. Durch Cisplatin (*p*=8,69\*10<sup>-6</sup>) und Tamsirolimus (*p*=0,0054) wurde die MCP-1-Konzentration im Kulturüberstand signifikant reduziert.



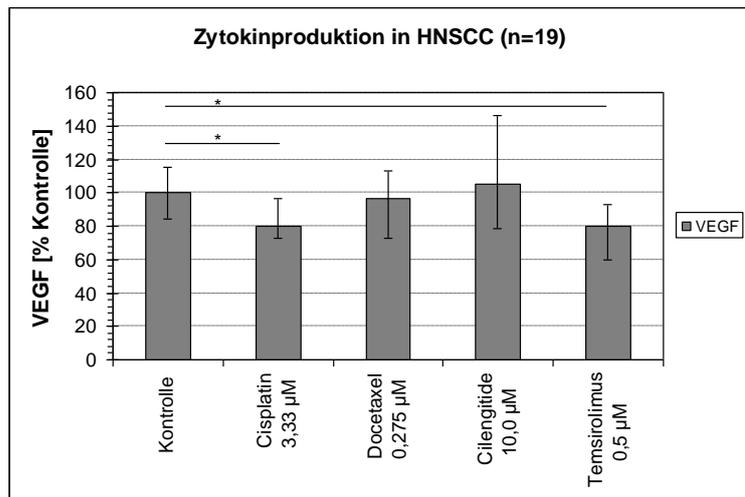
**Abb. 18:** Gezeigt sind die Effekte von Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Tensirolimus auf die IL-6-Produktion in HNSCC *ex vivo*, normiert auf die individuelle Kontrolle in Prozent. Durch Cisplatin ( $p=4,04 \cdot 10^{-7}$ ), Docetaxel ( $p=0,0049$ ) und Tensirolimus ( $p=0,0049$ ) wurde die IL-6-Konzentration im Kulturüberstand signifikant reduziert.



**Abb. 19:** Gezeigt sind die Effekte von Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Tensirolimus auf die IL-8-Produktion in HNSCC *ex vivo*, normiert auf die individuelle Kontrolle in Prozent. Durch Cisplatin ( $p=3,72 \cdot 10^{-6}$ ), Docetaxel ( $p=0,0005$ ) und Tensirolimus ( $p=0,0038$ ) wurde die IL-8-Konzentration im Kulturüberstand signifikant reduziert.



**Abb. 20:** Gezeigt sind die Effekte von Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Tensirolimus auf die VEGF-Produktion in HNSCC *ex vivo*, normiert auf die individuelle Kontrolle in Prozent. Durch Cisplatin ( $p=0,0020$ ) und Tensirolimus ( $p=0,0002$ ) wurde die VEGF-Konzentration im Kulturüberstand signifikant reduziert.



## Ergebnisse

In einem größeren Datensatz von 57 Tumoren konnten die statistischen Verhältnisse, die sich in 20 Tumoren zeigten, reproduziert werden. Cisplatin war auch hier der stärkste Inhibitor der Zytokinproduktion und war Docetaxel signifikant überlegen. Docetaxel senkte im Gegensatz zu den 20 Testungen alle untersuchten Zytokine im Kulturüberstand. Die Tabellen 16 und 17 zeigen die dazugehörige deskriptive und vergleichende Statistik.

**Tab. 16:** Deskriptive Statistik für 57 Testungen mit Cisplatin (Cis) und Docetaxel (DTX) in pg/ml und bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle (K) in Prozent.

Zytokin	n=57	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	25. Perzentile	75. Perzentile
		[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]
MCP-1	K	1746,52 100,00	8247,17 23,11	190,09 100,00	66,98 89,62	666,17 110,38
	Cis	709,69 58,78	2819,61 30,80	88,24 51,83	32,74 33,73	423,92 78,50
	DTX	1207,59 87,10	5283,20 45,66	205,48 84,05	62,10 61,19	370,79 100,06
IL-6	K	6767,28 100,00	12787,28 21,19	2490,18 100,00	749,35 90,74	7151,07 109,26
	Cis	4894,66 62,42	10695,26 31,36	1563,98 59,28	383,76 41,44	4562,80 77,35
	DTX	5878,39 88,16	11924,75 34,79	2077,05 84,67	869,83 68,11	6663,87 97,34
IL-8	K	31640,32 100,00	39418,67 18,77	15662,81 100,00	6163,36 91,68	45169,14 108,32
	Cis	20818,50 66,08	30358,22 23,04	7868,15 60,97	3495,48 49,57	26761,29 84,56
	DTX	23007,19 77,13	31646,84 29,44	10292,90 70,82	5331,61 56,64	28772,78 93,18
VEGF	K	166,42 99,87	289,53 22,46	58,76 100,00	31,52 87,48	153,02 112,52
	Cis	116,75 77,08	199,40 34,62	53,47 73,96	29,64 54,45	127,76 82,53
	DTX	153,60 89,48	278,50 34,67	67,27 86,91	28,11 69,03	107,68 100,29

**Tab. 17:** Gezeigt sind die *p*-Werte des *U*-Tests für 57 Testungen mit Cisplatin und Docetaxel in pg/ml und bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent.

Vergleich	MCP-1	IL-6	IL-8	VEGF
	[pg/ml] [% Kontrolle]	[pg/ml] [% Kontrolle]	[pg/ml] [% Kontrolle]	[pg/ml] [% Kontrolle]
Kontrolle / Cisplatin	<b><i>p</i>=0,0232</b> <b><i>p</i>=2,44*10<sup>-15</sup></b>	<i>p</i> =0,05295 <b><i>p</i>=0,0000</b>	<i>p</i> =0,0509 <b><i>p</i>=1,78*10<sup>-15</sup></b>	<i>p</i> =0,1984 <b><i>p</i>=1,25*10<sup>-12</sup></b>
Kontrolle / Docetaxel	<i>p</i> =0,4226 <b><i>p</i>=5,49*10<sup>-6</sup></b>	<i>p</i> =0,4596 <b><i>p</i>=1,80*10<sup>-7</sup></b>	<i>p</i> =0,1839 <b><i>p</i>=3,77*10<sup>-10</sup></b>	<i>p</i> =0,4459 <b><i>p</i>=1,34*10<sup>-5</sup></b>
Cisplatin / Docetaxel	<i>p</i> =0,1445 <b><i>p</i>=1,72*10<sup>-5</sup></b>	<i>p</i> =0,1802 <b><i>p</i>=1,21*10<sup>-6</sup></b>	<i>p</i> =0,4983 <b><i>p</i>=0,0333</b>	<i>p</i> =0,5034 <b><i>p</i>=0,0130</b>

### 3.2.3 Untersuchung des Einflusses der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 auf die Zytokinexpression in HNSCC *ex vivo*

Im Folgenden wird darauf verzichtet, die MCP-1-Konzentrationen in Kulturüberständen nach Stimulation durch MCP-1 zu zeigen. Die Messwerte, die sich aus der Quantifizierung mittels ELISA ergaben, lagen in einem extrapolierten, nicht kalibrierten Bereich, sodass keine Evidenz für die Wahrhaftigkeit dieser Werte bestand. Das Zeigen solcher extrapolierten Werte widerspricht daher den Grundsätzen guten Experimentierens (*good laboratory practice*, GLP).

#### 3.2.3.1 Deskriptive Statistik

In die statistische Auswertung gingen 5 der 8 durchgeführten Experimente ein. Zwei Testungen wurden wegen infizierter Zellkulturen ausgeschlossen, eine Testung ging aufgrund einer abweichenden Tumorentität nicht in die Auswertung ein. Die Tabelle 18 zeigt die deskriptive Statistik zu den beschriebenen Experimenten.

**Tab. 18:** Deskriptive Statistik für 5 Testungen zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 in pg/ml und bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle (K) in Prozent. Auf das Zeigen der MCP-1-stimulierten MCP-1-Expression im Kulturüberstand wurde aus oben beschriebenen Gründen verzichtet.

Zytokin	n=5	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	25. Perzentile	75. Perzentile
		[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]
MCP-1	K	555,08 100,00	548,06 27,85	322,98 100,00	169,87 81,13	664,94 118,87
	+ Anti-MCP-1	83,88 20,09	80,51 9,88	48,48 19,06	29,72 11,29	105,55 25,56
IL-6	K	3164,07 100,00	1968,81 14,50	2768,44 100,00	2260,16 90,81	3777,67 109,19
	+ Anti-MCP-1	3083,12 82,33	2692,85 31,76	2300,64 77,26	1734,17 54,25	3010,77 98,40
	+ MCP-1	2280,64 69,88	1087,40 20,11	2380,90 66,52	1997,93 55,13	2721,08 84,41
IL-8	K	45125,58 100,00	13128,78 7,05	49871,26 100,00	44357,41 92,51	51436,81 107,49
	+ Anti-MCP-1	37250,45 78,40	13318,67 16,25	40058,90 77,22	35144,18 70,44	45292,20 91,96
	+ MCP-1	39163,52 81,07	14532,94 22,49	43985,03 84,81	42670,79 79,16	45228,56 90,98
VEGF	K	105,55 100,00	72,43 14,36	111,99 100,00	35,24 93,13	154,90 106,87
	+ Anti-MCP-1	83,49 85,76	69,68 17,57	70,26 82,54	27,71 71,92	105,34 99,70
	+ MCP-1	70,24 70,60	59,05 25,28	51,86 67,97	16,90 56,00	117,23 90,61

Die MCP-1-Expression wurde durch den Anti-MCP-1-Antikörper auf 20,09% gesenkt. Für die anderen Zytokine zeigte sich sowohl durch den Anti-MCP-1-Antikörper, als auch durch hinzugefügtes MCP-1 eine Suppression der Zytokinproduktion im Kulturüberstand. Die IL-6-Konzentration wurde durch den Anti-MCP-1-Antikörper auf 82,33% gesenkt, noch stärker wurde sie jedoch durch hinzugefügtes MCP-1 auf 69,88% reduziert. Auch VEGF wurde durch hinzugefügtes MCP-1 stärker verringert (70,60%) als durch den Anti-MCP-1-Antikörper (85,76%). Bei IL-8 war die Reduktion durch den Anti-MCP-1-Antikörper (78,40%) geringfügig stärker als durch hinzugefügtes MCP-1 (81,07%).

### 3.2.3.2 Vergleichende Statistik

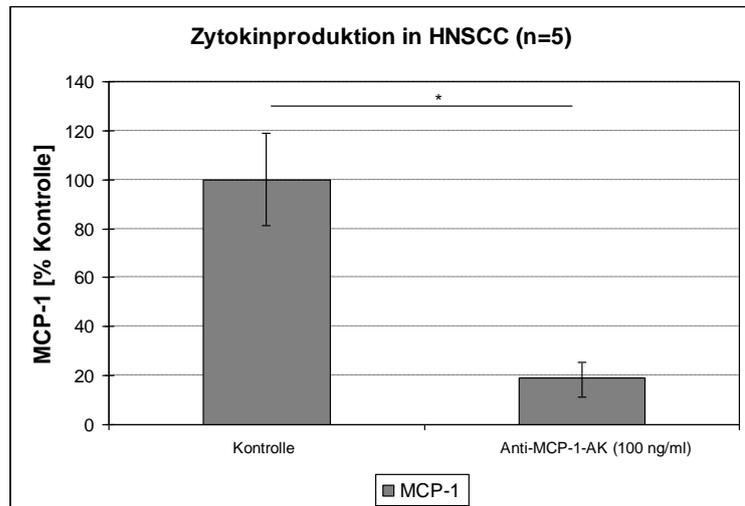
Unter Verwendung des *U*-Tests wurden die Effekte der MCP-1-Inhibition durch einen Anti-MCP-1-Antikörper und der Stimulation durch hinzugefügtes MCP-1 auf die Zytokinproduktion der untersuchten Plattenepithelkarzinome *ex vivo* verglichen. Wie nicht anders erwartet, wurde die MCP-1-Expression durch den Antikörper signifikant gesenkt ( $p=0,0071$ ). Sowohl durch MCP-1 als auch durch den Anti-MCP-1-Antikörper wurden verminderte IL-6-, IL-8- und VEGF-Konzentrationen beobachtet. Diese Effekte unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Eine signifikante Senkung der IL-8-Produktion wurde, bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle, unter dem Einfluss des Anti-MCP-1-Antikörpers beobachtet ( $p=0,0053$ ). Für IL-6 und VEGF war ein Trend niedrigerer Konzentrationen in Kulturüberständen nach Zugabe von MCP-1 als unter der Zugabe des Anti-MCP-1-Antikörpers zu beobachten. Diese Unterschiede zeigten jedoch keine statistische Signifikanz. Die *p*-Werte des durchgeführten *U*-Tests sind der Tabelle 19 zu entnehmen.

**Tab. 19:** Gezeigt sind die *p*-Werte des *U*-Tests für 5 Testungen zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 in pg/ml und bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent. „k. A.“ steht für „keine Angabe“. Auf das Zeigen der MCP-1-stimulierten MCP-1-Expression im Kulturüberstand wurde aus oben beschriebenen Gründen verzichtet.

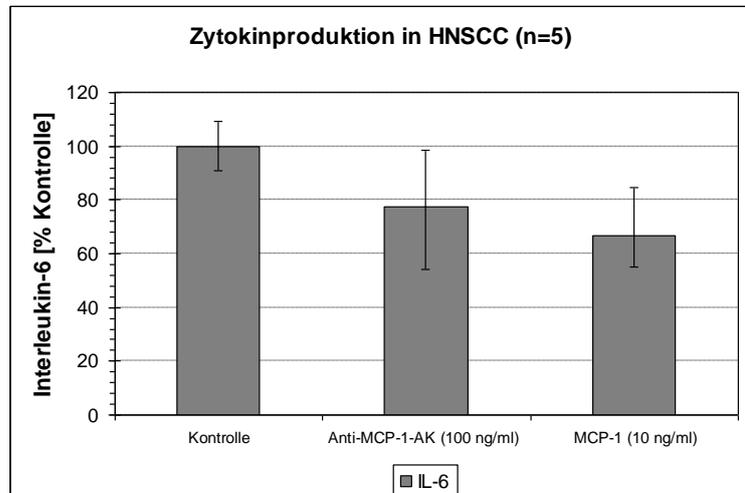
Vergleich	MCP-1	IL-6	IL-8	VEGF
	[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]	[pg/ml] [%Kontrolle]
Kontrolle / Anti-MCP-1	<b><math>p=0,0283</math></b> <b><math>p=0,0071</math></b>	$p=0,5775$ $p=0,5775$	$p=0,1745$ <b><math>p=0,0053</math></b>	$p=0,6015$ $p=0,0947$
Kontrolle / MCP-1	k. A.	$p=0,4647$ $p=0,0947$	$p=0,17452$ $p=0,0947$	$p=0,4647$ $p=0,0947$
MCP-1 / Anti-MCP-1	k. A.	$p=0,7540$ $p=0,3472$	$p=0,9168$ $p=0,7540$	$p=0,9168$ $p=0,6015$

Die Abbildungen 21 bis 24 zeigen die Zytokinproduktion in HNSCC *ex vivo* in Abhängigkeit der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent.

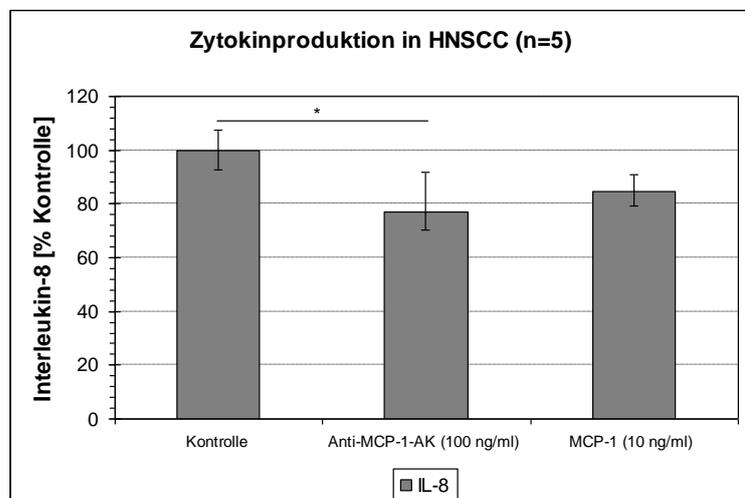
**Abb. 21:** Gezeigt ist die MCP-1-Produktion in HNSCC *ex vivo* in Abhängigkeit der MCP-1-Inhibition bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent. Die MCP-1-Expression wird durch den Anti-MCP-1-Antikörper signifikant gesenkt ( $p=0,0071$ ).



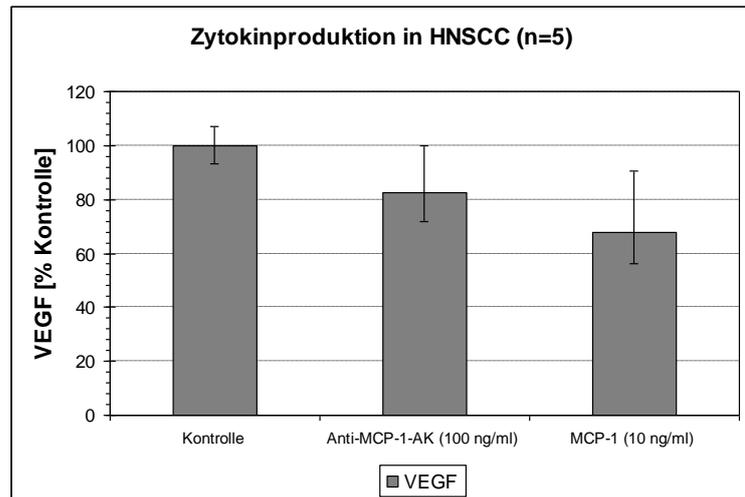
**Abb. 22:** Gezeigt ist die IL-6-Produktion in HNSCC *ex vivo* in Abhängigkeit der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent. Es gibt einen Trend zu niedrigeren IL-6-Konzentrationen unter MCP-1-Einfluss als unter dem Einfluss des Anti-MCP-1-Antikörpers. Es zeigt sich jedoch keine statistische Signifikanz.



**Abb. 23:** Gezeigt ist die IL-8-Produktion in HNSCC *ex vivo* in Abhängigkeit der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent. Die IL-8-Expression wird durch den Anti-MCP-1-Antikörper signifikant gesenkt ( $p=0,0053$ ).



**Abb. 24:** Gezeigt ist die VEGF-Produktion in HNSCC *ex vivo* in Abhängigkeit der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent. Es gibt einen Trend zu niedrigeren VEGF-Konzentrationen unter MCP-1-Einfluss als unter dem Einfluss des Anti-MCP-1-Antikörpers. Es zeigt sich jedoch keine statistische Signifikanz.



Die Vorversuche zur Reaktivität der untersuchten Plattenepithelkarzinome gegenüber der MCP-1-Inhibition und Stimulation durch MCP-1 zeigten, dass die Zytokinexpression durch die Stimulation durch MCP-1 und dessen Blockade moduliert wurde.

### 3.3 *Ex-vivo-Chemoresponse-Testung in Zellkulturplatten mit 48 Kavitäten (48-Well-Ansatz)*

Nachdem in den Vorversuchen eine Modulation der Zytokinexpression durch die Stimulation durch MCP-1 bzw. dessen Blockade nachgewiesen wurde, sollte in den Kombinationsexperimenten unter Verwendung von 3,33  $\mu\text{M}$  Cisplatin, 275 nM Docetaxel, 10  $\mu\text{M}$  Cilengitide und 500 nM Temsirolimus im 48-Well-Ansatz geklärt werden, welchen Effekt die Stimulation durch MCP-1 bzw. dessen Blockade auf die Koloniebildung und die Zytokinexpression der getesteten Tumoren unter Zytostatikaeinfluss *ex vivo* hat. Im Folgenden wird aus oben genannten Gründen darauf verzichtet, die MCP-1-Konzentrationen in Kulturüberständen nach Stimulation durch MCP-1 zu zeigen. Entsprechend des Protokolls des FLAVINO-Assays wurden zur Qualitätskontrolle der Chemoreaktivitätstestung der HNSCC parallel KB-Zellen getestet. Die Ergebnisse der Testung belegten mit den geringen Standardfehlern der Mittelwerte (SEM) die Konsistenz der Datenerhebung. Da die Chemoreaktivität der KB-Zellen von der eigenen Forschungsgruppe bereits ausführlich betrachtet wurde, wird hier auf das Zeigen der Resultate aus den KB-Zell-Kontrolltests verzichtet.

#### 3.3.1 Deskriptive Statistik

Von 32 durchgeführten Testungen zur Chemoreaktivität im 48-Well-Ansatz wurden 16 Testungen positiv bewertet (>4 Tumorzellkolonien je Kontrollkavität), 16 Testungen wurden als negativ bezüglich einer statistisch verlässlichen Bewertung von Effekten auf die Koloniebildung eingestuft (bei <4 Tumorzellkolonien je Kontrollkavität). Zwei der 16 positiven Testungen flossen nicht in die statistische Auswertung ein, da sich eine Tumorprobe koinzident mit einem simultanen Non-Hodgkin-Lymphom zeigte und eine

andere Tumorseite in der Zellkultur durch *Candida spec.* infiziert war. Daher kamen nur 14 der 16 Testungen zur statistischen Auswertung. Im Folgenden wird die Chemoreaktivität der untersuchten Plattenepithelkarzinome auf Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus allein und in Kombination mit dem Anti-MCP-1-Antikörper bzw. MCP-1 dargestellt. Zur Beurteilung der Chemoreaktivität wurden die Koloniebildung im FLAVINO-Assay und die MCP-1-, IL-6- und IL-8-Konzentrationen der Kulturüberstände, gemessen mittels ELISA, herangezogen. Die Tabelle 20 fasst in einer Übersicht die Mittelwerte, Standardfehler der Mittelwerte (SEM), Mediane und die 25. und 75. Perzentile für die Koloniebildung im FLAVINO-Assay zusammen.

**Tab. 20:** Deskriptive Statistik für 14 Testungen zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 in Zytostatika-freiem Tumormedium (TM) und unter dem Einfluss der Zytostatika Cisplatin (Cis), Docetaxel (DTX), Cilengitide (Cil) und Temsirolimus (Tem) bezogen auf die individuelle, nicht mit MCP-1 oder dem Anti-MCP-1-Antikörper behandelte Kontrolle (K) in Prozent. Dargestellt sind die Ergebnisse der Koloniebildung im FLAVINO-Assay.

Koloniebildung		Mittelwert	SEM	Median	25. Perzentile	75. Perzentile
		[%Kontrolle]	[%Kontrolle]	[%Kontrolle]	[%Kontrolle]	[%Kontrolle]
TM	K	100,00	13,57	96,76	74,01	114,70
	+ Anti-MCP-1	98,10	26,40	77,84	38,38	119,19
	+ MCP-1	70,16	15,58	63,78	34,88	86,66
Cis	K	9,14	3,54	3,14	0,00	14,84
	+ Anti-MCP-1	6,40	2,80	0,00	0,00	7,20
	+ MCP-1	6,24	2,32	0,00	0,00	12,39
DTX	K	91,31	28,02	61,23	37,67	89,15
	+ Anti-MCP-1	83,88	40,37	52,44	27,78	69,01
	+ MCP-1	55,30	16,01	44,44	12,84	69,49
Cil	K	118,66	37,40	83,53	46,15	136,78
	+ Anti-MCP-1	102,59	33,13	65,31	45,27	102,54
	+ MCP-1	80,33	16,85	77,19	44,23	94,67
Tem	K	84,76	23,40	62,11	32,45	100,73
	+ Anti-MCP-1	60,84	14,05	55,68	20,77	78,23
	+ MCP-1	70,13	14,43	65,07	22,20	97,09

Bezogen auf die unbehandelte, nur mit Tumormedium versetzte Kontrolle, konnte Cisplatin die Koloniebildung im Mittel auf 9,14% senken. Unter Docetaxel erfolgte eine Reduktion der Koloniebildung auf 91,31%, während Cilengitide die Koloniebildung auf 118,66% steigerte. Temsirolimus erniedrigte die Koloniebildung auf 84,76% der unbehandelten Kontrolle. Die Koloniebildung im Zytostatika-freien Kulturmedium wurde durch die MCP-1-Stimulation stärker moduliert (70,16%) als durch die MCP-1-Blockade durch den Anti-MCP-1-Antikörper

(98,10%). Somit war MCP-1 nach Cisplatin der zweit stärkste Inhibitor der Koloniebildung *ex vivo*. Außerdem vermochte MCP-1 die Zellproliferation unter dem Einfluss von Cisplatin, Docetaxel und Cilengitide stärker zu supprimieren als der Anti-MCP-1-Antikörper und die Zytostatika allein. Lediglich unter Temsirolimus wurde die Koloniebildung durch den Anti-MCP-1-Antikörper (60,84%) stärker reduziert als durch MCP-1 (70,13%).

In Tabelle 21 sind Mittelwerte, die Standardfehler der Mittelwerte (SEM), Mediane und die 25. und 75. Perzentile für die MCP-1-Konzentrationen der Kulturüberstände dargestellt.

**Tab. 21:** Deskriptive Statistik für 14 Testungen zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 in Zytostatika-freiem Tumormedium (TM) und unter dem Einfluss der Zytostatika Cisplatin (Cis), Docetaxel (DTX), Cilengitide (Cil) und Temsirolimus (Tem) bezogen auf die individuelle, nicht mit MCP-1 oder dem Anti-MCP-1-Antikörper behandelte Kontrolle (K) in Prozent. Dargestellt sind die Ergebnisse der MCP-1-Expression im Kulturüberstand. Auf das Zeigen der MCP-1-stimulierten MCP-1-Expression im Kulturüberstand wurde aus oben beschriebenen Gründen verzichtet.

MCP-1-Expression		Mittelwert	SEM	Median	25. Perzentile	75. Perzentile
		[%Kontrolle]	[%Kontrolle]	[%Kontrolle]	[%Kontrolle]	[%Kontrolle]
TM	K	100,00	9,62	94,29	77,72	117,84
	+ Anti-MCP-1	46,57	13,60	25,68	12,15	67,66
Cis	K	46,82	7,92	48,39	21,59	63,86
	+ Anti-MCP-1	30,31	7,29	17,18	7,73	58,68
DTX	K	119,39	22,10	98,76	73,52	149,19
	+ Anti-MCP-1	36,92	8,53	20,74	12,78	62,97
Cil	K	160,66	37,98	123,79	96,76	164,77
	+ Anti-MCP-1	59,90	15,76	36,50	14,60	79,73
Tem	K	116,47	17,29	102,85	71,02	138,70
	+ Anti-MCP-1	54,99	15,64	31,86	11,63	71,07

Cisplatin war das einzige Zytostatikum, dass die MCP-1-Expression im Kulturüberstand reduzierte (46,82%). Unter Docetaxel (119,39%), Cilengitide (160,66%) und Temsirolimus (116,47%) fanden sich erhöhte MCP-1-Konzentrationen in Kulturüberständen. Die MCP-1-Produktion wurde durch den Anti-MCP-1-Antikörper sowohl im unbehandelten Tumormedium, als auch unter Zytostatikaeinfluss supprimiert. Am deutlichsten war diese Reduktion durch die Kombination von Cisplatin und dem Anti-MCP-1-Antikörper (30,31%) zu beobachten, gefolgt von Docetaxel und dem Anti-MCP-1-Antikörper (36,92%). Der Anti-MCP-1-Antikörper allein senkte die MCP-1-Konzentration im Kulturüberstand auf 46,57% der unbehandelten Kontrolle. Geringer fiel dagegen die Reduktion durch die Kombination von Temsirolimus und dem Anti-MCP-1-Antikörper (54,99%) und Cilengitide und dem Anti-MCP-1-Antikörper (59,90%) aus.

Die Tabelle 22 zeigt Mittelwerte, Standardfehler der Mittelwerte (SEM), Mediane und die 25. und 75. Perzentile für die IL-6-Konzentration im Kulturüberstand.

**Tab. 22:** Deskriptive Statistik für 14 Testungen zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 in Zytostatika-freiem Tumormedium (TM) und unter dem Einfluss der Zytostatika Cisplatin (Cis), Docetaxel (DTX), Cilengitide (Cil) und Temsirolimus (Tem) bezogen auf die individuelle, nicht mit MCP-1 oder dem Anti-MCP-1-Antikörper behandelte Kontrolle (K) in Prozent. Dargestellt sind die Ergebnisse der IL-6-Expression im Kulturüberstand.

IL-6-Expression		Mittelwert	SEM	Median	25. Perzentile	75. Perzentile
		[%Kontrolle]	[%Kontrolle]	[%Kontrolle]	[%Kontrolle]	[%Kontrolle]
TM	K	100,00	5,92	98,70	87,87	111,62
	+ Anti-MCP-1	86,03	10,13	85,49	65,68	97,65
	+ MCP-1	91,13	17,32	79,78	54,29	99,88
Cis	K	42,83	7,19	32,96	22,41	53,53
	+ Anti-MCP-1	40,89	7,86	31,92	18,90	51,12
	+ MCP-1	40,27	6,11	34,48	21,36	55,57
DTX	K	133,70	19,63	109,82	97,22	133,06
	+ Anti-MCP-1	132,12	29,60	107,37	85,48	122,83
	+ MCP-1	123,73	21,94	98,53	75,53	132,54
Cil	K	143,50	19,95	118,63	104,09	145,32
	+ Anti-MCP-1	134,05	23,01	108,06	89,93	127,38
	+ MCP-1	130,19	18,94	120,38	88,57	145,03
Tem	K	122,18	13,95	114,40	92,81	134,60
	+ Anti-MCP-1	121,99	20,66	105,56	85,73	134,17
	+ MCP-1	116,27	16,32	104,77	82,84	142,28

Cisplatin war das einzige Zytostatikum, das die IL-6-Produktion senken konnte (42,83%). Docetaxel (133,70%), Cilengitide (143,50%) und Temsirolimus (122,18%) erhöhten dagegen die IL-6-Konzentration im Kulturüberstand. In Kombination mit den Zytostatika vermochte MCP-1 die IL-6-Produktion zwar stärker zu senken als die Kombination von Zytostatikum und dem Anti-MCP-1-Antikörper, dies blieb jedoch ohne statistische Signifikanz. In der Zytostatika-freien Kontrolle reduzierte jedoch der Anti-MCP-1-Antikörper (86,03%) die IL-6-Konzentration mehr als es MCP-1 (91,13%) tat.

In Tabelle 23 sind Mittelwerte, Standardfehler (SEM), Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile für die IL-8-Expression im Kulturüberstand zusammengefasst.

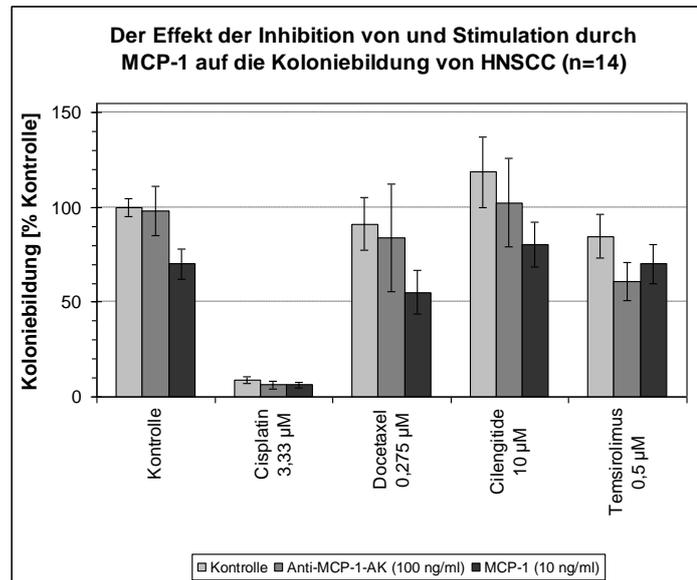
**Tab. 23:** Deskriptive Statistik für 14 Testungen zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 in Zytostatika-freiem Tumormedium (TM) und unter dem Einfluss der Zytostatika Cisplatin (Cis), Docetaxel (DTX), Cilengitide (Cil) und Temsirolimus (Tem) bezogen auf die individuelle, nicht mit MCP-1 oder dem Anti-MCP-1-Antikörper behandelte Kontrolle (K) in Prozent. Dargestellt sind die Ergebnisse der IL-8-Expression im Kulturüberstand.

IL-8-Expression		Mittelwert	SEM	Median	25. Perzentile	75. Perzentile
		[%Kontrolle]	[%Kontrolle]	[%Kontrolle]	[%Kontrolle]	[%Kontrolle]
TM	K	100,00	4,74	96,95	87,10	111,67
	+ Anti-MCP-1	84,58	8,12	83,71	67,16	100,43
	+ MCP-1	82,72	8,99	76,37	62,21	96,39
Cis	K	50,84	5,64	48,01	31,94	63,89
	+ Anti-MCP-1	46,83	6,01	39,92	32,44	57,31
	+ MCP-1	45,88	5,83	38,34	29,73	60,76
DTX	K	110,86	15,01	90,76	79,51	106,69
	+ Anti-MCP-1	100,39	13,63	91,35	77,86	104,19
	+ MCP-1	99,27	13,95	88,20	67,36	109,48
Cil	K	137,97	17,02	116,20	101,03	153,96
	+ Anti-MCP-1	138,18	22,19	100,95	89,42	142,15
	+ MCP-1	123,30	16,18	99,51	87,61	143,00
Tem	K	127,80	17,43	114,96	92,38	133,06
	+ Anti-MCP-1	112,43	15,77	96,83	73,68	113,98
	+ MCP-1	116,02	19,54	97,62	80,11	125,36

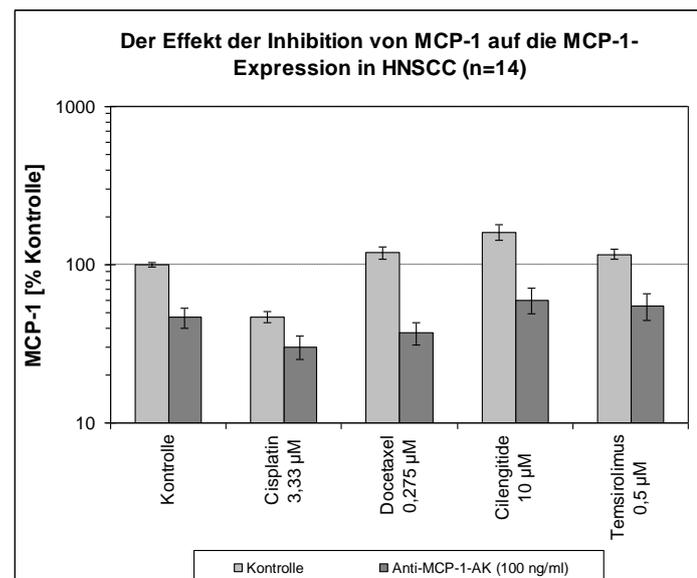
Für die IL-8-Produktion gilt wie für MCP-1 und IL-6 im Mittel eine Reduktion durch Cisplatin (50,84%) und eine Steigerung durch Docetaxel (110,86%), Cilengitide (137,97%) und Temsirolimus (127,80%). Sowohl für die Stimulation durch MCP-1 in der unbehandelten Kontrolle, als auch in Kombination mit Cisplatin, Docetaxel und Cilengitide wurde, bezogen auf die individuelle Kontrolle, eine niedrigere IL-8-Konzentration als unter Einfluss der Zytostatika alleine oder der Kombination der Zytostatika mit dem Anti-MCP-1-Antikörper gemessen. Unter Temsirolimus und dem Anti-MCP-1-Antikörper wurde weniger IL-8 gemessen als unter Temsirolimus und MCP-1. Insgesamt zeigte sich keine signifikante Überlegenheit von MCP-1 gegenüber dem Anti-MCP-1-Antikörper.

Die Abbildungen 25 bis 28 zeigen die Chemoreaktivität der untersuchten Plattenepithelkarzinome *ex vivo*, gemessen an der Koloniebildung im FLAVINO-Assay und der Zytokinexpression, quantifiziert mittels ELISA. Dargestellt sind die Effekte der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 auf die Koloniebildung und die Zytokinexpression unter dem Einfluss der Zytostatika. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf das Einzeichnen der Signifikanzniveaus verzichtet, diese sind jedoch in 3.3.2 aufgeführt. Es sind Mittelwerte und das 95%-Konfidenzintervall als Fehlerindikator dargestellt.

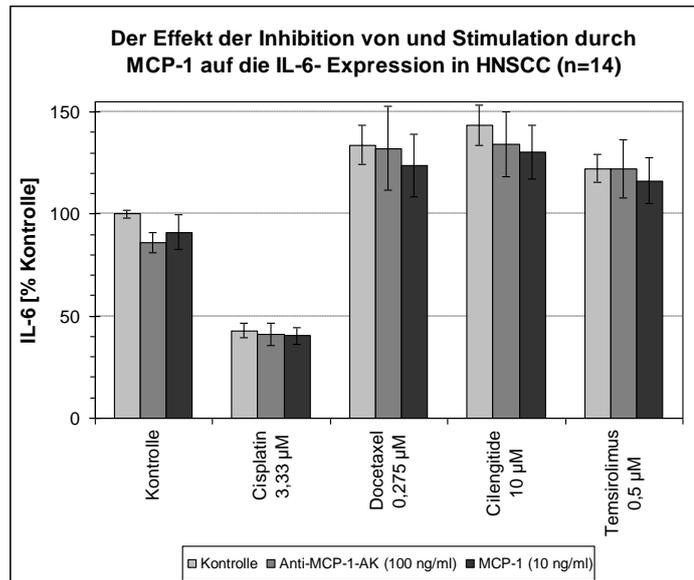
**Abb. 25:** Dargestellt ist der Effekt der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 auf die Koloniebildung. Cisplatin ( $p=5,0995 \cdot 10^{-36}$ ) und MCP-1 ( $p=0,0020$ ) senkten die Koloniebildung signifikant. Die Effekte von Docetaxel, Cilengitide und Temeirolimus blieben ohne statistische Signifikanz (Docetaxel:  $p=0,5699$ ; Cilengitide:  $p=0,3507$ ; Temeirolimus:  $p=0,2445$ ). Der Anti-MCP-1-Antikörper führte zu keiner signifikanten Modulation der Koloniebildung ( $p=0,8954$ ). Die Effekte der MCP-1-Stimulation und -Inhibition unterschieden sich in der unbehandelten Kontrolle nicht signifikant voneinander ( $p=0,0798$ ).



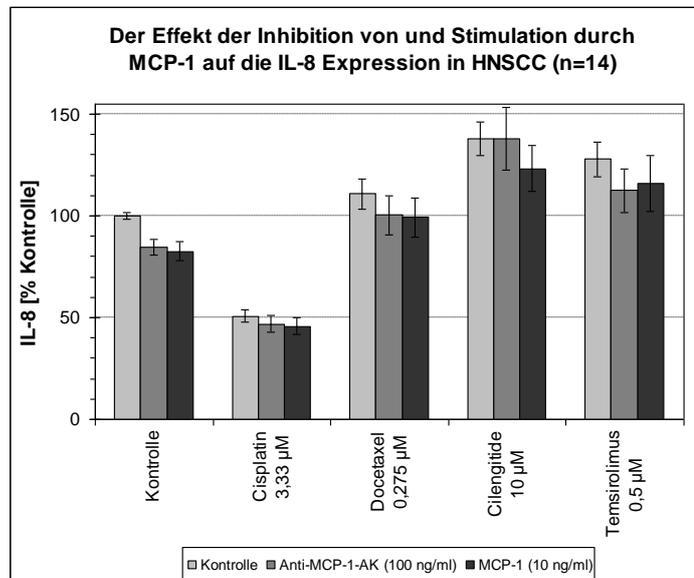
**Abb. 26:** Dargestellt ist der Effekt der Inhibition von MCP-1 auf die MCP-1-Expression. Cisplatin senkte die MCP-1-Expression ( $p=4,117 \cdot 10^{-18}$ ), Cilengitide ( $p=0,0028$ ) wirkte steigernd. Cisplatin war gegenüber Docetaxel ( $p=4,883 \cdot 10^{-8}$ ), Cilengitide ( $p=2,515 \cdot 10^{-7}$ ) und Temeirolimus ( $p=2,663 \cdot 10^{-10}$ ) signifikant überlegen. Temeirolimus war Cilengitide signifikant überlegen ( $p=0,0391$ ). Der Anti-MCP-1-Antikörper senkte die MCP-1-Expression signifikant ( $p=6,936 \cdot 10^{-10}$ ).



**Abb. 27:** Dargestellt ist der Effekt der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 auf die IL-6-Expression. Cisplatin senkte die IL-6-Expression ( $p=6,947 \cdot 10^{-24}$ ), während Docetaxel ( $p=0,0015$ ), Cilengitide ( $p=0,001$ ) und Temozolomid ( $p=0,0036$ ) steigernd wirkten. Cisplatin war gegenüber Docetaxel ( $p=1,425 \cdot 10^{-12}$ ), Cilengitide ( $p=5,328 \cdot 10^{-14}$ ) und Temozolomid ( $p=6,444 \cdot 10^{-16}$ ) signifikant überlegen. Der Anti-MCP-1-Antikörper ( $p=0,0137$ ) und MCP-1 ( $p=0,3274$ ) senkten die IL-6-Expression ebenfalls.



**Abb. 28:** Dargestellt ist der Effekt der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 auf die IL-8-Expression. Cisplatin senkte die IL-8-Expression ( $p=1,800 \cdot 10^{-26}$ ), während Docetaxel ( $p=0,1668$ ), Cilengitide ( $p=0,0001$ ) und Temozolomid ( $p=0,0029$ ) steigernd wirkten. Cisplatin war gegenüber Docetaxel ( $p=2,098 \cdot 10^{-10}$ ), Cilengitide ( $p=2,913 \cdot 10^{-14}$ ) und Temozolomid ( $p=6,672 \cdot 10^{-12}$ ) signifikant überlegen. Docetaxel war gegenüber Cilengitide signifikant überlegen ( $p=0,0196$ ). Sowohl der Anti-MCP-1-Antikörper ( $p=0,0008$ ) als auch MCP-1 ( $p=0,0006$ ) senkten die IL-8-Expression signifikant.



### 3.3.2 Vergleichende Statistik

Mithilfe des zweiseitigen  $t$ -Tests für ungleiche Varianzen wurden die Effekte der antineoplastischen Substanzen auf die untersuchten Tumoren verglichen. Die Koloniebildung wurde durch Cisplatin ( $p=5,0995 \cdot 10^{-36}$ ) und MCP-1 ( $p=0,0020$ ) signifikant supprimiert (Tab. 24). Docetaxel und Temozolomid senkten die Koloniebildung insignifikant, unter Cilengitide nahm die Koloniebildung ohne statistische Signifikanz zu (Docetaxel:  $p=0,5699$ ; Cilengitide:  $p=0,3507$ ; Temozolomid:  $p=0,2445$ ). Der Effekt von Cisplatin war dem von Docetaxel, Cilengitide und Temozolomid signifikant überlegen. Dieser Sachverhalt blieb auch bestehen, als die Zytostatika mit dem Anti-MCP-1-Antikörper oder mit MCP-1 kombiniert wurden. Cisplatin war in der Suppression der Koloniebildung sowohl dem Anti-MCP-1-Antikörper ( $p=2,524 \cdot 10^{-8}$ ), als auch MCP-1 ( $p=5,287 \cdot 10^{-10}$ ) überlegen, obwohl sowohl der Anti-MCP-1-

Antikörper als auch MCP-1 die Koloniebildung senkten. Die Effektstärken unterschieden sich jedoch nicht signifikant von einander ( $p=0,0798$ ). Im Zytostatika-freien Tumormedium und unter dem Einfluss von Cisplatin, Docetaxel und Cilengitide waren die Kolonie-supprimierenden Effekte des MCP-1 stärker als die des Anti-MCP-1-Antikörpers. Lediglich unter dem Einfluss von Temsirolimus wurde die Koloniebildung durch den Anti-MCP-1-Antikörper stärker reduziert als durch MCP-1. MCP-1 war neben Cisplatin diejenige Substanz, die die Koloniebildung signifikant zu reduzieren vermochte und war damit der Wirkung von Cilengitide signifikant überlegen ( $p=0,0227$ ). Für die Chemoreaktivität der untersuchten Plattenepithelkarzinome, gemessen an der Zytokinexpression im Kulturüberstand, lässt sich verallgemeinern, dass Cisplatin generell die Zytokinexpression signifikant senkte, während Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus die Zytokinexpression steigerten. Docetaxel steigerte nur die IL-6-Expression signifikant ( $p=0,0015$ ). Cilengitide steigerte die MCP-1-, IL-6- und IL-8-Expression (MCP-1:  $p=0,0028$ ; IL-6:  $p=0,0001$ ; IL-8:  $p=0,0001$ ) signifikant. Temsirolimus erhöhte die IL-6- und IL-8-Produktion signifikant (IL-6:  $p=0,0036$ ; IL-8:  $p=0,0029$ ). Generell war Cisplatin den anderen untersuchten Substanzen in der Modulation der Zytokinproduktion signifikant überlegen. Dieser Sachverhalt blieb für die IL-6- und IL-8-Produktion auch bestehen, als der Anti-MCP-1-Antikörper oder MCP-1 hinzugefügt wurden. Die MCP-1-senkenden Effekte von Cisplatin und dem Anti-MCP-1-Antikörper unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Dieser Sachverhalt verwundert nicht, da Cisplatin und der Antikörper ähnlich starke MCP-1-senkende Wirkungen aufwiesen. Signifikante Unterschiede in der Zytokinexpression bestanden zwischen Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus und dem Anti-MCP-1-Antikörper sowie MCP-1. Dies lässt sich durch eine Zytokin-steigernde Wirkung der Zytostatika Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus und der Zytokin-senkenden Wirkung von MCP-1 und dem Anti-MCP-1-Antikörper erklären. Durch die Kombination von Zytostatikum und dem Anti-MCP-1-Antikörper bzw. MCP-1 ließen sich die IL-6- und IL-8-Konzentrationen im Kulturüberstand weiter senken, wobei der Trend zu niedrigeren Zytokinkonzentrationen unter dem Einfluss von MCP-1 zwar zu beobachten war, sich diese Unterschiede jedoch als statistisch nicht signifikant erwiesen. Durch den Anti-MCP-1-Antikörper wurde die IL-8-Produktion unter dem Einfluss von Temsirolimus stärker reduziert als durch MCP-1. Ebenso wurde im unbehandelten Kulturüberstand die IL-6-Konzentration durch den Anti-MCP-1-Antikörper stärker supprimiert als durch MCP-1. Entgegen den Beobachtungen der Vorversuche im 6-Well-Ansatz ( $n=5$ ) zeigten sich im 48-Well-Ansatz ( $n=14$ ) signifikant geringere IL-6-Konzentrationen unter dem Anti-MCP-1-Antikörper und geringere IL-8-Konzentrationen unter MCP-1. Dies lässt sich zum einen mit der geringen Fallzahl der Vorversuche ( $n=5$ ) und mit der hohen biologischen intertumoralen Heterogenität der HNSCC erklären (Wichmann *et al.* 2011). Während in den Vorversuchen durch Docetaxel eine Reduktion von IL-6 und

IL-8 beobachtet wurde, zeigten sich in den Kombinationsexperimenten stimulierende Effekte bezüglich der Zytokinexpression. Dies kann mit dem individuellen Ansprechen der Proben auf Docetaxel und der genannten Heterogenität der untersuchten Tumoren begründet werden. Daher sollten die Effekte der Zytostatika auf individueller Ebene untersucht werden.

**Tab. 24:** Gezeigt sind die *p*-Werte aus dem zweiseitigen *t*-Test bei ungleicher Varianz für 14 Testungen aus den Kombinationsexperimenten zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 unter dem Einfluss von Cisplatin (Cis), Docetaxel (DTX), Cilengitide (Cil) und Temsirolimus (Tem).

Vergleich		Kolonie- bildung	MCP-1	IL-6	IL-8
Tumormedium	Anti-MCP-1	0,8954	<b>6,936*10<sup>-10</sup></b>	<b>0,0137</b>	<b>0,0008</b>
Tumormedium	MCP-1	<b>0,0020</b>	# k. A.	0,3274	<b>0,0006</b>
Tumormedium	Cis	<b>5,100*10<sup>-36</sup></b>	<b>4,117*10<sup>-18</sup></b>	<b>6,947*10<sup>-24</sup></b>	<b>1,800*10<sup>-26</sup></b>
Tumormedium	DTX	0,5699	0,1010	<b>0,0015</b>	0,1668
Tumormedium	Cil	0,3507	<b>0,0028</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>
Tumormedium	Tem	0,2445	0,0829	<b>0,0036</b>	<b>0,0029</b>
Cis	DTX	<b>5,723*10<sup>-7</sup></b>	<b>4,883*10<sup>-8</sup></b>	<b>1,425*10<sup>-12</sup></b>	<b>2,098*10<sup>-10</sup></b>
Cis	Cil	<b>5,705*10<sup>-7</sup></b>	<b>2,515*10<sup>-7</sup></b>	<b>5,328*10<sup>-14</sup></b>	<b>2,913*10<sup>-14</sup></b>
Cis	Tem	<b>6,995*10<sup>-8</sup></b>	<b>2,663*10<sup>-10</sup></b>	<b>6,444*10<sup>-16</sup></b>	<b>6,672*10<sup>-12</sup></b>
Cis	Anti-MCP-1	<b>2,524*10<sup>-8</sup></b>	0,9745	<b>5,205*10<sup>-10</sup></b>	<b>9,874*10<sup>-10</sup></b>
Cis	MCP-1	<b>5,287*10<sup>-10</sup></b>	k. A.	<b>2,511*10<sup>-6</sup></b>	<b>4,732*10<sup>-8</sup></b>
DTX	Cil	0,2576	0,0660	0,4893	<b>0,0196</b>
DTX	Tem	0,7275	0,8370	0,3451	0,1473
Tem	Cil	0,1384	<b>0,0391</b>	0,0856	0,4095
MCP-1	Anti-MCP-1	0,0798	k. A.	0,6158	0,7612
MCP-1	DTX	0,2029	k. A.	<b>0,0017</b>	<b>0,0020</b>
MCP-1	Cil	<b>0,0227</b>	k. A.	<b>0,0002</b>	<b>1,845*10<sup>-7</sup></b>
MCP-1	Tem	0,3152	k. A.	<b>0,0067</b>	<b>1,798*10<sup>-5</sup></b>
Anti-MCP-1	DTX	0,7324	<b>2,62*10<sup>-7</sup></b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0030</b>
Anti-MCP-1	Cil	0,3843	<b>3,976*10<sup>-7</sup></b>	<b>2,246*10<sup>-6</sup></b>	<b>2,886*10<sup>-7</sup></b>
Anti-MCP-1	Tem	0,4636	<b>7,2*10<sup>-9</sup></b>	<b>0,0001</b>	<b>2,786*10<sup>-5</sup></b>
Cis	Cis + Anti-MCP-1	0,3203	<b>0,0151</b>	0,7747	0,4419
DTX	DTX + Anti-MCP-1	0,8227	<b>7,348*10<sup>-9</sup></b>	0,9467	0,4019
Cil	Cil + Anti-MCP-1	0,6060	<b>2,071*10<sup>-5</sup></b>	0,6283	0,9908
Tem	Tem+ Anti-MCP-1	0,1352	<b>0,0001</b>	0,9912	0,2891
Cis	Cis + MCP-1	0,2477	k. A.	0,6553	0,3331
DTX	DTX + MCP-1	0,0563	k. A.	0,5953	0,3610
Cil	Cil + MCP-1	0,0975	k. A.	0,4356	0,3151
Tem	Tem + MCP-1	0,3642	k. A.	0,6686	0,4813
Cis + MCP-1	Cis + Anti-MCP-1	0,9542	k. A.	0,9311	0,8762
DTX + MCP-1	DTX + Anti-MCP-1	0,3762	k. A.	0,7532	0,9370
Cil + MCP-1	Cil + Anti-MCP-1	0,4193	k. A.	0,8578	0,4553
Tem + MCP-1	Tem + Anti-MCP-1	0,5324	k. A.	0,7642	0,8431
Cis + Anti-MCP-1	DTX + Anti-MCP-1	<b>0,0148</b>	0,4165	<b>0,0003</b>	<b>1,432*10<sup>-5</sup></b>
Cis + Anti-MCP-1	Cil + Anti-MCP-1	<b>0,0005</b>	<b>0,0231</b>	<b>7,027*10<sup>-6</sup></b>	<b>4,877*10<sup>-6</sup></b>
Cis + Anti-MCP-1	Tem + Anti-MCP-1	<b>1,694*10<sup>-5</sup></b>	0,0542	<b>1,237*10<sup>-5</sup></b>	<b>4,943*10<sup>-6</sup></b>
DTX + Anti-MCP-1	Cil + Anti-MCP-1	0,6275	0,0821	0,9433	<b>0,0499</b>
DTX + Anti-MCP-1	Tem + Anti-MCP-1	0,4678	0,1664	0,6986	0,4262
Tem + Anti-MCP-1	Cil + Anti-MCP-1	0,1228	0,7597	0,5905	0,1950
Cis + MCP-1	DTX + MCP-1	<b>0,0003</b>	k. A.	<b>1,643*10<sup>-5</sup></b>	<b>1,998*10<sup>-5</sup></b>
Cis + MCP-1	Cil + MCP-1	<b>2,519*10<sup>-6</sup></b>	k. A.	<b>4,558*10<sup>-7</sup></b>	<b>4,125*10<sup>-7</sup></b>
Cis + MCP-1	Tem + MCP-1	<b>2,266*10<sup>-6</sup></b>	k. A.	<b>6,925*10<sup>-7</sup></b>	<b>3,848*10<sup>-5</sup></b>
DTX + MCP-1	Cil + MCP-1	0,1484	k. A.	0,7583	0,1242
DTX + MCP-1	Tem + MCP-1	0,3531	k. A.	0,7066	0,3373
Tem + MCP-1	Cil + MCP-1	0,5338	k. A.	0,4431	0,6919

# k. A. steht für „keine Angabe“ und bezieht sich auf die nicht mögliche korrekte Quantifizierung von MCP-1 nach Stimulation der zu testenden HNSCC durch MCP-1.

### 3.3.3 Individuelle Betrachtung der Chemoreaktivität der untersuchten Plattenepithelkarzinome im 48-Well-Ansatz

Aus oben genannten Gründen ist folgend die Chemoreaktivität für die individuellen Tumorproben aufgezeigt. Da die Bewertung der Effekte der Zytostatika auf die individuelle, unbehandelte Kontrolle bezogen erfolgte, bot sich für die Berechnung statistischer Vergleiche der zweiseitige *t*-Test bei ungleicher Varianz an. Lediglich signifikante Modulationen der Koloniebildung und der Zytokinexpression finden im Folgenden Erwähnung: In allen 14 Tumorproben unterdrückte Cisplatin die Koloniebildung. Während die MCP-1-Produktion durch Cisplatin in 12 Proben reduziert wurde, wurde bei 11 Proben die IL-6-Produktion und bei 13 Proben die IL-8-Produktion erniedrigt. Docetaxel senkte in 6 Proben die Koloniebildung. Bezüglich der MCP-1-Produktion wurde durch Docetaxel bei einer Probe eine signifikante Reduktion beobachtet. Durch Docetaxel wurde dagegen die IL-6-Konzentration in 3 Proben signifikant erhöht. Docetaxel senkte die IL-8-Produktion in 2 Proben und steigerte sie in 3 Tumoren. Cilengitide supprimierte die Koloniebildung zweier Tumoren. Die MCP-1- und IL-6-Produktion wurde in je zwei Proben durch Cilengitide stimuliert. IL-8 erfuhr in 5 Tumoren eine signifikante Steigerung. Temsirolimus senkte die Koloniebildung einer Tumorprobe. Die MCP-1-Expression wurde durch Temsirolimus in einer Probe gesteigert und in zwei Tumoren gesenkt. Temsirolimus reduzierte die IL-6-Konzentration in zwei Tumoren und die IL-8-Konzentration in einer Probe, während für IL-6 bei 3 Tumoren und für IL-8 bei 4 Tumoren signifikante Steigerungen der Zytokinproduktion beobachtet wurden. Für die Koloniebildung wurde unter dem Einfluss des Anti-MCP-1-Antiköpers in einem Fall (Patient Nr. 48) eine signifikante Stimulation gefunden. Die Zytokinproduktion wurde dagegen durch den Anti-MCP-1-Antikörper nur reduziert (10 beobachtete Reduktionen von MCP-1 und je 3 Reduktionen von IL-6 und IL-8). Durch MCP-1 konnte dagegen in 5 Fällen eine Suppression der Koloniebildung erzielt werden. Im Vergleich dazu vermochte Cilengitide dies nur in 2 Fällen und Temsirolimus nur in einem Fall, während unter Cisplatin in allen untersuchten Tumoren eine Suppression der Koloniebildung zu verzeichnen war und unter Docetaxel in 6 Fällen eine Suppression beobachtet wurde. MCP-1 reduzierte zudem die IL-6-Konzentration in 3 Tumoren und die IL-8-Konzentration in 6 Proben. Entgegen der Vermutung, eine MCP-1-Hemmung supprimiere neben der MCP-1-Expression auch die Koloniebildung, ist es dagegen die MCP-1-Stimulation, die die Koloniebildung effektiv reduziert und damit sogar, wie oben gezeigt, der Wirkung von Cilengitide überlegen ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Chemoreaktivität der untersuchten Tumoren sehr heterogen ist. Um eine Vorhersage treffen zu können, welches Zytostatikum im individuellen Fall das wirksamste ist, ist daher eine prädiktive Testung der Chemoreaktivität erstrebenswert. Die Tabelle 25 fasst die beschriebenen Steigerungen und Reduktionen der Koloniebildung und der Zytokinexpressionen zusammen.

**Tab. 25:** Die Tabelle zeigt die Chemoreaktivität der 14 getesteten Plattenepithelkarzinome auf individueller Ebene. Dargestellt sind signifikante Steigerungen (↑) oder Senkungen (↓) der Koloniebildung und Zytokinexpression mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit <5 %, <1 % bzw. <0,1 % im zweiseitigen *t*-Test bei ungleicher Varianz. Nicht markierte Felder entsprechen nicht signifikanten Modifikationen der Chemoreaktivität. \* Auf die Darstellung der Interaktionsmechanismen zwischen Zytostatikum und MCP-1 bezogen auf die MCP-1-Expression wurde verzichtet.

Kategorie	Patient Nr.	1	17	22	23	28	33	39	42	43	48	49	50	57	62
	Substanz														
Koloniebildung	Anti-MCP-1										↑				
	MCP-1	↓			↓	↓			↓	↓					
	Cisplatin	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Docetaxel		↓			↓			↓		↓	↓	↓		
	Cilengitide					↓					↓				
	Temsirolimus										↓				
	MCP-1	Anti-MCP-1	↓		↓		↓	↓	↓	↓	↓	↓		↓	
MCP-1		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cisplatin		↓	↓			↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Docetaxel			↓												
Cilengitide		↑							↑						
Temsirolimus							↓		↑		↓				
IL-6		Anti-MCP-1	↓						↓	↓					
	MCP-1	↓						↓	↓						
	Cisplatin		↓		↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Docetaxel	↑						↑							↑
	Cilengitide			↑				↑							
	Temsirolimus			↑			↓	↑		↑	↓				
	IL-8	Anti-MCP-1	↓						↓	↓					
MCP-1		↓				↓		↓	↓				↓	↓	
Cisplatin		↓	↓	↓	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Docetaxel		↑			↓		↓	↑		↓					
Cilengitide		↑		↑		↑		↑							↑
Temsirolimus				↑			↓	↑	↑	↑					

Bei genauer Betrachtung dieser Tabelle fallen Muster auf: Die Probe Nr. 17, ein Larynxkarzinom, zeigt unter Cisplatin und Docetaxel eine reduzierte Koloniebildung und MCP-1-Produktion und unter Cisplatin eine reduzierte IL-6- und IL-8-Produktion. In Probe 39, einem Nasopharynxkarzinom, verhalten sich IL-6 und IL-8 identisch: Der Anti-MCP-1-Antikörper und MCP-1 senken IL-6 und IL-8. Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus dagegen steigern die Konzentrationen beider Zytokine. Bezüglich der Suppression der Koloniebildung ist bemerkenswert, dass in 3 Tumoren (Nr. 1, 23 und 43) neben Cisplatin nur noch MCP-1 die Koloniebildung zu reduzieren vermag, wohingegen Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus nicht wirksam sind. MCP-1 hat in diesen Proben demnach einen Effekt, der stärker ist als der der letztgenannten Zytostatika. Eine Untersuchung von Korrelationen der Effekte auf die individuellen Tumoren erscheint daher erforderlich.

### 3.3.4 Bestimmung korrelierender Effekte in den Kombinationsexperimenten zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1

Das in Tabelle 25 gezeigte Muster der individuellen Chemoreaktivität der untersuchten Tumoren bildete die Grundlage für die Bestimmung von Korrelationen. Dabei wurden die signifikant stimulierenden Einzeleffekte mit „-1“ beschrieben und die signifikant supprimierenden Effekte mit „1“ gekennzeichnet. Nicht signifikante Effekte erhielten die Bezeichnung „0“. Danach erfolgte die weitere Verschlüsselung für die Kombination der Einzeleffekte der beiden Kategorien (z.B. Koloniebildung und MCP-1-Expression) wie folgt: „0“ (beide Kategorien ohne Effekt), „1“ (beide Kategorien supprimiert), „-1“ (beide Kategorien erhöht), „-1;0“ (Kategorie I erhöht, Kategorie II ohne Effekt), „-1;1“ (Kategorie I erhöht, Kategorie II supprimiert), „0;-1“ (Kategorie I ohne Effekt, Kategorie II erhöht), „0;1“ (Kategorie I ohne Effekt, Kategorie II supprimiert), „1;-1“ (Kategorie I supprimiert, Kategorie II erhöht), „1;0“ (Kategorie I supprimiert, Kategorie II ohne Effekt). Die beschriebenen Kategorien wurden über den Chi-Quadrat-Test bei 4 Freiheitsgraden miteinander verglichen, zusätzlich wurden Korrelationskoeffizienten berechnet. Dabei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen IL-6 und IL-8 unter dem Einfluss des Anti-MCP-1-Antikörpers ( $\chi^2=14,00$ ;  $p<0,01$ ;  $r=0,71$ ) und unter Temsirolimus ( $\chi^2=13,05$ ;  $p<0,05$ ;  $r=0,68$ ). Ein weiterer Zusammenhang bestand zwischen der Koloniebildung und der IL-8-Expression unter dem Einfluss von Docetaxel ( $\chi^2=11,33$ ;  $p<0,05$ ;  $r=0,636$ ) und der MCP-1- und IL-6-Expression unter Temsirolimus ( $\chi^2=14,00$ ;  $p<0,01$ ;  $r=0,71$ ).

Für die Gesamtheit der untersuchten Plattenepithelkarzinome wurden Korrelationen unter Berechnung des Korrelationskoeffizienten  $r$  nach Spearman mithilfe von WinSTAT bestimmt. In diese Berechnungen flossen alle Messergebnisse ein, unabhängig davon, ob sie sich signifikant von der unbehandelten Kontrolle unterschieden, wie es für die individuelle Betrachtung geschah. Unter dem Einfluss des Anti-MCP-1-Antikörpers wurden positive Korrelationen zwischen der Koloniebildung und der IL-6- bzw. IL-8-Produktion (IL-6:  $r=0,38$  bei  $p=0,0025$ ; IL-8:  $r=0,38$  bei  $p=0,0023$ ) beobachtet. Es bestand ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der Koloniebildung und der IL-6-Expression ( $r=0,36$  bei  $p=0,0035$ ) sowie der Koloniebildung und der IL-8-Expression ( $r=0,50$  bei  $p=6,407 \cdot 10^{-5}$ ) unter dem Einfluss von MCP-1. Eine oben beschriebene Korrelation zwischen der Koloniebildung und der IL-8-Produktion unter Docetaxel konnte hierbei jedoch nicht bestätigt werden ( $r=0,20$  bei  $p=0,0738$ ). Unter Docetaxel stiegen die Konzentrationen von MCP-1 und IL-6 bei steigender Koloniebildung (MCP-1:  $r=0,30$  bei  $p=0,0147$ ; IL-6:  $r=0,24$  bei  $p=0,0418$ ). Dieser Trend ließ sich auch für IL-6 und IL-8 bei zunehmender Koloniebildung unter Temsirolimus beobachten (IL-6:  $r=0,36$  bei  $p=0,0039$ ; IL-8:  $r=0,43$  bei  $p=0,0005$ ). Daraus lässt sich die Aussage ableiten, dass mit zunehmender Zellproliferation auch die Zytokinproduktion steigt. Für die MCP-1-Produktion unter Cisplatin und dem Anti-MCP-1-Antikörper bestand eine positive Korrelation ( $r=0,50$  bei  $p=4,014 \cdot 10^{-5}$ ). Dies erklärt sich aus den MCP-1-senkenden Effekten

des Antikörpers und des Cisplatins. Indes fanden sich inverse Korrelationen zwischen der MCP-1-Produktion unter dem Einfluss des Anti-MCP-1-Antikörpers und der MCP-1-Produktion unter Docetaxel ( $r=-0,23$  bei  $p=0,0415$ ) und Cilengitide ( $r=-0,37$  bei  $p=0,0024$ ), was sich aus der MCP-1-senkenden Wirkung des Antikörpers und der MCP-1-steigernden Wirkung der genannten Zytostatika erklären lässt. Für die MCP-1-Expression unter Cisplatin zeigten sich gleichsinnige Effekte zur MCP-1-Expression unter Docetaxel ( $r=0,30$  bei  $p=0,0132$ ) und inverse Effekte unter Cilengitide ( $r=-0,42$  bei  $p=0,0007$ ). Unter Cilengitide und Docetaxel fanden sich gleichsinnig steigende Verläufe der MCP-1-Konzentrationen ( $r=0,55$  bei  $p=6,850 \cdot 10^{-6}$ ). Sinkende IL-6-Konzentrationen wurden unter dem Einfluss des Anti-MCP-1-Antikörpers und MCP-1 beobachtet ( $r=0,54$  bei  $p=8,426 \cdot 10^{-6}$ ), dagegen steigende Konzentrationen unter Docetaxel ( $r=-0,35$  bei  $p=0,0037$ ), Cilengitide ( $r=-0,40$  bei  $p=0,001$ ) und Temeirolimus ( $r=-0,4960$  bei  $p=5,060 \cdot 10^{-5}$ ) im Vergleich zum Antikörper. Unter MCP-1 korrelierte die IL-6-Expression mit der Koloniebildung ( $r=0,36$  bei  $p=0,0035$ ) und der IL-8-Expression ( $r=0,79$  bei  $p=2,272 \cdot 10^{-13}$ ). Es gab positive Korrelationen von IL-6 unter Cisplatin zu IL-6 unter Docetaxel ( $r=0,57$  bei  $p=1,895 \cdot 10^{-6}$ ), Cilengitide ( $r=0,28$  bei  $p=0,0197$ ) und Temeirolimus ( $r=0,37$  bei  $p=0,0024$ ). Positiv korrelierende Beziehungen bestanden auch zwischen der IL-6-Produktion unter Docetaxel und Temeirolimus ( $r=0,34$  bei  $p=0,0049$ ) sowie unter Cilengitide und Temeirolimus ( $r=0,59$  bei  $p=7,476 \cdot 10^{-7}$ ). Es fand sich eine positive Korrelation zwischen der IL-8-Expression unter dem Einfluss des Anti-MCP-1-Antikörpers und MCP-1 ( $r=0,75$  bei  $p=1,175 \cdot 10^{-11}$ ), dagegen eine negative Korrelation zwischen der IL-8-Expression unter dem Antikörper und Docetaxel ( $r=-0,25$  bei  $p=0,0291$ ), Cilengitide ( $r=-0,46$  bei  $p=0,0002$ ) und Temeirolimus ( $r=-0,44$  bei  $p=0,0003$ ). Auch zwischen der IL-8-Expression unter MCP-1 und Cilengitide ( $r=-0,29$  bei  $p=0,0163$ ) bzw. MCP-1 und Temeirolimus ( $r=-0,28$  bei  $p=0,0172$ ) bestand eine inverse Beziehung. Positive Korrelationen wurden für die IL-8-Expression unter Cisplatin und Docetaxel ( $r=0,64$  bei  $p=5,854 \cdot 10^{-8}$ ), Cisplatin und Cilengitide ( $r=0,33$  bei  $p=0,0064$ ), Cisplatin und Temeirolimus ( $r=0,25$  bei  $p=0,0331$ ), Docetaxel und Cilengitide ( $r=0,40$  bei  $p=0,0012$ ), Docetaxel und Temeirolimus ( $r=0,30$  bei  $p=0,0124$ ) und Cilengitide und Temeirolimus ( $r=0,75$  bei  $p=9,792 \cdot 10^{-12}$ ) gefunden. Letzteres lässt sich durch die IL-8-steigernden Effekte von Cilengitide und Temeirolimus erklären. Aus den beschriebenen Verhältnissen lässt sich ableiten, dass sich der Anti-MCP-1-Antikörper bzw. MCP-1 und Cisplatin bezüglich der Zytokinproduktion gleichsinnig senkend verhalten, dagegen der Anti-MCP-1-Antikörper bzw. MCP-1 und Docetaxel, Cilengitide und Temeirolimus einander entgegen wirken, da der Antikörper und MCP-1 die Zytokinexpression senken, während die genannten Zytostatika zu einer Erhöhung führen. In der Gesamtheit der untersuchten Proben wurden, wie in der individuellen Betrachtung auch, positive Korrelationen zwischen IL-6 und IL-8 beobachtet: Die Modulation durch den Anti-MCP-1-Antikörper ( $r=0,80$  bei  $p=5,643 \cdot 10^{-14}$ ), MCP-1 ( $r=0,79$  bei  $p=2,272 \cdot 10^{-13}$ ), Cisplatin

( $r=0,73$  bei  $p=7,117 \cdot 10^{-11}$ ), Docetaxel ( $r=0,72$  bei  $p=1,714 \cdot 10^{-10}$ ), Cilengitide ( $r=0,73$  bei  $p=9,216 \cdot 10^{-11}$ ) und Temsirolimus ( $r=0,82$  bei  $p=2,756 \cdot 10^{-15}$ ) erfolgte stets gleichsinnig.

Zusammenfassend kann folgende Aussage getroffen werden: Unter dem Anti-MCP-1-Antikörper bestanden positive Korrelationen zwischen der Koloniebildung und IL-6 bzw. IL-8 und den Zytokinen untereinander. Positive Korrelationen wurden für die Koloniebildung und IL-6 bzw. IL-8 und für IL-6 und IL-8 unter MCP-1 beobachtet. Unter Cisplatin wurden gleichsinnige Verläufe von IL-6 und IL-8 verzeichnet. Unter Docetaxel korrelierte die Koloniebildung mit der MCP-1- und IL-6-Expression positiv, während die Zytokine auch untereinander positiv korrelierten. Unter Cilengitide bestanden korrelierende Beziehungen zwischen den Zytokinen untereinander. Unter Temsirolimus wurden positive Korrelationen zwischen der Koloniebildung und der IL-6- bzw. IL-8-Expression sowie den Zytokinen untereinander beobachtet. Die engsten Korrelationen bestanden zwischen IL-6 und IL-8.

### **3.3.5 Betrachtung der Interaktionsmechanismen in den Kombinationsexperimenten zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1**

In den Kombinationsexperimenten zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 wurden die Interaktionsmechanismen der Additivität, des Synergismus und des Antagonismus beobachtet. Für die Bestimmung dieser Interaktionsmechanismen wurde die unter 2.3.12 beschriebene Methode nach Jin genutzt. Zeigten sich gegensätzliche Wirkungen der Zytostatika und MCP-1 bzw. des Anti-MCP-1-Antikörpers im Sinne eines stimulierenden Effekts der einen und des hemmenden Effekts der anderen Substanz, war dies als Antagonismus zu beschreiben. Bezogen auf alle 14 getesteten Tumoren wurden unter der Kombination von Cisplatin und dem Anti-MCP-1-Antikörper und der Kombination von Cisplatin und MCP-1 additive Effekte für die Reduktion der Koloniebildung und der IL-6- und IL-8-Expression bestimmt. Durch die Zugabe des Anti-MCP-1-Antikörpers konnte ein additiver Effekt zur MCP-1-senkenden Wirkung von Cisplatin erzielt werden. Die Zugabe des Anti-MCP-1-Antikörpers und auch die Zugabe von MCP-1 zu Docetaxel bewirkten synergistische Effekte bezüglich der Koloniesuppression. Für die Zytokinexpression wurden bei diesen Kombinationen antagonistische Effekte beobachtet. Docetaxel steigerte die Expression von MCP-1, IL-6- und IL-8, während durch den Anti-MCP-1-Antikörper MCP-1, IL-6 und IL-8 gesenkt wurden und durch MCP-1 IL-6 und IL-8 reduziert wurden. Cilengitide zeigte einen stimulierenden Effekt auf die Koloniebildung und die Zytokinexpression. In Kombination mit dem Anti-MCP-1-Antikörper (aber auch mit MCP-1) wurde diesen stimulierenden Effekten antagonistisch entgegengewirkt; es resultierte eine Hemmung. Temsirolimus wies ähnlich Cilengitide eine steigernde Wirkung bezüglich der Zytokinexpression auf. Nach Zugabe des Anti-MCP-1-Antikörpers oder MCP-1 wurde dieser stimulierende Effekt unterdrückt (Antagonismus). Durch Temsirolimus wurde die Koloniebildung reduziert. In Kombination mit dem Anti-MCP-1-Antikörper wurde diese

Wirkung synergistisch verstärkt ( $q > 1,15$ ). MCP-1 verminderte jedoch antagonistisch den hemmenden Effekt von Temozolomid auf die Koloniebildung. Aus oben genannten Gründen wird auf das Zeigen der Bestimmung der Interaktionsmechanismen zwischen Zytostatika und MCP-1 bezogen auf die MCP-1-Expression verzichtet. Die Tabelle 26 fasst die beschriebenen Interaktionsmechanismen zusammen.

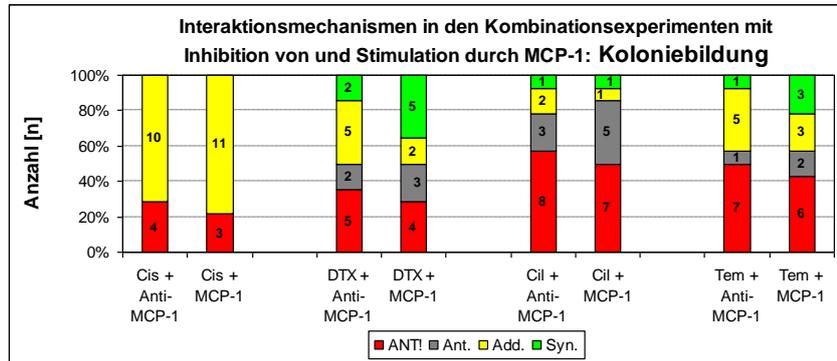
**Tab. 26:** Gezeigt sind die Interaktionsmechanismen der Kombination der Zytostatika und der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 gemittelt für 14 getestete Tumoren. Dabei steht „ANT!“ für einen echten Antagonismus im Sinne einer entgegengesetzten Wirkung. „Ant.“ bedeutet ein nach der Jin-Formel errechneter Antagonismus ( $q < 0,85$ ), während „Add.“ für Additivität ( $0,85 \leq q \leq 1,15$ ) und „Syn.“ für Synergismus ( $q > 1,15$ ) stehen. „k. A.“ bedeutet „keine Angabe“.

Koloniebildung	Zytostatikum	+ Anti-MCP-1	+ MCP-1	MCP-1	Zytostatikum	+ Anti-MCP-1	+ MCP-1
	Cisplatin	Add.	Add.		Cisplatin	Add.	k. A.
Docetaxel	Syn.	Syn.	Docetaxel	ANT!	k. A.		
Cilengitide	ANT!	ANT!	Cilengitide	ANT!	k. A.		
Temozolomid	Syn.	Ant.	Temozolomid	ANT!	k. A.		
IL-6	Zytostatikum	+ Anti-MCP-1	+ MCP-1	IL-8	Zytostatikum	+ Anti-MCP-1	+ MCP-1
	Cisplatin	Add.	Add.		Cisplatin	Add.	Add.
	Docetaxel	ANT!	ANT!		Docetaxel	ANT!	ANT!
	Cilengitide	ANT!	ANT!		Cilengitide	ANT!	ANT!
	Temozolomid	ANT!	ANT!		Temozolomid	ANT!	ANT!

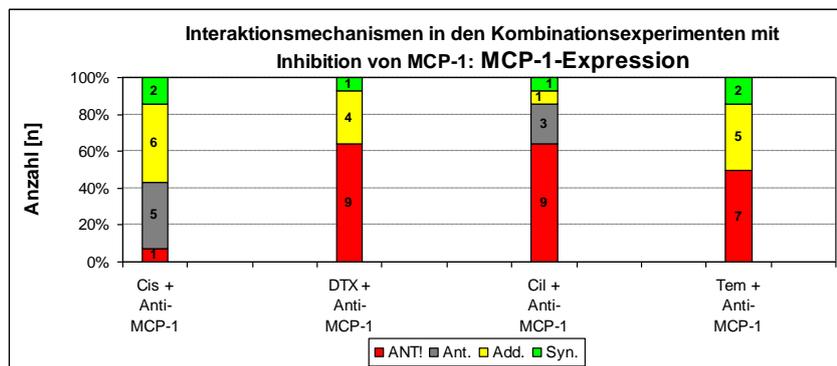
Unter 3.3.3 wurde bereits auf die biologische Heterogenität der getesteten Plattenepithelkarzinome verwiesen. Auf individueller Ebene zeigen sich Abweichungen der für die Gesamtheit der Proben bestimmten Interaktionsmechanismen. Für die Gesamtheit der untersuchten Tumoren wurden additive Effekte für die Kombination von Cisplatin und dem Anti-MCP-1-Antikörper bzw. MCP-1 bezüglich der Koloniebildung gefunden. Auf individueller Ebene gab es auch Tumoren, die antagonistische Effekte unter diesen Kombinationen zeigten. Für Docetaxel wurden in der Gesamtheit der untersuchten Proben synergistische Effekte für die Suppression der Koloniebildung beobachtet. Die individuelle Betrachtung lieferte jedoch auch additive und antagonistische Effekte. Während unter der Kombination von Cilengitide und dem Anti-MCP-1-Antikörper bzw. MCP-1 für die Koloniebildung ein Antagonismus bestimmt wurde, wurden auf individueller Ebene auch Additivität und Synergismus ermittelt. Die Kombination von Temozolomid und Anti-MCP-1-Antikörper wirkten insgesamt synergistisch, während sich Temozolomid und MCP-1 antagonistisch verhielten. Die individuelle Betrachtung zeigte für beide Kombinationen sowohl synergistische, additive als auch antagonistische Effekte auf die Koloniebildung. Individuell gestaltete sich die Kombination von Cisplatin und dem Anti-MCP-1-Antikörper bzw. MCP-1 bezüglich der Modulation der Zytokinexpression sowohl synergistisch, additiv als auch antagonistisch, wobei die additiven Effekte überwogen. Für die Zytokinexpression

wurde insgesamt für die Kombination von Docetaxel/ Cilengitide/ Temsirolimus und Anti-MCP-1-Antikörper bzw. MCP-1 Antagonismus beschrieben. Obwohl auf individueller Ebene zum Teil auch synergistische und additive Effekte ermittelt wurden, überwogen die antagonistischen Effekte. Die Abbildungen 29 bis 32 zeigen die beschriebenen Sachverhalte.

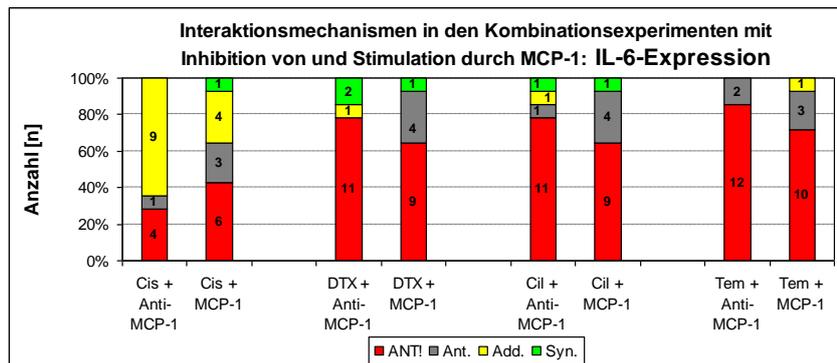
**Abb. 29:** Gezeigt sind die für die Koloniebildung bestimmten Interaktionsmechanismen. Es überwiegen die additiven Effekte von Cisplatin und dem Anti-MCP-1-Antikörper bzw. MCP-1.



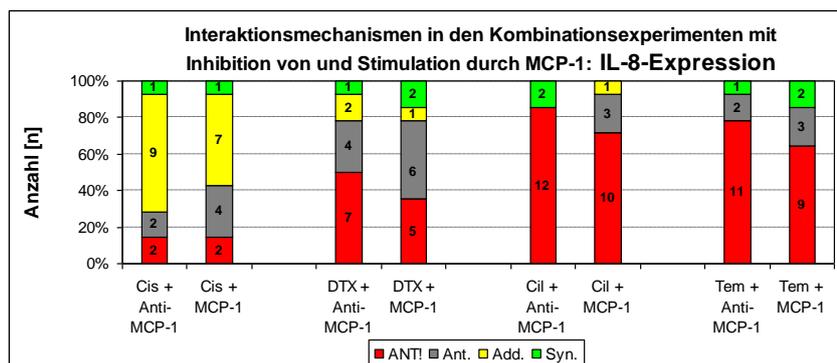
**Abb. 30:** Gezeigt sind die für die MCP-1-Expression bestimmten Interaktionsmechanismen. Bei Cisplatin und dem Anti-MCP-1-Antikörper überwiegen additive Effekte. Bei Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus liegt Antagonismus vor.



**Abb. 31:** Gezeigt sind die für die IL-6-Expression bestimmten Interaktionsmechanismen. Obwohl in der individuellen Betrachtung häufiger antagonistische Effekte zwischen Cisplatin und MCP-1 beobachtet wurden, liegt für die gemittelte Gesamtheit Additivität vor.



**Abb. 32:** Gezeigt sind die für die IL-8-Expression bestimmten Interaktionsmechanismen. Die additiven Effekte von Cisplatin und dem Anti-MCP-1-Antikörper bzw. MCP-1 überwiegen. Bei Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus liegt vermehrt Antagonismus vor.



## 4. Diskussion

Die potentielle Eignung von MCP-1 als Biomarker von HNSCC wurde mit den Ergebnissen des vorherigen Kapitels dieser Arbeit dargelegt. Die Bedeutung von MCP-1 für HNSCC und der durch MCP-1 vermittelten Effekte sowie des Zusammenwirkens mit verschiedenen Chemotherapeutika *ex vivo* wird nach den Ergebnissen der Messungen von MCP-1 und der anderen Zytokine in Patientenseren dargestellt.

### 4.1 Zytokinexpression in Patientenseren

In der vorliegenden Arbeit wurden im Mittel 822,1 pg/ml (min: 166,2 pg/ml; max: 2910,20 pg/ml) MCP-1 quantifiziert. Bei Patienten mit Nasopharynxkarzinomen wurden von Lu *et al.* 340 ng/l (25–2038 ng/l) beobachtet (Lu *et al.* 2011). Die von den Funden von Lu *et al.* abweichend geringfügig höheren Beobachtungen sind mit einer Patientenselektion bei Lu *et al.* zu erklären. Dort wurden ausschließlich Patienten mit Nasopharynxkarzinomen in die Studie eingeschlossen, während in der vorliegenden Arbeit Patienten mit Tumoren des Nasopharynx inklusive der Nasennebenhöhlen lediglich 8,1% des Patientenkollektivs ausmachten.

Die Präsenz von IL-6, IL-8 und VEGF in Seren von HNSCC-Patienten wurde auch von Chen *et al.* untersucht. Dabei zeigte sich für IL-6 eine Spannweite von 0,5 bis 129,6 pg/ml. In der vorliegenden Arbeit lagen heterogenere Ergebnisse (min: 1,4 pg/ml; max: 954,8 pg/ml) vor. Die IL-8-Expression wurde bei Chen *et al.* in einem Bereich von 0 bis 194,5 pg/ml angegeben, in der vorliegenden Quantifizierung lag diese zwischen 7,6 und 463,7 pg/ml. Für VEGF gaben Chen *et al.* einen Bereich zwischen 146,8 und 1084,4 pg/ml an, der mit 4,1 bis 23534,1 pg/ml in der vorliegenden Arbeit heterogener ausfiel (Chen *et al.* 1999). Die beschriebene Heterogenität der Ergebnisse lässt sich mit einer geringen Fallzahl von 11 Patientenseren bei Chen *et al.* und einer höheren Fallzahl in der vorliegenden Arbeit erklären. Andererseits wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit fast durchgängig höhere Konzentrationen der Zytokine in den Patientenseren detektiert. Da die Stabilität der Zytokine relativ gering ist, ist folglich eine ordnungsgemäße Präanalytik für die valide Erfassung der Zytokinkonzentrationen und die Vermeidung von Abbauprozessen, z.B. durch Proteolyse, essentiell. Daher wurde zur Optimierung der Präanalytik in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Leipzig ein durch die SOP vorgegebener Ablauf von der Blutentnahme bis zur Aufarbeitung der Proben (90 min) strikt einheitlich gestaltet. Dies kann die tendenziell höheren Zytokinkonzentrationen erklären. Dadurch ist eine gute Basis für die Untersuchung der Abhängigkeit der Zytokinkonzentrationen von Patientencharakteristika gegeben.

#### 4.1.1 Zytokinexpression in Patientenseren in Abhängigkeit der Patientencharakteristik

In den Experimenten zur Zytokinquantifizierung in Patientenseren wurden zunehmende MCP-1-, IL-8- und VEGF-Konzentrationen bei fortschreitender Tumorerkrankung gemäß UICC-Stadium beobachtet. Diese Beobachtungen gehen konform mit früheren Arbeiten zur Zytokinexpression in Patientenseren. So konnte bereits gezeigt werden, dass HNSCC-Patienten höhere Serumlevel für MCP-1, IL-6 und IL-8 aufweisen als Probanden der Kontrollgruppen, zu denen Gesunde und Patienten mit idiopathischer und allergischer Rhinitis angehörten. Zudem zeigten diese Zytokine den Trend höherer Expression im Serum bei fortschreitender Tumorerkrankung, sodass MCP-1, IL-6 und IL-8 bereits als mögliche Biomarker in HNSCC diskutiert wurden (Körner *et al.* 2011, Wichmann *et al.* 2011a). Auch Chen *et al.* beobachteten höhere Serumkonzentrationen von IL-6, IL-8 und VEGF bei HNSCC-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden bzw. Patienten mit Larynxpapillomen (Chen *et al.* 1999). Signifikante Unterschiede bezüglich der MCP-1-Serumkonzentration in Abhängigkeit der Patientencharakteristik (TNM und UICC-Stadium) wurden in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Auch Lu *et al.* fanden bezüglich der MCP-1-Expression in Seren von Patienten mit Nasopharynxkarzinomen keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit der Tumorausdehnung (T), der Lymphknotenmetastasierung (N) und des Tumorstadiums (UICC) (Lu *et al.* 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die IL-6-Konzentration im Serum in Abhängigkeit der Tumorausdehnung (T) steigt. Dies kann zum einen mit der steigenden Anzahl IL-6-produzierender Tumorzellen erklärt werden, zum anderen aber auch als systemische Reaktion des Organismus auf den Tumor im Sinne der Aktivierung des Immunsystems über die Auslösung einer Akuten-Phase-Reaktion durch IL-6. Inwiefern die IL-6-Serumkonzentration den Tumorprogress widerspiegelt oder nur als Zeichen der systemischen Inflammation anzusehen ist, ist dabei zu hinterfragen. Schließlich wird IL-6 im klinischen Alltag als Sepsismarker genutzt und empfiehlt sich daher eher als Verlaufsparemeter. Signifikante Unterschiede wurden zwischen der VEGF-Expression fernmetastasierter und nicht fernmetastasierter Tumoren detektiert. Patienten mit fernmetastasierten Tumoren zeigten im Serum signifikant höhere VEGF-Konzentrationen als Patienten mit nicht fernmetastasierten Tumoren. Dieser Befund unterstützt die Theorie, dass VEGF über seine Rolle in der Angiogenese auch an der Metastasierung beteiligt ist (Pries *et al.* 2006). Die beobachteten Unterschiede der IL-6- und IL-8-Konzentrationen in Seren von Patienten mit Oro- und Hypopharynxkarzinomen und Larynxkarzinomen stützt die Aussage, dass Tumoren der Kopf-Hals-Region eine große interindividuelle biologische Heterogenität aufweisen (Wichmann *et al.* Dietz 2011).

#### 4.1.2 Vergleich der Zytokinexpression in Patientenseren und Kulturüberständen

MCP-1 und VEGF wiesen in Seren höhere Konzentrationen auf als in Kulturüberständen. So entsprach die MCP-1-Expression in Seren mit 757,8 pg/ml im Median dem 3,7-fachen der MCP-1-Expression in Kulturüberständen mit 202,7 pg/ml. Für VEGF wurde in Seren mit 669,4 pg/ml das 8,6-fache der VEGF-Expression in Kulturüberständen mit 77,98 pg/ml gemessen. Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass MCP-1 und VEGF möglicherweise als dynamische Serummarker für Malignität und Tumorprogress geeignet sein könnten. Im Gegensatz dazu wurden höhere IL-6- und IL-8-Konzentrationen in Kulturüberständen als in Seren quantifiziert. IL-6 ist ein sehr sensibler Parameter, der Inflammation anzeigt. Der Referenzbereich für IL-6 im Serum wird mit 5,4 pg/ml angegeben. Mit 20,9 pg/ml im Median entsprachen die quantifizierten IL-6-Konzentrationen dem 3,9-fachen des Referenzbereichs. Dabei kann jedoch nicht differenziert werden, ob diese Erhöhung direkt durch die Antwort des Immunsystems auf die Tumorerkrankung verursacht wurde, oder aber zum Zeitpunkt der Blutentnahme z.B. eine Infektion des Patienten vorlag. Schließlich bieten HNSCC ab einer gewissen Größe aufgrund der bakteriellen Besiedelung der Nekrosen ein hohes inflammatorisches Potential. In Kulturüberständen wurde mit 3127,4 pg/ml im Median das 149,6-fache der IL-6-Serumkonzentration gemessen. Für die IL-8-Expression ergaben sich ähnliche Unterschiede zwischen Seren und Kulturüberständen. Der Referenzbereich von IL-8 im Serum liegt bei 70,0 pg/ml, sodass die gemessene IL-8-Konzentration mit 51,79 pg/ml im Median als nicht erhöht anzusehen ist (Laborpartnerschaft Scholz 2005). Mit 19,1 ng/ml im Median war die IL-8-Konzentration in den Kulturüberständen im Vergleich zu den Seren um das 369,5-fache erhöht. Die erhöhten IL-6- und IL-8-Konzentrationen der Kulturüberstände lassen sich durch einen proinflammatorischen Stress, der im Rahmen der experimentellen Aufarbeitung der Tumorproben entsteht, begründen. Durch die mechanische Zerkleinerung der Proben und die Desintegration des Gewebegefüges durch Kollagenase IV wird zwangsläufig Stress auf die Zellen ausgeübt, wodurch der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) freigesetzt wird. TNF- $\alpha$  besitzt eine zentrale Rolle in der Regulation von Entzündungs- und Immunreaktionen. Er induziert die Bildung von Zytokinen wie die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-6. Auch IL-8 ist ein inflammatorisches Zytokin, das über die Auslösung der Chemotaxis gegenüber Granulozyten wesentlich zu Entzündungsreaktionen beiträgt (Kirchner *et al.* 1994). Die IL-6- und IL-8-Produktion der untersuchten Tumoren wird zwangsläufig durch die methodische Aufarbeitung der Tumoren im FLAVINO-Assay überlagert. Um diese Überlagerung so gering wie möglich zu halten, wird im FLAVINO-Assay Kollagenase IV anstatt Trypsin zur Desintegration des Tumorgewebes verwendet, das weniger schädigend auf die Zellmembran wirkt als Trypsin. Weiterhin wird der FLAVINO-Assay unter

flavinschützenden Bedingungen durchgeführt (siehe 2.3.2), um die Photoaktivierung der Tumoren und somit zusätzlichen Stress zu vermeiden (Dietz *et al.* 2009).

#### **4.2 Ex-vivo-Chemoresponse-Testung in Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten (6-Well-Ansatz)**

Im Folgenden werden die *Chemoresponse*-Testungen im 6-Well-Ansatz als Vorversuche zu den Kombinationstestungen im 48-Well-Ansatz diskutiert. Dabei soll die Zytokinexpression in Abhängigkeit der Patienteneigenschaften und des Einflusses der getesteten Zytostatika bzw. der MCP-1-Stimulation bzw. –Blockade erörtert werden.

##### **4.2.1 Untersuchung der Zytokinexpression in Kulturüberständen in Abhängigkeit der Patientencharakteristik**

Wie bereits für die Zytokinexpression in Patientenseren berichtet, zeigten sich Unterschiede bezüglich der Zytokinkonzentration in Kulturüberständen in Abhängigkeit der Tumorlokalisation. So wiesen unbehandelte Hypopharynxkarzinome signifikant höhere MCP-1-, IL-6-, und VEGF-Konzentrationen als unbehandelte Oropharynxkarzinome auf. Cisplatin und Docetaxel vermochten auf die Tumoren unterschiedlich zu wirken. Docetaxel z.B. supprimierte die MCP-1-Produktion in Kulturen von Larynxkarzinomen stärker als in denen der Oropharynxkarzinome. Diese Funde unterstützen erneut die Hypothese des heterogenen biologischen Verhaltens der Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region. Cisplatin dagegen senkte die MCP-1-Konzentration in Kulturüberständen nicht fernmetastasierter Tumoren (M0) signifikant stärker als bei fernmetastasierten Tumoren (M1). Daraus lässt sich ableiten, dass M1-Tumoren ggf. bereits Resistenzen gegenüber Cisplatin entwickelt haben und dass fernmetastasierte Tumoren daher schlechter auf Cisplatin als Monotherapie ansprechen. Mechanismen, die zu einer Resistenz gegenüber Cisplatin führen, können folgende sein: Die reduzierte intrazelluläre Akkumulation von Cisplatin durch eine verminderte Aufnahme in die Zelle oder erhöhten Efflux aus der Zelle, vermehrte Inaktivierung des Cisplatin durch intrazelluläre Proteine wie Glutathion, erhöhte Reparatur von Cisplatinaddukten und die gesteigerte Fähigkeit zur Replikation ehemaliger Cisplatinaddukte sowie Defekte in Apoptose-Signalwegen (Kartalou *et al.* 2001). Daraus ergibt sich auch die schlechtere Prognose fernmetastasierter Tumoren, die aufgrund der Fernmetastasierung dem Stadium UICC IVC zugeordnet werden und somit in palliativer Intention therapiert werden (Dietz *et al.* 2010). Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren liegt die Rate lokaler Rezidive nach adjuvanter Monotherapie mit Cisplatin bei 30%. Bei einer Kombinationstherapie aus Cisplatin und 5-Fluoruracil ist die Rezidivrate wesentlich niedriger. Um das Fernmetastasierungsrisiko zu verringern, kann ggf. eine Induktionschemotherapie in Betracht gezogen werden (Seiwert *et al.* 2005). Auch MCP-1 wird eine entscheidende Funktion in der Metastasierung zugesprochen (Wolf *et al.* 2012), sodass es denkbar ist, dass

metastasierende Tumoren mehr MCP-1 produzieren, auch wenn sich in der vorliegenden Arbeit fernmetastasierte Tumoren (M1) nicht signifikant von nicht fernmetastasierten Tumoren (M0) bezüglich der MCP-1-Expression unterschieden. Jedoch war ein Trend ( $p=0,45$ ) zu höheren MCP-1-Konzentrationen in Kulturen von M1-Tumoren (257,1 pg/ml im Median) als in M0-Tumoren (177,6 pg/ml im Median) zu beobachten.

In den Kulturüberständen der Tumoren der Patienten mit positiver Raucheranamnese fanden sich signifikant niedrigere MCP-1-, IL-6- und IL-8-Konzentrationen als in Proben der Nichtraucher. Dies ist durch einen inhibierenden Effekt des Tabakrauches auf die Genexpression und die Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) und Chemokine (IL-8) zurückzuführen, der z.B. von Chen *et al.* bei Alveolarmakrophagen beschrieben wurde. Sie berichteten von einer Tabakrauch-induzierten Immunsuppression. Die Noxen des Tabakrauches führen somit zu einer lokalen Immunschwäche, die Infektionen begünstigt. Diese Aussagen wurden für Alveolarmakrophagen in Proben, die durch bronchioalveoläre Lavage gewonnen wurden, getroffen (Chen *et al.* 2007). Bei diesem alveolären Gewebe handelt es sich um Gewebe, das wie das Epithel des oberen Aeordigestivtraktes den Noxen des Tabakrauches ausgesetzt ist, weswegen an dieser Stelle auch der Querverweis auf diese Arbeit erfolgt, da Tabakrauch ein wesentlicher Risikofaktor in der Genese der HNSCC ist.

### **4.2.2 Untersuchung des Einflusses der getesteten Zytostatika auf die Zytokinexpression in HNSCC *ex vivo***

#### 4.2.2.1 Cisplatin

Cisplatin erwies sich als stärkster Inhibitor der MCP-1, IL-6- und IL-8-Expression und als zweitstärkster Inhibitor der VEGF-Expression *ex vivo*. Dies ist mit der starken zytotoxischen Wirkung des Cisplatins zu begründen.

#### 4.2.2.2 Docetaxel

Docetaxel führte zu keiner signifikanten Modulation der MCP-1- und VEGF-Konzentrationen in den untersuchten Kulturüberständen, während IL-6 und IL-8 signifikant supprimiert wurden. Die Beobachtung der kaum modulierten VEGF-Expression in der vorliegenden Arbeit widerspricht denen von Yoo *et al.* Diese berichteten von supprimierten VEGF-Konzentrationen in Kulturüberständen von HNSCC-Zelllinien und diskutierten daher anti-angiogene Eigenschaften des Docetaxels (Yoo *et al.* 2002). Die reduzierten IL-6- und IL-8-Konzentrationen der Kulturüberstände lassen sich mit der Wirkung von Docetaxel auf Ebene der DNS begründen, wodurch IL-6 und IL-8 nicht prozessiert werden können. Bis auf die veröffentlichten Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe fanden sich zum Zeitpunkt der Literaturrecherche keine Arbeiten über die MCP-1-, IL-6- und IL-8-Expression in Kulturüberständen von HNSCC unter dem Einfluss von Docetaxel (Körner *et al.* 2012).

#### 4.2.2.3 Cilengitide

Obwohl durch Cilengitide der Trend zur Steigerung der MCP-1-, IL-8- und VEGF-Expression beobachtet werden konnte, blieben diese Steigerungen ohne statistische Signifikanz. IL-6 wurde kaum moduliert. Die Stimulation der VEGF-Expression kann als reaktiver Effekt auf die Blockade der  $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrine durch Cilengitide verstanden werden. Tumorzellen verändern ihre Integrinexpression, um ihre Fähigkeit zur Migration, Invasion, Metastasierung und ihr Überleben in der Wirtsumgebung zu verbessern. Daran sind im Wesentlichen  $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrine beteiligt.  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine werden von angiogenen Endothelzellen exprimiert. Daraus erklären sich die Angiogenese-hemmenden Eigenschaften der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Inhibitoren. Integrininhibitoren wie Cilengitide hemmen somit die Tumorangio-genese und die Zelladhäsion der Tumorzellen und die sich daraus ergebenden Eigenschaften (Weis *et al.* 2011). Unterdosiert kann Cilengitide die Tumorangio-genese sogar stimulieren und *in vivo* zum Tumorwachstum beitragen, wie von Reynolds *et al.* am Mausmodell an Melanom- und Lungenkarzinomzelllinien demonstriert wurde. Reynolds *et al.* konnten nicht zeigen, dass Tumorzellen *in vitro* durch Cilengitide zur Proliferation stimuliert wurden. Cilengitide scheint demnach die Tumorzellen nicht direkt zur Proliferation zu stimulieren, sondern  $\alpha_v$ -Integrin exprimierende Zellen wie Endothelzellen stimulieren zu können. Niedrige Konzentrationen von 0,2 bis 20 nM verstärkten die VEGF-getriggerte Angiogenese. Unter den beschriebenen Cilengitide-Konzentrationen wurden eine erhöhte Blutgefäßdichte und eine vermehrte Expression des VEGF-Rezeptors 2 (VEGFR2=KDR) registriert. Letzteres sei durch eine verminderte Degradation des VEGFR2 begründet und somit einer verstärkten VEGF-Wirkung (Reynolds *et al.* 2009). Die VEGF-Expression wurde von Reynolds *et al.* jedoch nicht untersucht, sodass hierzu keine Aussage getroffen werden kann. Dennoch ist eine reaktive Stimulation von VEGF nach Einwirkung eines Angiogenese-Inhibitors wie Cilengitide denkbar.

#### 4.2.2.4 Temsirolimus

Temsirolimus supprimierte alle untersuchten Zytokine. Dies erklärt sich aus der hemmenden Wirkung auf der Ebene der Transkription und Translation und der Zytotoxizität von Temsirolimus. Im Vergleich zu den anderen getesteten Zytostatika war Temsirolimus der stärkste Inhibitor der VEGF-Expression in Kulturüberständen. Dieser Effekt geht konform mit Beobachtungen von Del Bufalo *et al.* Del Bufalo *et al.* konnten in Kulturüberständen von Brustkrebszelllinien eine dosisabhängige Reduktion der VEGF-Konzentration unter dem Einfluss von Temsirolimus *in vitro* nachweisen. Dieser Effekt lässt sich mit der Blockade des mTOR-Signalwegs durch Temsirolimus erklären. Durch mTOR wird u. a. HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$* ) reguliert. Dieser bewirkt als Transkriptionsfaktor die Hochregulation der Genexpression von VEGF, einem wichtigen proangiogenen Faktor der physiologischen

Angiogenese und der Tumorangiogenese. Temsirolimus hemmt somit über die mTOR-Blockade die HIF-1 $\alpha$ -abhängige VEGF-Produktion. Dadurch lässt sich die antiangiogene Wirkung von Temsirolimus (Del Bufalo *et al.* 2006) auch in HNSCC erklären.

#### **4.2.3 Untersuchung des Einflusses der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 auf die Zytokinexpression in HNSCC *ex vivo***

Nachdem in den Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass Zytostatika die Zytokinexpression von HNSCC *ex vivo* modulieren, sollte weiterhin geklärt werden, welchen Einfluss die MCP-1-Stimulation und –Blockade auf die Zytokinexpression in HNSCC *ex vivo* hat.

##### 4.2.3.1 Stimulation von HNSCC durch MCP-1

Durch Zugabe von MCP-1 wurden die IL-6- und VEGF-Konzentrationen im Kulturüberstand stärker gesenkt als nach Zugabe des Anti-MCP-1-Antikörpers. Diese Suppressionen blieben jedoch ohne statistische Signifikanz. Jiang *et al.* konnten zeigen, dass MCP-1 die IL-6-Produktion von Monozyten induziert (Jiang *et al.* 1992). In vaskulären glatten Muskelzellen stimuliert MCP-1 die VEGF-Produktion (Parenti *et al.* 2004). Diese Beobachtungen widersprechen denen der vorliegenden Arbeit, in der sich zeigte, dass MCP-1 die IL-6- und VEGF-Konzentrationen in HNSCC-Kulturüberständen reduziert.

##### 4.2.3.2 MCP-1-Blockade

Durch Zugabe des Anti-MCP-1-Antikörpers konnten die MCP-1- und IL-8-Konzentrationen in den Kulturüberständen signifikant reduziert werden. Die Reduktion von MCP-1 durch den Antikörper war erwartet und als solches erwünscht. Auch IL-8 wurde supprimiert. Dieser Effekt ist eventuell auf eine durch den Anti-MCP-1-Antikörper reduzierte Zellzahl bzw. verminderte Koloniebildung zurückzuführen.

Insgesamt wurden sowohl unter der MCP-1-Stimulation als auch –Blockade Zytokin supprimierende Effekte beobachtet, die auf zytotoxische oder proliferationshemmende Effekte beider Proteine schließen lassen. Dabei unterschieden sich die Effekte der MCP-1-Stimulation und –Blockade jedoch im Nettoeffekt nicht signifikant voneinander. Dies könnte mit der geringen Fallzahl der Vorversuche (n=5) zu erklären sein. Aus den Vorversuchen zur Untersuchung des Einflusses der MCP-1-Stimulation und –Blockade auf die Zytokinexpression in HNSCC *ex vivo* im 6-Well-Ansatz ergab sich die Rationale, die Effektivität der MCP-1-Stimulation und -Blockade in Kombination mit Zytostatika im 48-Well-Ansatz zu testen.

### **4.3 Ex-vivo-Chemoresponse-Testung in Zellkulturplatten mit 48 Kavitäten (48-Well-Ansatz)**

Im Folgenden werden die Resultate der Kombinationsexperimente der Zytostatikawirkung unter MCP-1-Stimulation bzw. –Blockade diskutiert. Von initial 32 getesteten Tumoren wiesen 16 in den Kontrollen mindestens 4 Kolonien auf, sodass eine Anwachsrate von 50% vorliegt. Die Anwachsrate von 50% entspricht einem überdurchschnittlich guten Resultat bei fortgeschrittenen HNSCC, da von diesen erfahrungsgemäß nur ein Drittel der getesteten Tumoren auch adhärente Kontrollen in der Zellkultur liefern. Dies liegt zum einen daran, dass Proben von Rezidiven meist schon vortherapiert sind und daher ein schlechteres Anwachsverhalten zeigen als chemo-naive Tumoren. Um die Adhärenz der Tumorzellen am Plattenboden zu verbessern und die extrazelluläre Matrix zu imitieren, wurden die verwendeten Zellkulturplatten daher mit Kollagen, humanem Fibrinogen und Laminin beschichtet.

#### **4.3.1 Koloniebildung von HNSCC im 48-Well-Ansatz**

##### 4.3.1.1 Cisplatin

Der stärkste Inhibitor der Koloniebildung war Cisplatin. Diese Beobachtung war zu erwarten, da Cisplatin ein sehr potentes Therapeutikum in der Therapie der Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region ist. Platinbasierte Therapieregime haben sich in der Therapie der HNSCC durchgesetzt, entweder als Cisplatin/Carboplatin-Monotherapie (P), oder in Kombination mit 5-Fluoruracil (F) und Taxanen (T) wie Paclitaxel/Docetaxel als Zweierkombination (PF bzw. TP) oder als Dreierkombination (TPF). Ein gängiges Konzept der Cisplatin-Monotherapie beinhaltet die Gabe von Cisplatin (100 mg/m<sup>2</sup> KOF) am Tag 1, 22 und 43 der Radiatio (Dietz *et Flentje* 2010).

##### 4.3.1.2 Docetaxel

Docetaxel senkte die Koloniebildung, jedoch ohne statistische Signifikanz. Durch die Zugabe von MCP-1 bzw. des Anti-MCP-1-Antikörpers konnte die Docetaxelwirkung jedoch verstärkt werden. Dies deutet darauf hin, dass Docetaxel in der Therapie der Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region in einer Kombinationstherapie besser geeignet ist, denn als Monotherapie. Eine solche Kombinationstherapie findet als TP- oder TPF-Schema klinische Anwendung. PF-basierte Induktionschemotherapien bei inoperablen HNSCC zeigten in Studien zu organerhaltenden Therapien Ansprechraten von 60% bis 80%, das komplette klinische Ansprechen lag jedoch bei nur 20-30%. Das krankheitsfreie 3-Jahres-Überleben wurde unter 50% angegeben. TPF-basierte Studien zeigten dagegen komplette Ansprechraten von 50%, partielle Ansprechraten von 36% und eine im Gegensatz zu PF-

basierten Therapien gesteigerte 3-Jahresüberlebensrate von 73%. Die Therapie lokal fortgeschrittener HNSCC profitiert daher von der Zugabe eines Taxans (Haddad *et al.* 2003).

#### 4.3.1.3 Cilengitide

Insgesamt schien Cilengitide bei den untersuchten HNSCC weniger wirksam als erhofft zu sein. Gar unerwünscht war sogar die bei der Mehrzahl der Tumoren aufgetretene und daher auch im Mittel resultierende Stimulation der Koloniebildung unter Cilengitide, auch wenn die Stimulation ohne statistische Signifikanz blieb. Eine Arbeit von Reynolds *et al.* liefert eine mögliche Erklärung für die Stimulation der Koloniebildung unter Cilengitide: Integrine seien zwar ein viel versprechendes Ziel, aber unterdosiert wirkten Integrin-Inhibitoren als Stimulans für die Tumorzellproliferation über die Induktion der VEGF-getriggerten Angiogenese. Dabei zeigte sich, dass Cilengitide vor allem in einem zu niedrigen Konzentrationsbereich von 0,2 bis 20 nM Effekte ausweist, die die Tumorangiogenese stimulieren und somit *in vivo* zum Tumorwachstum beitragen (Reynolds *et al.* 2009). Im Niedrigdosisbereich könnten die Tumorzellen folglich einen hormetischen Effekt erfahren. Bei Hormesis handelt es sich um das Resultat einer biphasischen Dosis-Wirkungsbeziehung biologischer Systeme, die im niederdosierten Bereich der einwirkenden Substanzen eine Adaptation und sogar eine Stimulation erfahren, und im Hochdosisbereich adäquat inhibiert werden (Mattson 2008). Diese hormetische Antwort tritt in der Natur generalisiert auf und wurde bei tierischen und humanen Tumorzelllinien beschrieben (Calabrese *et al.* Nascarella 2010). Die Arbeit von Calabrese *et al.* liefert mit dem Modell der Hormesis somit eine plausible Erklärung für die Stimulation des Tumorwachstums durch Cilengitide. In der vorliegenden Arbeit wurde Cilengitide in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt, also eine um drei Zehnerpotenzen höhere Konzentration der von Reynolds *et al.* beschriebenen stimulierenden Konzentration. Es muss daher hinterfragt werden, ob Cilengitide in den Experimenten ggf. unterdosiert wurde. Dies ist angesichts des parallel zur Testung der Tumorproben durchgeführten KB-Zell-Kontrolltests jedoch unwahrscheinlich.

Generell muss die Wirksamkeit von Cilengitide kritisch betrachtet werden. Denn auch in anderen Studien verfehlte Cilengitide die erhoffte Wirkung. So habe laut einer Pressemitteilung von Merck die Phase-III-Studie CENTRIC bei Glioblastom-Patienten keine signifikante Steigerung des Gesamtüberlebens unter Cilengitide und der aktuellen Standardtherapie aus Temozolomid und Bestrahlung erreicht (Schrimpf 2013). Die Phase II der ADVANTAGE-Studie zeigte bei rezidivierenden oder metastasierten HNSCC für die Zugabe von Cilengitide zu Cisplatin, 5-Fluorurazil und Cetuximab keinen Vorteil gegenüber der Therapie mit Cisplatin, 5-Fluorurazil und Cetuximab allein (Vermorken *et al.* 2012).

#### 4.3.1.4 Temsirolimus

Temsirolimus senkte die Koloniebildung. Dieser Effekt blieb jedoch ohne statistische Signifikanz. Die supprimierende Wirkung von Temsirolimus bezüglich der Koloniebildung im FLAVINO-Assay wurde auch von Lück *et al.* beschrieben. Deren Daten deuten auf mögliche synergistische Effekte von Temsirolimus in Kombination mit Cisplatin hin (Lück *et al.* 2011). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Effekt von Temsirolimus dem des Cisplatins unterlegen ist. Es ist daher zu diskutieren, dass Temsirolimus zur Therapie der HNSCC in einer Kombinationstherapie besser geeignet ist, denn als Monotherapeutikum. In der primären Chemotherapie sollte daher Cisplatin vorrangig Beachtung finden. Temsirolimus scheint jedoch in der Therapie platinrefraktärer HNSCC viel versprechend zu sein. Um die klinische Wirksamkeit von Temsirolimus bei metastasierten oder rezidivierten HNSCC nach Versagen einer platinbasierten Chemotherapie und Cetuximab zu prüfen, wurde im Juni 2010 die TEMHEAD-Studie initiiert (ClinicalTrials.gov 2013). Im Mai 2012 wurden erste Zwischenergebnisse dieser Studie präsentiert. Der primäre Endpunkt dieser Studie war eine *progression free survival rate* (PFR) von 20% in zwölf Wochen. Die angestrebte PFR wurde mit 40% übertroffen. Die Effektivität von Temsirolimus in platinrefraktären HNSCC sei vergleichbar mit der von Cetuximab allein (Grünwald *et al.* 2012).

#### 4.3.1.5 MCP-1

Überraschend war die Beobachtung, dass eine Stimulation der Tumorzellen mit MCP-1 die Koloniebildung supprimiert. Denn entgegen der in der Literatur beschriebenen anti-tumorösen Wirkung eines Anti-MCP-1-Antikörpers (Salcedo *et al.* 2000), war es die MCP-1-Stimulation, die wesentlich die Koloniebildung hemmte. Es könnte diskutiert werden, dass dieser Effekt lediglich auf einer Aktivierung von Immunzellen durch Lipopolysaccharid (LPS) im rekombinant hergestellten rh-MCP-1 der Firma Relia Tech beruht. Eine Aktivierung von Immunzellen im Tumor oder der Tumorzellen selbst durch LPS und die Aktivierung von Toll-Like-Rezeptoren 4 (TLR4) ist wegen der dazu wesentlich zu geringen Konzentrationen, die über das rekombinante Protein MCP-1 in die Kultur eingetragen wurden, das in *E. coli* exprimiert wurde, unwahrscheinlich. Der Hersteller Relia Tech garantiert LPS-Konzentrationen  $<0,1$  ng/ $\mu$ g rh-MCP-1. Zum Einsatz kamen rh-MCP-1-Konzentrationen von 10 ng/ml, also einem Hundertstel Mikrogramm. Dementsprechend befänden sich die LPS-Konzentrationen unterhalb von 1 pg/ml, einer Konzentration, die keine Aktivierung von TLR4 ermöglicht. Die Kostimulation des TLR4 über die Interaktion von LPS mit dem LPS-bindenden Protein mit der nachfolgenden Ligation und Aktivierung von CD14 kann die Aktivierungsschwelle des TLR4 erniedrigen, ein Effekt, der notwendig ist, den TLR4 unterhalb von 10 ng/ml zu aktivieren. Allerdings sind dabei Konzentrationen kleiner 10 pg/ml ohne signifikanten Effekt bzw. finden sich signifikante Effekte auf die Produktion mehrerer

Zytokine, inklusive IL-6 als sensitivstem Zytokin, erst oberhalb von 10 pg/ml (Wichmann *et al.* 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass MCP-1 die antitumorale Immunabwehr unterstützt. Auch Rollins *et Sunday* beschrieben antitumoröse Effekte von MCP-1. Sie zeigten, dass das JE/MCP-1 Genprodukt Monozyten anlockt und dadurch eine Monozyten-vermittelte Inhibition des Tumorzellwachstums *in vitro* bedingt. Die Expression von humanem oder murinem JE/MCP-1 in CHO-Zellen (*Chinese hamster ovary*) unterdrückte die Tumorentstehung. Auch die Koinjektion von JE/MCP-1-exprimierenden Zellen mit nicht JE/MCP-1-exprimierenden Zellen oder HeLa-Zellen im Tiermodell schützte vor der Tumorentstehung. Diese tumorsupprimierenden Effekte schienen von Wirtsfaktoren abhängig zu sein, nämlich von der monozytären Infiltration und der Funktion der Monozyten/Makrophagen in der unspezifischen Abwehr. Das JE/MCP-1 Protein könnte möglicherweise wichtig in der Tumorthherapie sein (Rollins *et Sunday* 1991). Manome *et al.* immunisierten Ratten mit Zellen des *9L gliosarcoma brain tumor* Modells, die das murine JE-Gen exprimieren, dessen Genprodukt MCP-1 ist. Nachdem die Tiere intradermal mit Tumorzellen des Wildtyps des beschriebenen Tumorzellmodells infiziert wurden, zeigten sich reduzierte Tumorumfänge. MCP-1-exprimierende Zellen könnten somit im Sinne einer Tumorstabilisierung eingesetzt werden (Manome *et al.* 1995). MCP-1 könnte demnach als Adjuvanz zur Kontrolle der Monozyten eingesetzt werden, um körpereigene antitumorale Effekte zu verstärken. Auch die posttranslationale Modifikation von MCP-1 scheint für die Monozytenfunktion entscheidend zu sein. Die chemotaktische Wirkung vieler Zytokine hängt von einer Modifikation des N-Terminus des Polypeptids ab. Durch die Glutaminyl-Cyclase erfolgt eine solche Modifikation des N-Terminus von MCP-1, wodurch ein Pyroglutamatrest entsteht, der MCP-1 vor der Degradation durch Aminopeptidasen schützt. Dieser Pyroglutamatrest stabilisiert MCP-1, verbessert die Rezeptoraktivierung und die Signaltransduktion. Die Monozytenaktivierung wird dadurch verstärkt. Durch die Blockade der Glutaminyl-Cyclase wird auch die Monozyteninfiltration zum Ort der Inflammation inhibiert (Cynis *et al.* 2011). Die bezüglich der Koloniebildung supprimierenden Effekte des MCP-1 im 48-Well-Ansatz können demnach mit einer vermehrten Aktivierung von Gewebsmakrophagen erklärt werden, die zur lokalen Tumorabwehr durch Phagozytose der neoplastischen Zellen beitragen.

#### 4.3.1.6 Anti-MCP-1-Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurde keine signifikante Modulation der Koloniebildung durch den Anti-MCP-1-Antikörper allein beobachtet. Aus den oben beschriebenen Erkenntnissen lässt sich folglich ableiten, dass durch den Anti-MCP-1-Antikörper die Aktivierung der Gewebsmakrophagen inhibiert wurde und daher die Phagozytose der HNSCC-Zellen im Sinne der Tumorabwehr unterblieb. Wurde der Anti-MCP-1-Antikörper jedoch mit den Zytostatika kombiniert, verstärkte er die supprimierenden Effekte der Zytostatika auf die Koloniebildung.

Durch Zugabe des Antikörpers wurde die Wirkung von Temsirolimus stärker unterstützt als durch MCP-1. Die MCP-1-Blockade könnte demnach genutzt werden, um die Wirkung der Zytostatika zu verstärken. Auch Salcedo *et al.* beobachteten antitumoröse Effekte eines gegen MCP-1 gerichteten Antikörpers. So reagierten immundefiziente Mäuse, die mit humanen Brustkrebszellen inokuliert wurden, auf die Gabe eines Anti-MCP-1-Antikörpers mit inhibiertem Wachstum der Lungenmetastasen und folgend einem erhöhten Überleben (Salcedo *et al.* 2000).

### **4.3.2 Zytokinexpression von HNSCC im 48-Well-Ansatz**

#### 4.3.2.1 Cisplatin

Cisplatin senkte die Zytokinexpression in den Kulturüberständen. Dies erklärt sich aus den zytotoxischen Effekten des Zytostatikums. Mit der Reduktion der Anzahl Zytokinproduzierender Zellen sank demnach auch die Zytokinexpression im Kulturüberstand.

#### 4.3.2.2 Docetaxel

Entgegen den Beobachtungen der Vorversuche, in denen Docetaxel die Zytokinexpression reduzierte, stimulierte Docetaxel die Zytokinproduktion im 48-Well-Ansatz. In den Kulturüberständen wurden folglich erhöhte MCP-1-Konzentrationen quantifiziert. Eine Arbeit von Qian *et al.* liefert eine mögliche Erklärung für die Induktion der Zytokinexpression unter Chemotherapie. Sie zeigten, dass unter Docetaxel die MCP-1-Expression von Prostatakarzinom-Zelllinien *in vitro* ansteigt und diese erhöhte MCP-1-Expression die neoplastischen Zellen vor der Zytotoxizität des Docetaxels schützt. Daran seien die Aktivierungen des MAPK/ERK-Signalwegs und des PI3K-AKT-Signalwegs beteiligt. Die Inhibition des PI3K-Signalwegs (bzw. verminderte Aktivität des CCR2-Signalings aufgrund des durch den Anti-MCP-1-Antikörper verminderten MCP-1) würde sich demnach additiv auf die Docetaxelwirkung auswirken. Die Induktion der MCP-1-Expression könnte somit einen Mechanismus der Resistenzentstehung gegenüber Docetaxel erklären und könnte durch die Aktivierung von NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) verursacht sein. Für IL-6 und IL-8 wurden ebenso dosisabhängige Zunahmen unter Docetaxel beobachtet (Qian *et al.* 2009). Auch in den Kulturüberständen der 48-Well-Ansätze wurden unter Docetaxel erhöhte IL-6-Konzentrationen nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung besteht in einer zufälligen Selektion gegenüber Docetaxel resistenter Tumoren. Dies könnte auch die statistisch insignifikante Modulation der Koloniebildung unter Docetaxel erklären. Domingo-Domenech *et al.* zeigten, dass die IL-6-Expression von Prostatakarzinomzellen nach Docetaxel-Zufuhr *in vitro* erhöht wurde. Dies wurde auf die Aktivierung des NFκB-Signalwegs zurückgeführt (Domingo-Domenech *et al.* 2006). NFκB ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Genese solider Tumoren eine wichtige Rolle spielt (Karin

2009) und die Expression proinflammatorischer Zytokine positiv reguliert. Durch die Blockade dieses Signalwegs wurde die IL-6-Expression unter Docetaxel gesenkt und vermehrt Zelltod beobachtet. Domingo-Domenech *et al.* schlussfolgerten daraus, dass der NFκB/IL-6-Signalweg für die Resistenz gegenüber Docetaxel wichtig sei und die Blockade dieses Signalwegs eine mögliche therapeutische Option für Prostatakarzinome darstellen kann (Domingo-Domenech *et al.* 2006). Docetaxel erhöhte auch die IL-8-Expression im 48-Well-Ansatz. IL-8 ist ein proinflammatorisches Zytokin, dessen Transkription ebenfalls durch NFκB reguliert wird (Wolf *et al.* 2001). Da Docetaxel den NFκB-Signalweg aktiviert (Domingo-Domenech *et al.* 2006), sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der Steigerung der IL-8-Produktion der untersuchten HNSCC durch Docetaxel nachvollziehbar.

### 4.3.2.3 Cilengitide

In den 48-Well-Ansätzen steigerte Cilengitide die Expression von MCP-1, IL-6 und IL-8 im Kulturüberstand signifikant. Die Expression der Zytokine korrelierte unter Cilengitide positiv miteinander. Aus den stimulierenden Effekten auf die Koloniebildung lassen sich die stimulierenden Effekte auf die Zytokinexpression unter Cilengitide erklären. Die gesteigerte Zytokinkonzentration der Kulturüberstände erklärt sich vorrangig aus der erhöhten Anzahl Zytokin-produzierender Zellen.

### 4.3.2.4 Temsirolimus

Entgegen den Beobachtungen der Vorversuche im 6-Well-Ansatz, in denen es unter Temsirolimus zur Suppression der Zytokine kam, steigerte es im 48-Well-Ansatz die Zytokinkonzentration im Kulturüberstand. Auch hier kann eine zufällige Selektion der Tumoren vorgelegen haben, die gegenüber Temsirolimus weniger chemosensibel waren. Daraus würde sich auch die insignifikante Koloniesuppression erklären. Die Steigerung der Zytokinexpression unter Temsirolimus könnte als Reaktion der Tumorzellen auf einen inflammatorischen Stimulus durch das Zytostatikum verstanden werden.

### 4.3.2.5 MCP-1

Unter MCP-1-Einfluss wurden positive Korrelationen zwischen der Koloniebildung und der IL-6- und IL-8-Expression registriert. Die sinkende Zytokinexpression erklärt sich daher aus der sinkenden Anzahl Zytokin-produzierender Zellen. Durch die Zugabe von MCP-1 wurden die IL-6- und IL-8-Konzentrationen der Kulturüberstände bezogen auf die unbehandelte Kontrolle und unter Einfluss der Zytostatika gesenkt. In Kombination mit den Zytostatika reduzierte MCP-1 die IL-6-Expression stärker als der Antikörper, der jedoch in der unbehandelten Kontrolle, im Gegensatz zu MCP-1, IL-6 signifikant senken konnte. Durch MCP-1 wurde IL-8 in den ausschließlich MCP-1-stimulierten Kontrollen und in den

Kombinationen mit Cisplatin, Docetaxel und Cilengitide stärker gesenkt als durch Zugabe des Antikörpers. Die Wirkung von MCP-1 (CCL2) bzw. die durch Aktivierung von CCR2 ausgelöste Wirkung auf die Nettoproduktion von IL-8 ist in der Literatur bislang nicht im Kontext von HNSCC zu finden und folglich nur unzureichend untersucht bzw. nur für tumorassoziierte Makrophagen mechanistisch geklärt (Varney *et al.* 2002). In den Kulturen der getesteten HNSCC wurden, abweichend der in der Literatur zu findenden stimulierenden Effekte von MCP-1 auf IL-8, supprimierende Effekte des MCP-1 auf IL-8 gefunden. Erklärungen können, neben abweichenden experimentellen Bedingungen, in der durch HNSCC allgemein ausgeübten Immunsuppression liegen (Pries *et Wollenberg* 2006), die durch MCP-1 different moduliert wird. Die in der Literatur beschriebene Dosis-kritische duale Wirkung von MCP-1 (hohe Konzentrationen: Stimulation von tumoriziden Monozyten im Tumor, niedrigere Konzentrationen dagegen vorrangige Stimulation der Angiogenese bei verminderter Tumorizidie (Nesbit *et al.* 2001)) könnte wegen des uns unbekanntes Schwellenwertes eine Teilerklärung darstellen. Insofern steht die Frage, ob bei HNSCC mit niedrigen MCP-1-Konzentrationen über Senkung der MCP-1-Wirkung am CCR2 eine Unterdrückung der Koloniebildung resultiert.

#### 4.3.2.6 Anti-MCP-1-Antikörper

Die MCP-1-Expression wurde durch den Anti-MCP-1-Antikörper gesenkt. Dieser Effekt war erwartet und erwünscht. Nach Zugabe des Anti-MCP-1-Antikörpers zeigte sich auch eine Reduktion der IL-6-Expression: Bezogen auf die unbehandelte Kontrolle senkte dieser die IL-6-Produktion signifikant. Dies entspricht den gemäß verfügbarer Literatur zu erwartenden Verhältnissen (Heimdal *et al.* 2001). Durch den Anti-MCP-1-Antikörper wurde auch IL-8 reduziert und in den anderweitig unbehandelten Kontrollen signifikant reduziert. Es zeigte sich, dass IL-8 unter Temsirolimus durch den Antikörper stärker inhibiert wurde als durch MCP-1, jedoch ohne statistische Signifikanz. Dies erklärt sich einerseits aus der Hemmung von HIF-1 $\alpha$  durch Temsirolimus über die mTOR-Blockade (Del Bufalo *et al.* 2006), wodurch die HIF-1 $\alpha$  getriggerte IL-8-Expression (Maxwell *et al.* 2007) inhibiert wird. Andererseits sollte MCP-1 die IL-8-Produktion erhöhen. Daraus folgt offenbar, dass IL-8 und MCP-1 insgesamt zu einer nicht signifikanten Nettoantwort führen, aber die gleichsinnige Inhibition von IL-8 durch Temsirolimus und fehlenden IL-8-Stimulus wegen des Anti-MCP-1-Antikörpers zu einer insgesamt verminderten IL-8-Produktion führt. Wie schon für die Koloniebildung berichtet, wirken Anti-MCP-1-Antikörper und Temsirolimus an unterschiedlichen Stellen des mTOR-Signalwegs, wodurch sich verstärkende Effekte entsprechend der unabhängigen Wirkung beider Inhibitoren resultieren können. Die positiven Korrelationen zwischen der Koloniebildung und der IL-6- und IL-8-Expression unter Einfluss des Anti-MCP-1-Antikörpers belegen auch hier einen potentiellen Vorteil in der Therapie von HNSCC zumindest *ex vivo*,

die in Zellzahlreduktion und sinkender Zytokinexpression besteht. Dabei ist die Frage zu stellen, ob diese Effekte auch *in vivo* resultieren oder ggf. nur unter den gewählten experimentellen Bedingungen auftreten. In dieser Hinsicht ist anzumerken, dass gezeigt wurde, dass die Modulation von IL-8 auch durch die künstliche Matrix, insbesondere durch Kollagen, Fibrinogen und Laminin, zumindest beeinflusst wird (Lukacs *et al.* 1995). Allerdings wurde dieser experimentelle Einfluss in allen Ansätzen konstant gehalten. Die z. T. diskrepanten Ergebnisse zur Wirkung von MCP-1 auf die IL-8-Produktion in den Experimenten im 6-Well-Ansatz im Vergleich zum 48-Well-Ansatz können aber gerade dadurch mitbestimmt sein. Schließlich wurden für die Vorversuche im 6-Well-Ansatz Zellkulturplatten verwendet, die mit humanem Fibrinogen beschichtet wurden, während für den 48-Well-Ansatz Zellkulturplatten Verwendung fanden, die mit humanem Fibrinogen, Kollagen und Laminin beschichtet waren. Weder für die Koloniebildung noch für die Zytokinexpression zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Effektivität der MCP-1-Stimulation bzw. dessen Blockade. Die insignifikante Reduktion der Zytokinexpression zeigte sich auch in den Vorversuchen. In den 48-Well-Ansätzen ergaben sich mit dem größeren Stichprobenumfang jedoch andere Muster bezüglich der Effektivität der Substanzen, was auch in der biologischen Heterogenität der HNSCC begründet ist. So wurde in den Vorversuchen IL-6 im unbehandelten Kulturüberstand durch MCP-1 stärker supprimiert als durch den Antikörper. In den 48-Well-Ansätzen senkte dagegen der Antikörper IL-6 im unbehandelten Kulturüberstand stärker als MCP-1. Auch Heimdal *et al.* zeigten, dass durch die Zugabe eines Anti-MCP-1-Antikörpers die IL-6-Sekretion von HNSCC-stimulierten Monozyten reduziert werden kann (Heimdal *et al.* 2001). Dabei stellt sich die Frage, ob der eingesetzte Antikörper in der vorliegenden Arbeit die IL-6-Produktion der Tumorzellen oder tumorassoziiertes Monozyten/ Makrophagen reduzierte. Entgegen den Vorversuchen, in denen IL-8 durch den Antikörper stärker supprimiert wurde, wurde IL-8 in den 48-Well-Ansätzen durch MCP-1 stärker beeinflusst. Beide Substanzen reduzierten die Zytokinexpression. Dies deutet darauf hin, dass andere Faktoren im Umfeld der Tumoren eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen. Durch MCP-1 werden tumorassoziierte Makrophagen aktiviert, die über Phagozytose der Tumorzellen zur lokalen Tumorabwehr beitragen. Die Reduktion der Tumorzellen erklärt die Verminderung der Zytokinexpression. Durch den Anti-MCP-1-Antikörper sollte die Makrophagenaktivierung gehemmt werden, sodass daraus eine geringere tumorizide Wirksamkeit der Monozyten/ Makrophagen und daher eine gesteigerte Zytokinexpression aufgrund der größeren Anzahl verbliebener Tumorzellen resultieren müsste. Tatsächlich ist entsprechend der vorliegenden Messwerte das Gegenteil der Fall. Da auch der Antikörper die Zytokinexpression reduzierte, ist anzunehmen, dass der Antikörper die Zytokinexpression der Makrophagen inhibierte, die im Mikromilieu des Tumors über die Produktion von Wachstumsfaktoren (z.B. IL-8 und VEGF)

zur Tumorangiogenese und dem Tumorwachstum beitragen. Letztlich scheint die MCP-1-Dosisabhängigkeit der Suszeptibilität der tumorassoziierten Makrophagen über die Effektivität der MCP-1-Stimulation und -Blockade zu entscheiden. Da sowohl unter der MCP-1-Stimulation als auch der -Blockade eine Suppression der Zytokinexpression beobachtet wurde, müssen auch externe Faktoren diskutiert werden, durch die die Ergebnisse ggf. überlagert sein könnten, z.B. durch Proteine der extrazellulären Matrix. So könnte die Beschichtung der Zellkulturplatten mit Kollagen, Laminin und humanem Fibronectin (s.o.) Einfluss auf die Zytokinexpression genommen haben. Durch die Bindung der Zellen an diese Proteine könnte eine Kontaktinhibition aufgetreten sein, die zu einer Suppression der Zytokinexpression führte. Lukacs *et al.* zeigten, dass Monozyten nach Inkubation mit Kollagen und Fibronectin weniger IL-8 und MCP-1 produzierten als nicht präinkubierte Monozyten (Lukacs *et al.* 1995). Wäre dies der Fall gewesen, hätten auch in den unbehandelten Kontrollen Zytokinsuppressionen auftreten müssen. Die behandelten Kulturüberstände unterschieden sich jedoch von den unbehandelten Kontrollen. Daher ist ein Effekt der extrazellulären Matrix zwar denkbar, aber unwahrscheinlich.

#### **4.3.3 Individuelle Betrachtung der Chemoreaktivität der untersuchten Plattenepithelkarzinome im 48-Well-Ansatz**

Die individuelle Betrachtung der Testergebnisse der Chemoreaktivität auf Basis des Koloniebildungsverhaltens (Tab. 25) zeigte Muster auf. Einige Tumoren reagierten abweichend von denen für die Gesamtheit ermittelten Verhältnisse. Dies ist durch eine große biologische Heterogenität der untersuchten HNSCC begründet. Die individuelle prädiktive Testung der Chemoreaktivität wäre daher erstrebenswert, um die Therapie individuell zu optimieren und Nonresponder auf Chemotherapie bei möglicher Resektabilität einer primären chirurgischen Intervention zuzuführen (Wichmann *et al.* 2011).

#### **4.3.4 Bestimmung korrelierender Effekte in den Kombinationsexperimenten zur Stimulation durch MCP-1 und Inhibition von MCP-1**

In der Betrachtung korrelierender Effekte waren enge positive Korrelationen zwischen IL-6 und IL-8 zu beobachten. Diese gleichsinnigen Verhältnisse zeigten sich in allen getesteten Situationen sowohl unter MCP-1, Anti-MCP-1-Antikörper, Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide, als auch Temsirolimus. Die Expression dieser Zytokine scheint daher eng miteinander vernetzt zu sein. Beide Zytokine sind proinflammatorische Zytokine, sodass es sinnvoll erscheint, dass beide Zytokine auf inflammatorische Reize, in diesem Fall die Inkubation mit den zu testenden Substanzen, gleichsinnig reagieren. Beide Zytokine stehen aber auch über den NFκB in Verbindung. IL-8 induziert NFκB, einen Transkriptionsfaktor, der in Tumoren oft überexprimiert ist (Manna *et al.* 2005). NFκB wiederum induziert IL-6. IL-6 kann im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens über zwei Wege induziert werden: Zum

einem über einen NFκB-abhängigen Weg, zum anderen NFκB-unabhängig über die Cyclooxygenase-2 (COX-2), Prostaglandin E2 (PGE2) und den *Transforming growth factor beta* (TGFβ) (Tawara *et al.* 2011). IL-8 wird aber auch selbst durch die Aktivierung von NFκB induziert. HNSCC exprimieren autonom IL-1α, das wiederum NFκB aktiviert, wodurch die Expression proangiogener Zytokine wie IL-8 gesteigert wird (Wolf *et al.* 2001). Über diese Querverbindungen lassen sich die positiven Korrelationen zwischen IL-6 und IL-8 erklären. Unter Docetaxel wurde eine positive Korrelation zwischen IL-6 und MCP-1 beobachtet. Die erhöhte IL-6-Expression kann durch die von Domingo-Domenech *et al.* beschriebene IL-6-Induktion durch Docetaxel über Aktivierung des NFκB bedingt sein. IL-6 kann wiederum die MCP-1-Expression induzieren (McLoughlin *et al.* 2004).

#### **4.3.5 Betrachtung der Interaktionsmechanismen in den Kombinationsexperimenten zur Stimulation durch MCP-1 und Inhibition von MCP-1**

Sowohl MCP-1 als auch der Anti-MCP-1-Antikörper trugen additiv zur Cisplatinwirkung bei. Diese additiven Effekte ergeben sich aus den gleichsinnigen Effekten der Substanzen. Cisplatin, MCP-1 und der Anti-MCP-1-Antikörper senkten sowohl die Koloniebildung, als auch die Zytokinexpression (unter MCP-1 werden nur IL-6 und IL-8 betrachtet). Daraus ergibt sich, dass sowohl MCP-1 als auch der Anti-MCP-1-Antikörper als verstärkendes Adjuvanz zu Cisplatin hinzugegeben werden könnten. In der individuellen Betrachtung der Interaktionsmechanismen zeigte sich jedoch für einige HNSCC, dass neben additiven Wirkungen auch Antagonismus resultieren kann. Daher sollte vorher individuell getestet werden, ob der Tumor stärker von einer MCP-1-Stimulation oder einer -Blockade profitiert.

Durch die Zugabe des Anti-MCP-1-Antikörpers oder MCP-1 zu Docetaxel wurden bezüglich der Beeinflussung der Koloniebildung synergistisch suppressive Effekte beobachtet. Auch unter Docetaxel könnten sowohl MCP-1 als auch der Anti-MCP-1-Antikörper als verstärkendes Adjuvanz bezüglich der Koloniesuppression eingesetzt werden. Hinsichtlich der Zytokinexpression wurden nach Zugabe von MCP-1 und dem Anti-MCP-1-Antikörper dagegen antagonistische Effekte beobachtet, da Docetaxel zu einer Zytokinproduktionssteigerung führte, während MCP-1 und der Antikörper die Zytokinexpression senkten.

Unter Cilengitide zeigten sich für die Koloniebildung und die Zytokinexpression antagonistische Effekte nach Zugabe von MCP-1 und dem Anti-MCP-1-Antikörper. Dies ist auf die stimulierende Wirkung von Cilengitide und der hemmenden Wirkung von MCP-1 und dem Anti-MCP-1-Antikörper zurückzuführen.

Unter Temsirolimus und dem Anti-MCP-1-Antikörper wurden synergistische Effekte bezüglich der Reduktion der Koloniebildung beobachtet, während MCP-1 antagonistisch wirkte. Temsirolimus und der Anti-MCP-1-Antikörper können synergistisch wirken, da beide am PI3K-AKT-Signalweg angreifen. Durch MCP-1 wird die PI3K aktiviert, durch den Antikörper fällt deren Aktivierung über MCP-1 und die Signaltransduktion über CCR2 jedoch

aus. Der mTOR-Signalweg, der von Temsirolimus inhibiert wird, liegt wiederum *downstream* des PI3K-AKT-Signalwegs. Daraus leiten sich einerseits die antagonistischen Effekte von MCP-1 ab, da MCP-1 die PI3K aktiviert und diese mTOR stimuliert, das wiederum durch Temsirolimus gehemmt werden soll. Andererseits wird die Aktivierung der PI3K durch den Anti-MCP-1-Antikörper verhindert, sodass auch mTOR keine Induktion erfährt. Somit inhibieren Temsirolimus und der Anti-MCP-1-Antikörper die Signalwege an zwei unterschiedlichen Punkten, woraus sich synergistische Effekte ergeben können, die in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden konnten. Für die Zytokinexpression wurde unter beiden Proteinen in Kombination mit Temsirolimus ein Antagonismus beschrieben. Dies erklärt sich aus den Zytokin-stimulierenden Effekten von Temsirolimus und den Zytokin senkenden Effekten von MCP-1 und dessen Antikörper.

MCP-1 und der Anti-MCP-1-Antikörper könnten somit als Adjuvanz eingesetzt werden, um zusätzliche Effekte in Kombination zur Chemotherapie zu erzielen. Die individuelle Betrachtung der Interaktionsmechanismen zeigte jedoch, dass die Tumoren nicht einheitlich, sondern sehr heterogen auf die MCP-1-Stimulation oder -Blockade reagierten. Daher sollte eine individuelle Testung der Tumoren erfolgen. Es ist anzunehmen, dass es weitere Faktoren gibt, von denen abhängt, wie der Tumor auf die MCP-1-Stimulation bzw. -Blockade reagiert. In diesem Zusammenhang könnten tumorassoziierte Makrophagen, die von MCP-1 stimuliert werden, eine entscheidende Rolle spielen.

#### **4.4 MCP-1, IL-6, IL-8 und VEGF als mögliche Biomarker in HNSCC**

In dieser Arbeit konnte herausgearbeitet werden, dass sich Zytokine als Biomarker für Malignität in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region eignen könnten. Dabei ist der Wert dieser Zytokine als Biomarker in Patientenseren am ehesten als Verlaufsparemeter der Tumorerkrankung zu sehen. So könnten sie in standardisierten Verlaufsanalysen wertvolle Hinweise für immunmodulatorische Effekte bieten. In der vorliegenden Arbeit erwies sich besonders VEGF als Serummarker für Fernmetastasierung der untersuchten Tumoren. Aber auch ein Anstieg der Serumkonzentrationen von MCP-1 und IL-8 gingen mit dem Progress der Tumorerkrankung einher, während erhöhte IL-6-Serumkonzentrationen zumindest zunehmende Tumorgroße repräsentierten. Die mögliche Eignung von MCP-1 als Biomarker wurde an anderer Stelle bereits von der Autorin der vorliegenden Arbeit diskutiert (Körner *et al.* 2012). Auch auf genomischer Ebene scheint sich MCP-1 als Biomarker zu eignen. Chen *et al.* z.B. berichteten über einen genetischen Polymorphismus des MCP-1-Rezeptors CCR2-64I, der mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber oralen Tumoren assoziiert sei (Chen *et al.* 2011). Bektas-Kayhan *et al.* zeigten, dass das G-Allel für MCP-1 und der CCR2 64I häufiger bei Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen vorkommen als bei gesunden Probanden. Sie schlussfolgerten daraus, dass diese genetischen Veränderungen von MCP-1

und CCR2 Risikofaktoren für die Entstehung oraler Plattenepithelkarzinome sein könnten und demnach auch als mögliche Biomarker für die Diagnose dieser Tumoren geeignet seien (Bektas-Kayhan *et al.* 2012). Lu *et al.* diskutieren MCP-1 sowohl als prognostischen Biomarker als auch als einen Serummarker für Metastasierung. Sie beobachteten, dass Patienten mit Nasopharynxkarzinomen und hoher MCP-1-Serumkonzentration eine schlechtere 5-Jahresüberlebensrate und ein schlechteres 5-Jahres-metastasenfreies-Überleben aufwiesen als Patienten mit niedriger MCP-1-Serumkonzentration (Lu *et al.* 2011). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, zumindest im statistischen Trend, eine Korrelation von hohen MCP-1-Serumkonzentrationen mit fortgeschrittenen Tumorstadien.

VEGF wird ebenfalls als prognostischer Marker diskutiert. Eine Überexpression von VEGF in HNSCC scheint mit erhöhter Lymphknotenmetastasierung und einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten assoziiert zu sein. In einer Metaanalyse von Kyzas *et al.* zu immunhistochemisch detektiertem VEGF in HNSCC zeigt sich hierzu jedoch eine sehr heterogene Studienlage, die VEGF einerseits mit schlechterer, andererseits aber auch mit besserer Prognose assoziiert (Kyzas *et al.* 2005). Allen *et al.* demonstrierten, dass Patienten mit fortgeschrittenen Oropharynxkarzinomen und erhöhten VEGF-Serumkonzentrationen vor Therapiebeginn mit Chemotherapie und Radiatio eine längere Überlebenszeit aufweisen als Patienten mit niedrigeren VEGF-Serumlevels (Allen *et al.* 2007). Baumann *et al.* berichteten dagegen von erhöhten VEGF-Serumkonzentrationen, die grenzwertig mit einer schlechteren Prognose bei Patienten mit rezidivierenden oder metastasierten, platinrefraktären HNSCC assoziiert sind (Bauman *et al.* 2013). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass VEGF als Marker für das Metastasierungspotential von HNSCC genutzt werden könnte, da Patienten fernmetastasierter Tumoren signifikant höhere VEGF-Serumkonzentrationen aufwiesen, als Patienten nicht fernmetastasierter Tumoren. Weiterhin wurde der stadienabhängige signifikante Anstieg der VEGF-Konzentrationen in Patientenseren gezeigt, sodass die VEGF-Konzentration in Patientenseren auch als klinischer Verlaufsparemeter für HNSCC genutzt werden könnte. Die Eignung von VEGF als ein klinischer Verlaufsparemeter wurde auch von Riedel *et al.* gezeigt, die nachwiesen, dass HNSCC-Patienten höhere VEGF-Serumkonzentrationen aufweisen als gesunde Kontrollprobanden (Riedel *et al.* 2000).

Seit längerem werden IL-6 und IL-8 als Biomarker für solide Tumoren diskutiert. Beide seien im Patientenserum im longitudinalen Verlauf der Tumorerkrankung als Biomarker sowohl für das Therapieansprechen als auch für das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenen Oropharynxkarzinomen geeignet (Allen *et al.* 2007). Entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnten IL-6 und IL-8 als Serummarker fortgeschrittener HNSCC eingesetzt werden, da Patientenseren von Tumoren größeren Volumens bzw. fortgeschrittener Invasivität (T4a) mehr IL-6 enthielten als die der Tumoren niedrigeren

Volumens bzw. geringerer Invasivität (T3). Auch IL-8 stieg, wenn auch insignifikant, in Patientenseren stadienabhängig an. Auch innerhalb einer größeren Kohorte konnte in Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe im statistischen Trend stadienabhängig erhöhte Konzentrationen sowohl von IL-6 als auch von IL-8 gezeigt werden (Körner *et al.* 2011).

#### **4.5 Die untersuchten Zytokine als mögliche Angriffspunkte neuer Therapien**

Um die Therapie der Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region zu optimieren, bedarf es der Detektion neuer Therapieziele. Ein Angriffspunkt neuer Therapien im Sinne der *targeted therapy* ist z.B. die Blockade des EGFR (*epidermal growth factor receptor*) durch den monoklonalen Antikörper Cetuximab. Die EXTREME-Studie konnte zeigen, dass die zielgerichtete Therapie über die EGFR-Blockade durch Cetuximab das Ansprechen auf Chemotherapie und das Gesamtüberleben verbessert, wenn Cetuximab zu Cisplatin und 5-Fluorurazil hinzugefügt wird (Vermorken *et al.* 2008). Inwiefern sich die untersuchten Zytokine als Angriffspunkte neuer Therapien eignen, muss an dieser Stelle diskutiert werden.

##### **4.5.1 MCP-1**

Nachdem die verfügbare Literatur über MCP-1 den Eindruck vermittelt, dass MCP-1 aktiv zum Progress von HNSCC beiträgt (Ji *et al.* 2014), deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dagegen auf eine stärkere Suppression der Koloniebildung von HNSCC unter dem Einfluss von MCP-1 als unter dem Einfluss eines Anti-MCP-1-Antikörpers hin. Letztlich scheint MCP-1 eine Dosis-kritische duale Wirkung aufzuweisen. Sowohl Nesbit *et al.* als auch Ji *et al.* beobachteten tumorstimulierende Effekte niedriger MCP-1-Konzentrationen und tumorprotektive Effekte hoher MCP-1-Konzentrationen (Nesbit *et al.* 2001, Ji *et al.* 2014). Diese Beobachtungen lassen sich durch die Wirkung des MCP-1 auf tumorassoziierte Makrophagen erklären, die sowohl zur lokalen Tumorabwehr beitragen können als auch das Tumorstadium durch die Initiierung der Angiogenese fördern können. Der Einfluss der Makrophageninvasion auf das Tumorstadium scheint eine Balance zwischen wachstumsfördernden und –hemmenden Faktoren zu sein. So können Makrophagen z.B. durch die Produktion von Wachstumsfaktoren wie VEGF und IL-8 das Tumorstadium und die Angiogenese fördern. Das von Tumorzellen produzierte MCP-1 spielt dabei eine entscheidende Rolle: Tumoren können durch MCP-1 demnach Monozyten/ Makrophagen chemotaktisch anlocken, damit diese aktiv zum Tumorstadium beitragen. MCP-1 ist somit ein kritischer Faktor, der die Makrophagenbalance im Tumor steuert. Andererseits wirkt es tumorprotektiv, da es Monozyten/ Makrophagen als unspezifische Abwehr aktiviert. Diese wirken zytostatisch oder zytotoxisch auf Tumorzellen, indem sie Tumorzellen über TNF- $\alpha$  und dessen Wirkung am TNF-Rezeptor-Komplex attackieren und abtöten sowie abgestorbene Tumorzellen bzw. Detritus phagozytieren und über die Produktion von

Zytokinen, darunter IL-1 und IL-6, weitere Immunzellen wie z.B. Monozyten, Natürliche Killerzellen und T-Lymphozyten für die lokale Abwehrreaktion aktivieren (Kirchner *et al.* 1994). Nesbit *et al.* zeigten, dass die Monozytenaktivierung abhängig vom Level der MCP-1-Sekretion der Tumorzellen ist. Niedrige MCP-1-Konzentrationen führten im Mausmodell zum Tumorwachstum von Melanomzellen, da von MCP-1 angelockte Monozyten/ Makrophagen angiogene Faktoren produzierten, die über die gesteigerte Angiogenese das Tumorwachstum förderten. Unter hohen MCP-1-Konzentrationen dagegen wurden massiv Monozyten rekrutiert, die den Tumor destruierten (Nesbit *et al.* 2001). Ji *et al.* registrierten bei MCP-1-Konzentrationen von 50 ng/ml die höchste Zytotoxizität in HNSCC (Ji *et al.* 2014). Heimdal *et al.* stellten fest, dass Monozyten, die mit HNSCC-Fragmenten kokultiviert wurden, mehr MCP-1 produzierten als nicht kokultivierte Monozyten. Das von HNSCC produzierte MCP-1 entstamme tumorassoziierten Makrophagen (Heimdal *et al.* 2001). Aus diesen Erkenntnissen lässt sich die Vermutung formulieren, dass Tumoren ihr Wachstum über die Aktivierung tumorassoziierter Makrophagen stimulieren und die MCP-1-Produktion eine parakrine Verstärkung erfährt. Dafür spricht, dass MCP-1 sowohl in Tumorzellen, als auch in Stromazellen nachgewiesen werden konnte. In diesem Zusammenhang sind MCP-1 und VEGF in der Tumorangiogenese stark vernetzt, da MCP-1 tumorassoziierte Makrophagen anlockt, die VEGF als proangiogenen Faktor produzieren (Ueno *et al.* 2000). Auch für Prostatakarzinom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass MCP-1 die VEGF-Produktion in diesen Zelllinien *in vitro* stimuliert und somit zur Tumorangiogenese beiträgt (Li *et al.* 2009). MCP-1 soll aber auch direkt auf die Angiogenese wirken, da es chemotaktisch auf Endothelzellen wirkt, die den MCP-1-Rezeptor CCR2 exprimieren. Salcedo *et al.* zeigten *in vivo*, dass MCP-1 direkt die Entstehung neuer Blutgefäße induziert (Salcedo *et al.* 2000). Auch die Metastasierung soll MCP-1-abhängig sein: Wolf *et al.* untersuchten die MCP-1-Expression von Kolonkarzinomen im UICC-Stadium IV und stellten fest, dass eine erhöhte MCP-1-Expression in den Tumorzellen mit dem Metastasierungspotential dieser Tumoren korreliert. Von Tumorzellen produziertes MCP-1 kontrolliere die Gefäßpermeabilität, die Extravasation der Tumorzellen und somit die Metastasierung. Die Extravasation wird dabei über den CCR2 am Gefäßendothel gesteuert. Durch die Aktivierung des JAK2-Stat5- und p38MAPK-Signalwegs über den CCR2 wird die erhöhte Gefäßpermeabilität induziert. Eine CCR2-Defizienz schütze bei Kolonkarzinomen demnach vor der Extravasation der Tumorzellen und somit vor Metastasierung. Die Blockade des CCR2 und des JAK2-Stat5- und p38MAPK-Signalwegs könnten potenzielle therapeutische Ziele sein, um eine MCP-1-vermittelte Metastasierung zu verhindern (Wolf *et al.* 2012). Auch Knochenmetastasen werden als Fernmetastasen durch MCP-1 begünstigt, da es die Differenzierung osteoklastischer Vorläuferzellen zu Osteoklasten stimuliert, wodurch die Knochenresorption gefördert wird (Li *et al.* 2009). Zudem fördere MCP-1 die Differenzierung mononukleärer

Zellen des Knochenmarks zu osteoklastartigen Zellen (Lu *et al.* 2007). Lu *et al.* berichteten über Patienten mit Nasopharynxkarzinomen, die unter erhöhten MCP-1-Serumkonzentrationen häufiger Knochenmetastasen aufwiesen als Patienten mit niedrigeren MCP-1-Serumkonzentrationen. Ihre Beobachtungen deuteten darauf hin, dass gegen MCP-1 gerichtete Therapien vor Knochenmetastasen schützen könnten (Lu *et al.* 2011). Auch die Beobachtungen von Li *et al.* belegen, dass eine MCP-1-Blockade ein erfolgversprechendes Ziel in der Therapie von Knochenmetastasen von Prostatakarzinomen sein kann. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass ein Anti-MCP-1-Antikörper die Tumorgrenzen der Knochenmetastasen signifikant schrumpfen lässt und auch die Knochendestruktion durch die Inhibition der Osteoklastenaktivität reduziert wird (Li *et al.* 2009). Letztlich scheinen mehrere Chemokine kritisch für die Genese von Knochenmetastasen zu sein. So spielt auch IL-8 eine entscheidende Rolle in der tumorinduzierten Osteoklastogenese metastasierter Prostatakarzinome. Durch neutralisierende Antikörper gegen IL-8 könne z.B. die Knochenresorption in Knochenmetastasen von Prostatakarzinomen reduziert werden. Auch IL-8 könnte somit ein neuer Angriffspunkt der Therapie von Knochenmetastasen metastasierter Prostatakarzinome sein (Lu *et al.* 2007). Neben der Aktivierung tumorinfiltrierender Zellpopulationen muss MCP-1 auch als Stimulans entarteter Zellen mit Stammzell-Eigenschaften diskutiert werden. Schließlich wurde nachgewiesen, dass MCP-1 die Pluripotenz von Stammzellen im Sinne eines Wachstumsfaktors verstärken kann (Hasegawa *et al.* 2014).

Arbeiten von Rollins *et al.* und Sunday und Manome *et al.* deuten dagegen darauf hin, dass MCP-1 selbst antitumoröse Eigenschaften besitzt (Rollins *et al.* 1991, Manome *et al.* 1995). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ebenfalls die nicht einheitlich negative Wirkung von hohen MCP-1-Konzentrationen bzw. einen Vorteil durch Verminderung freien MCP-1 über einen MCP-1 depletierenden Antikörper, sondern in der Mehrzahl der Fälle sogar eine stärkere Verminderung der Koloniebildungsfähigkeit von HNSCC unter Zugabe von MCP-1. Weiterführende Untersuchungen zur Korrelation von MCP-1, CCR2 sowie anderen Liganden des CCR2 wie MCP-2, -3 und -4 im Kontext mit der Immunphänotypisierung der im Tumor präsenten Immunzellen sowie der Tumoren selbst erscheinen daher erforderlich.

### 4.5.2 VEGF

Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen die stadienabhängig signifikant zunehmende Konzentration von VEGF in Seren der HNSCC-Patienten. Eine Korrelation zwischen Ansprechen der Therapie und verminderten VEGF-Konzentrationen in Kulturüberständen wurde z.B. unter Temsirolimus demonstriert. Die Blockade von VEGF, sei es auch auf indirektem Wege *upstream* des Signaltransduktionsweges, scheint somit antitumorale Effekte aufzuweisen. Allerdings kommt dabei den agierenden Zellpopulationen eine zentrale

Rolle zu, denn Endothelzellen und Monozyten bzw. Makrophagen scheinen in Antwort auf MCP-1 zum Teil gegenläufige Einflüsse auf den Tumor zu nehmen. Auch Strauß *et al.* betonen die Schlüsselrolle tumorassoziiertes Makrophagen in HNSCC. Durch MCP-1 werde die Makrophageninvasion in den Tumor stimuliert. Die angelockten Makrophagen würden ihrerseits durch die Produktion von VEGF zur Tumorangiogenese beitragen. Die Makrophageninvasion in den Tumor scheint also nicht eine defensive Tumorbarriere zu sein, sondern sie scheint den Tumor durch die Produktion von VEGF in Stroma und Tumorzellen aktiv zu unterstützen. Die Blockade der Makrophageninfiltration in den Tumor durch Retinsäure könnte ein möglicher Therapieansatz sein, um die Induktion der lokalen Immunsuppression durch mangelnde Ausreifung dendritischer Zellen und die Angiogenese durch den Tumor zu inhibieren (Strauss *et al.* 2005). Als Produzenten von VEGF kommen aber neben Monozyten/ Makrophagen insbesondere auch Epithelzellen selbst in Frage. Die VEGF-Produktion durch letztere lässt sich durch Unterdrückung der EGFR-Signaltransduktion hemmen. Eine direkte VEGF-Blockade zur Hemmung der Tumorangiogenese könnte aber ein ebenso viel versprechender Therapieansatz bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region sein. Fujita *et al.* untersuchten die Wirkung von Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF, auf HNSCC. *In vitro* schien Bevacizumab keine antiproliferative Wirkung gegen HNSCC-Zelllinien zu haben. Dies ist jedoch nicht weiter verwunderlich, da in 2D-Zellkulturen die Diffusionsstrecken ausreichend sind, um die für die Proliferation erforderliche Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sicherzustellen, sodass solche *In-vitro*-Modelle mit ausschließlich Karzinomzellen ungeeignet sind, diese Frage zu beantworten. Antitumorale Effekte wurden dafür in HNSCC-Xenotransplantaten in Mäusen beobachtet. Bevacizumab konnte zudem die antineoplastische Wirkung von Paclitaxel erhöhen. Unter Bevacizumab sank die Dichte der Blutgefäße der Tumoren und der apoptotische Index stieg (Fujita *et al.* 2007). Welche Effekte Bevacizumab im klinischen Umfeld hat, wird seit 2008 in der multizentrischen Phase III ECOG E1305 Studie untersucht. Dabei werden die Effekte der platinbasierten Standardtherapie allein mit der Kombination von Bevacizumab und der platinbasierten Standardtherapie in HNSCC verglichen (ECOG-ACRIN cancer research group 2013). Bisherige klinische Ergebnisse zu Bevacizumab bei Kopf-Hals-Tumoren blieben allerdings hinter den in sie gesetzten Erwartungen zurück.

### 4.5.3 IL-6

Es wurde bereits erwähnt, dass Chemokine eine wesentliche Rolle in der Genese von Metastasen spielen. Auch IL-6 ist in diesem Zusammenhang von Interesse und ist daher in seiner Wirkung auch als Chemokin zu diskutieren. Zudem reguliert IL-6 die Expression von Chemokinen und insbesondere auch die MCP-1-Expression (McLoughlin *et al.* 2004).

Gallo *et al.* zeigten, dass IL-6 die Migration verschiedener Brustkrebszelllinien fördert und somit chemotaktische Eigenschaften aufweist. Dafür entscheidende Signaltransduktionswege sind die Aktivierungen von STAT3 und AKT (Gallo *et al.* 2012). Dies sind zudem oft überexprimierte Signaltransduktionswege in der Genese von Knochenmetastasen. IL-6 aktiviert über eine Januskinase STAT3, wodurch die Expression von RANKL (*Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand*) gesteigert wird. RANKL ist wesentlich an der Differenzierung von osteoklastären Vorstufen beteiligt. Durch die Überexpression von IL-6 in Knochenmetastasen kommt es zu einer Dysregulation der Osteoklasten, wodurch eine vermehrte Knochendestruktion folgt. Für das IL-6 getriggerte Tumorwachstum sind folgende Signalwege wichtig: Über die IL-6R-Komplex-getriggerte Transaktivierung von Januskinasen wird der MAPKinase-Signalweg aktiviert, wodurch eine gesteigerte Proliferation, Mitose und Zellwachstum folgen. Über die Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs resultieren Antiapoptose und daher Zellüberleben (Tawara *et al.* 2011). Zum Zeitpunkt der Literaturrecherche lagen bei Pubmed keine Veröffentlichungen vor, die die IL-6-Blockade in HNSCC untersuchten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass die IL-6-Produktion von HNSCC unter Stimulation durch MCP-1, der MCP-1-Inhibition durch einen Anti-MCP-1-Antikörper und durch Zytostatika different moduliert wird, was sich auch in der differenten Fähigkeit zur Koloniebildung unter den verschiedenen Substanzen widerspiegelt. Für andere Tumorentitäten wird eine IL-6-Blockade jedoch als Therapieansatz diskutiert. Sansone *et al.* berichten in einer Übersichtsarbeit über erste Studien zur IL-6-Blockade bei Prostatakarzinomen und in der Hämatonkologie. Auch die Blockade des von IL-6 angesteuerten JAK-STAT3-Signalwegs wird diskutiert (Sansone *et al.* Bromberg 2012). STAT3 liegt *downstream* des EGFR und induziert die Expression vieler Gene, die in HNSCC oft überexprimiert sind, wie z.B. Bcl-XL, einem Mediator der Antiapoptose. Boehm *et al.* konnten an HNSCC-Zelllinien zeigen, dass die Inhibition von STAT3 die antitumorösen Effekte von Erlotinib als EGRF-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor *in vitro* und *in vivo* verstärkte. Die kombinierte STAT3- und Bcl-XL-Blockade sowie die Triple-Kombination mit Erlotinib führten zu einer reduzierten Tumorzellproliferation. Eine STAT3-Blockade in HNSCC kann somit zu vermindertem Tumorwachstum und auch zu synergistischen Effekten gegenüber anderen Therapien führen (Boehm *et al.* 2008). Zudem gibt es Hinweise, dass STAT3 direkt die VEGF-Expression HNSCC moduliert, wodurch die Tumorangiogenese angestoßen wird (Masuda *et al.* 2006). Eine STAT3-Blockade erscheint somit auch im Sinne der Antiangiogenese sinnvoll. Auch Nagasaki *et al.* beschrieben antiangiogene Effekte durch eine IL-6-Blockade in Kolonkarzinomen. Durch stromale Fibroblasten erfolge IL-6-getriggert die VEGF-Produktion der Fibroblasten, wodurch die Angiogenese von Kolonkarzinomen unterstützt werde. Durch die Blockade der IL-6-Produktion stromaler Fibroblasten durch einen IL-6-Antikörper wurden schließlich

antitumoröse Effekte beobachtet (Nagasaki *et al.* 2014). IL-6 scheint somit neben MCP-1 und IL-8 als Angiogenese-Stimulus in Malignomen eine große Bedeutung zu haben und ist daher ein interessantes Ziel zukünftiger Therapien.

#### 4.5.4 IL-8

Viele *in vitro* durchgeführte Untersuchungen bestätigten die unterstützenden Eigenschaften des IL-8 bezüglich Tumorwachstums, Metastasierung und Tumorangiogenese. Varney *et al.* zeigten, dass mit MCP-1 stimulierte Monozyten mit einer erhöhten IL-8-Produktion als Angiogenese fördernden Faktor reagierten. Dementsprechend kann IL-8 auch in der von tumorassoziierten Makrophagen induzierten Tumorangiogenese eine entscheidende Rolle spielen (Varney *et al.* 2002). IL-8 kann auch als autokriner und/ oder parakriner Wachstumsfaktor auf Tumorzellen wirken. Zhu *et al.* zeigten, dass IL-8 die Proliferation von Lungenkrebszelllinien stimuliert und ein Anti-IL-8-Antikörper deren Proliferation abschwächt. Das mitogene Potential von IL-8 wird dabei überwiegend über den CXCR1 vermittelt, dessen Blockade ebenfalls antiproliferativ wirkt (Zhu *et al.* 2004). Huang *et al.* beobachteten im Mausmodell ein vermindertes Tumorwachstum, eine geringere Metastasierung und eine Inhibition der Angiogenese von humanen Melanomzellen, nachdem die Tiere mit einem humanen Anti-IL-8-Antikörper therapiert wurden (Huang *et al.* 2002).

Zum Zeitpunkt der Literaturrecherche lagen bei Pubmed keine Daten vor, inwiefern eine IL-8-Blockade in HNSCC antitumorös wirkt. Analog zur IL-6-Produktion unter den getesteten Situationen wurde in der vorliegenden Arbeit auch die IL-8-Produktion von HNSCC *ex vivo* different moduliert.

#### 4.6 Abschließende Betrachtungen

Auf der Suche nach optimierten Therapien und neuen Angriffspunkten in der Therapie von HNSCC ist es wichtig, Verlaufsp Parameter zu detektieren und die heterogene Biologie der Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region besser zu verstehen. Die Beobachtungen dieser Arbeit bestätigen die Aussage, dass HNSCC untereinander sehr heterogen sind. Dieses heterogene Verhalten zeigte sich sowohl in der Zytokinexpression in Patientenseren und Kulturüberständen als auch in der Koloniebildung. Ein experimentelles *Ex-vivo*-Modell zur individuellen Testung der Chemoreaktivität eines Tumors besteht in der *Chemoresponse*-Testung durch den FLAVINO-Assay. Jedoch ergibt sich gerade aus der *Ex-vivo*-Testung, insbesondere der wirtsfernen Extraktion der Tumorzellkolonien, das Problem der Übertragbarkeit der *Ex-vivo*-Ergebnisse auf *In-vivo*-Verhältnisse. Umso wichtiger ist es, das Mikromilieu des Tumors zu erforschen. In diesem Mikromilieu tragen Zytokine dazu bei, die lokale Funktion von Immunzellen und des Gewebes insgesamt zu regulieren und zu orchestrieren (Mann *et al.* 1992). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, wie eng MCP-1,

IL-6, IL-8 und VEGF miteinander vernetzt sind: Die Konzentrationen von IL-6, IL-8 und VEGF korrelieren in Seren von HNSCC-Patienten signifikant und sind signifikant höher als bei gesunden Probanden. Diese Zytokine sind aufgrund ihrer proinflammatorischen, angiogenen und immunregulatorischen Eigenschaften im Tumorumfeld als wesentlich zur Tumorigenese beitragend zu betrachten (Chen *et al.* 1999). Auch MCP-1 scheint als Chemoattraktor für tumorassoziierte Makrophagen ein erfolgversprechendes neues Therapieziel zu sein. Im Tumor nimmt die von MCP-1 gesteuerte Makrophagenbalance eine zentrale Rolle ein, da tumorassoziierte Makrophagen sowohl VEGF, als auch IL-8 als angiogene Faktoren produzieren können. Dabei ist jedoch individuell zu klären, ob die Stimulation durch MCP-1 oder die MCP-1-Blockade in der Therapie von HNSCC effektiver ist. Schließlich belegt die Literatur zwar das Metastasierungsfördernde Potential von MCP-1, die Beobachtungsergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass insgesamt die Stimulation durch MCP-1 wesentlich stärker zur Reduktion der Koloniebildung beitrug, als es eine Blockade desselben vermochte. Auch in der vorliegenden Literatur finden sich unterschiedliche Ansichten bezüglich der antitumorösen Wirkung des MCP-1 (Rollins *et al.* 1991) und dessen tumorstimulierenden Effekten (Nesbit *et al.* 2001). Nesbit *et al.* erklären dies mit einer konzentrationsabhängigen Wirkung des MCP-1. Während niedrige MCP-1-Level die Tumorförderung unterstützen und daraus nur eine moderate Monozytenaktivierung resultiert, bewirken hohe MCP-1-Konzentrationen eine massive Monozytenrekrutierung, die zur Destruktion der Tumors führt (Nesbit *et al.* 2001). Diese dosis-kritische duale Wirkung wurde auch in HNSCC beobachtet (Ji *et al.* 2014). Aber nicht nur die MCP-1-Konzentration scheint über die Monozytenrekrutierung zu entscheiden, sondern auch die Struktur. Durch posttranslationale Modifikation kann die Degradation von MCP-1 gehemmt werden und die MCP-1-Wirkung verstärkt werden (Cynis *et al.* 2011). Sowohl die MCP-1-Blockade durch einen Antikörper (Salcedo *et al.* 2000), als auch die Gabe von MCP-1 im Sinne einer Vakzine (Manome *et al.* 1995) zeigten sich im Tiermodell erfolgreich in der Reduktion der Primärtumoren bzw. Metastasen. Zudem konnte demonstriert werden, dass die beschriebenen Zytokine alle auf den PI3K-AKT- bzw. JAK-STAT3-Signalweg zurückgreifen, der in vielen Tumoren überexprimiert ist. Die Blockade dieser Signalwege könnte ebenfalls antitumoröse Effekte erzielen (Boehm *et al.* 2008, Qian *et al.* 2009). Insofern kann das unterschiedliche Ergebnis der Stimulation durch MCP-1 oder dessen Suppression mit einem Anti-MCP-1-Antikörper vermutlich auch auf einen unterschiedlichen Aktivierungsstatus dieser Signaltransduktionswege in den individuellen HNSCC zurückgeführt werden. Dies nachzuweisen erscheint für künftige Projekte lohnend, denn die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Rolle des MCP-1 im Tumorumfeld noch besser verstanden werden muss und zudem die Funktion der tumorassoziierten Monozyten und Makrophagen in HNSCC genauer erforscht werden sollte.

## 5. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

### **Die Analyse der Inhibition des Monozyten chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1) und der Stimulation durch MCP-1 auf die Koloniebildung und die Zytokinexpression von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region im FLAVINO-Assay**

Eingereicht von: Carolin Körner

Angefertigt an: der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Klinik und  
Poliklinik für Hals-Nase-Ohrenheilkunde/Plastische Operationen

Betreut von: Prof. Dr. med. A. Dietz, Dr. rer. nat. G. Wichmann

Juli 2014

Bei Malignomen der Kopf-Hals-Region handelt es sich überwiegend um Plattenepithelkarzinome (HNSCC). Im Jahr 2008 waren maligne Tumoren der Mundhöhle und des Rachens die fünfthäufigste Krebserkrankung in Deutschland (Robert-Koch-Institut 2012). Obwohl diese Tumoren vermehrt in multimodalen Therapieansätzen, bestehend aus Chirurgie, Chemo- und Radiotherapie, behandelt werden, hat sich das *Outcome* nicht signifikant verbessert (Guntinas-Lichius *et al.* 2010). Ein Grund hierfür mag die große biologische Heterogenität der Tumoren dieser Region sein. Auf der Suche nach verbesserten Therapien und neuen Angriffspunkten der Therapie ist es wichtig, Biomarker zu detektieren und die heterogene Biologie von HNSCC besser zu verstehen. Biomarker, die Metastasierung, Krankheitsprogress oder Rezidive widerspiegeln, sind interessante Ziele. Bereits seit langem besteht die Hypothese, dass maligne Tumoren Zytokine produzieren, um die lokale Immunantwort auf eine Neoplasie zu modulieren (Mann *et al.* 1992). Aus diesem Grund befasst sich diese Arbeit mit der Eignung der Zytokine MCP-1, Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und des *Vascular endothelial growth factors* (VEGF) als mögliche Biomarker bzw. Verlaufsparemeter in HNSCC. MCP-1 ist ein CC-Chemokin, das als Chemoattraktor auf Monozyten in der Genese von Malignomen eine wesentliche Rolle spielt. In Malignomen kontrolliert es die Rekrutierung tumorassoziierter Monozyten und Makrophagen und kann daher sowohl inhibierend als auch stimulierend auf das Tumorstadium wirken (Nesbit *et al.* 2001). Erhöhte MCP-1-Expressionen in Kolonkarzinomen (Wolf *et al.* 2012) und Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

(Koide *et al.* 2004) bedingen ein erhöhtes Metastasierungspotential dieser Tumoren. In der Kanzerogenese von HNSCC spielt MCP-1 eine wichtige Rolle: In HNSCC scheint MCP-1 Signalwege zu stimulieren, die das Überleben neoplastischer Zellen begünstigen. Dafür könnte die Stimulation entarteter Zellen mit Stammzell-Eigenschaften durch MCP-1 ursächlich sein. Schließlich wurde nachgewiesen, dass MCP-1 die Pluripotenz von Stammzellen im Sinne eines Wachstumsfaktors verstärken kann (Hasegawa *et al.* 2014). Laut Ji *et al.* korreliert die Überexpression von MCP-1 in HNSCC mit einem schlechten Langzeit-Überleben der Patienten, was die mögliche Eignung von MCP-1 als prognostischen Marker impliziert (Ji *et al.* 2014). Ob diese Charakteristika bei HNSCC unabhängig von therapieinduzierten Effekten sind, ist bisher nicht untersucht. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Untersuchung der Chemoreaktivität von HNSCC unter der Stimulation durch MCP-1 bzw. der Blockade von MCP-1. Neben MCP-1 spielen auch IL-6, IL-8 und VEGF eine wichtige Rolle im Mikromilieu von HNSCC. IL-6 wird als proinflammatorisches Zytokin oft im Zusammenhang der Genese von HNSCC diskutiert, da es zur Antiapoptose führt (Pries *et Wollenberg* 2006). Zudem kann es durch die Vermittlung einer chronischen Inflammation zur Kanzerogenese führen (Aggarwal *et al.* 2006). Auch IL-8 und VEGF tragen als angiogene Zytokine zur Tumorangiogenese und Metastasierung von HNSCC bei (Pries *et Wollenberg* 2006).

Die genannten Zytokine wurden mithilfe des *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) in Patientenseren und Kulturüberständen von HNSCC quantifiziert. Alle durchgeführten Experimente erfolgten dabei unter flavinschützenden Bedingungen gemäß des Protokolls des FLAVINO-Assays. Dieser ist ein klonogener *Ex-vivo*-Koloniebildungsassay, der an der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität Leipzig etabliert und patentiert wurde. Die *Chemoresponse*-Testung von HNSCC gegenüber Zytostatika unter flavinschützenden Bedingungen erfährt durch Mitführen der epithelialen KB-Zelllinie ihre Qualitätskontrolle (Dietz *et al.* 2009). Die *Ex-vivo*-Resultate sollen helfen, Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der Therapeutika *in vivo* zu ziehen. Zum Einsatz kamen dabei in dieser Arbeit Cisplatin und Docetaxel als etablierte Standardtherapeutika in der Therapie der HNSCC sowie Cilengitide als Integrininhibitor (Alghisi *et al.* 2009) und Temozolomid als Inhibitor des mTOR-Signalwegs (Bjornsti *et Houghton* 2004) als in klinischer Testung befindliche Zytostatika.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten stadienabhängig ansteigende Expressionen von MCP-1, IL-8 und VEGF in Patientenseren. Patientenseren von HNSCC größeren Tumorumfanges bzw. fortgeschrittener Invasivität (T4a) wiesen signifikant höhere IL-6-Konzentrationen auf als Tumoren geringeren Volumens bzw. geringerer Invasivität (T3). Zudem unterschied sich die IL-6-Expression der Seren in Abhängigkeit der Tumorumlokalisierung. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese des heterogenen biologischen Verhaltens von HNSCC. Patientenseren fernmetastasierter HNSCC (M1)

wiesen signifikant höhere VEGF-Level auf als Seren nicht fernmetastasierter HNSCC (M0). Diese Resultate bestätigen einen Zusammenhang des erhöhten Metastasierungspotentials von HNSCC bei erhöhten VEGF-Konzentrationen in Patientenserum. In Zusammenschau der Ergebnisse könnten sich MCP-1, IL-6 und IL-8 als Biomarker für Tumorprogress und VEGF zudem als Marker für Fernmetastasierung eignen. Kulturüberstände der Tumoren von Rauchern wiesen signifikant geringere Konzentrationen an MCP-1, IL-6 und IL-8 auf als die der Nichtraucher. Es ist anzunehmen, dass der Tabakrauch lokal zu einer Immunschwäche des Epithels des Aerodigestivtrakts führt und sich daraus das kanzerogene Potential des für HNSCC bekannten Risikofaktors ergibt. Im Vordergrund dieser Arbeit steht die Untersuchung der Inhibition von MCP-1 und der Stimulation durch MCP-1 auf die Koloniebildung und die Zytokinexpression von HNSCC im FLAVINO-Assay. In den Vorversuchen in Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten zeigte sich, dass Zytostatika und MCP-1/ Anti-MCP-1-Antikörper die Zytokinexpression von HNSCC *ex vivo* modulieren. In Kombinationsexperimenten in Zellkulturplatten mit 48 Kavitäten wurden zudem Interaktionsmechanismen zwischen MCP-1/ Anti-MCP-1-Antikörper und den Zytostatika untersucht. Im FLAVINO-Assay supprimierten Cisplatin und MCP-1 die Koloniebildung signifikant, während unter Docetaxel und Temsirolimus eine insignifikante Reduktion und durch Cilengitide eine insignifikante Stimulation der Koloniebildung beobachtet wurde. Die MCP-1-Blockade durch einen Anti-MCP-1-Antikörper führte zu keiner signifikanten Modulation der Koloniebildung. Generell war ein stärkerer Trend zu gesteigerter Effektivität der Cisplatin-, Docetaxel- und Cilengitide-Wirkungen unter MCP-1-Einfluss als unter Einfluss des Anti-MCP-1-Antikörpers zu verzeichnen. Lediglich die Wirksamkeit von Temsirolimus erfuhr unter dem Einfluss des Anti-MCP-1-Antikörpers eine Verstärkung, die diejenige von MCP-1 übertraf. MCP-1 und der Anti-MCP-1-Antikörper senkten die Zytokinexpression, während bis auf Cisplatin alle Zytostatika die Zytokinexpressionen steigerten. Insgesamt war zwar der Trend zu höherer Effektivität der Stimulation mit MCP-1 zu beobachten, dennoch unterschieden sich die Effekte der MCP-1-Stimulation und –Inhibition nicht signifikant voneinander. In der *Chemoresponse*-Testung der Stimulation durch MCP-1 und dessen Blockade in Kombination mit Zytostatika unterschieden sich die HNSCC individuell, sodass additive, synergistische und auch antagonistische Effekte Patienten-spezifisch ermittelt wurden. Insgesamt wurden unter MCP-1 in der Mehrzahl antitumoröse Effekte beobachtet, sodass MCP-1 eine adjuvante Rolle neben etablierten Zytostatika in der Therapie der HNSCC einnehmen könnte. Aber auch die MCP-1-Blockade durch einen Antikörper lieferte Effekte, die die Wirksamkeit der Zytostatika verbesserten. Da sowohl die Stimulation durch MCP-1 als auch dessen Inhibition Wirksamkeit zeigten, ist eine Dosis-kritische duale Wirkung von MCP-1 sehr wahrscheinlich, weswegen in Nachfolgeprojekten die individuelle Bestimmung eines Schwellenwertes für Tumorstimulation oder –protektion durch MCP-1 interessant ist. Außerdem ist anzunehmen,

dass weitere Faktoren die Suszeptibilität des Tumorgewebes gegenüber MCP-1 bestimmen. Vermittler solcher Effekte könnten z.B. tumorassoziierte Makrophagen sein. Aufgrund der großen biologischen Heterogenität der HNSCC ist eine individuelle *Chemoresponse*-Testung empfehlenswert. Daher sollte im individuellen Fall *ex vivo* getestet werden, ob die Therapie durch eine Stimulation durch MCP-1 oder durch eine MCP-1-Inhibition verbessert werden kann. Dazu eignet sich der FLAVINO-Assay (Wichmann *et* Dietz 2011). In Nachfolgeprojekten sollte die Rolle der tumorinfiltrierenden Zellpopulationen und insbesondere der Monozyten und Makrophagen in HNSCC genauer untersucht werden. Dafür wurden mit der hier vorgelegten Dissertation, als Voraussetzung solcher Arbeiten, bereits zentrale Fragen beantwortet und die aufgestellten Thesen bestätigt:

1. Die Untersuchung der Zytokinkonzentrationen in Patientenseren zeigte, dass diese in Abhängigkeit klinisch-epidemiologischer Patientencharakteristika, wie z.B. Stadium nach UICC, Tumorgroße, Lymphknotenbeteiligung und Fernmetastasierung (TNM) sowie der Lokalisation variieren.
2. Die Experimente zur Chemoreaktivität im FLAVINO-Assay bestätigten die These, dass Zytostatika auf die Koloniebildung und die Zytokinexpression der Tumoren *ex vivo* Einfluss nehmen.
3. HNSCC unterscheiden sich bezüglich der Chemoreaktivität und der Zytokinexpression auf individueller Ebene, weswegen die individuelle *Chemoresponse*-Testung als sinnvoll erachtet wird.
4. Die Ergebnisse der Testungen zur Stimulation durch MCP-1 und der Inhibition von MCP-1 durch einen Anti-MCP-1-Antikörper belegten die These, dass diese die Chemoreaktivität der untersuchten Tumoren auf die getesteten Zytostatika im FLAVINO-Assay modulieren.
5. Die Betrachtung der Interaktionsmechanismen der getesteten Zytostatika und MCP-1 bzw. einem Anti-MCP-1-Antikörper lieferte die Bestätigung, dass die Stimulation durch MCP-1 bzw. dessen Blockade auf die Koloniebildung und die Zytokinexpression der untersuchten Plattenepithelkarzinome *ex vivo* im Sinne von Additivität, Synergismus und Antagonismus wirken, wobei es individuelle Unterschiede gibt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass HNSCC ein individuell heterogenes biologisches Verhalten aufweisen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pober, Jordan S. (1996): Immunologie. Bern: Huber.
- Abdollahi, A.; Griggs, D. W.; Zieher, H.; Roth, A.; Lipson, K. E.; Saffrich, R. *et al.* (2005): Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. In: *Clin. Cancer Res* 11 (17), S. 6270–6279. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1223.
- Aggarwal, B. B.; Shishodia, S.; Sandur, S. K.; Pandey, M. K.; Sethi, G. (2006): Inflammation and cancer: How hot is the link? In: *Biochemical Pharmacology* 72 (11), S. 1605–1621. DOI: 10.1016/j.bcp.2006.06.029.
- Aissat, N.; Le Tourneau, C.; Ghoul, A.; Serova, M.; Bieche, I.; Lokiec, F. *et al.* (2008): Antiproliferative effects of rapamycin as a single agent and in combination with carboplatin and paclitaxel in head and neck cancer cell lines. In: *Cancer Chemother Pharmacol.* 62 (2), S. 305-313. [Abstract]
- Alghisi, G. C.; Ponsonnet, L.; Rüegg, C. (2009): The integrin antagonist cilengitide activates alphaVbeta3, disrupts VE-cadherin localization at cell junctions and enhances permeability in endothelial cells. In: *PLoS ONE* 4 (2), S. e4449. DOI: 10.1371/journal.pone.0004449.
- Allen, C.; Duffy, S.; Teknos, T.; Islam, M.; Chen, Z.; Albert, P. S. *et al.* (2007): Nuclear Factor- $\kappa$ B-Related Serum Factors as Longitudinal Biomarkers of Response and Survival in Advanced Oropharyngeal Carcinoma. In: *Clinical Cancer Research* 13 (11), S. 3182–3190. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-3047.
- Ang, K. K.; Sturgis, E. M. (2012): Human Papillomavirus as a Marker of the Natural History and Response to Therapy of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. In: *Seminars in Radiation Oncology* 22 (2), S. 128–142. DOI: 10.1016/j.semradonc.2011.12.004.
- Bauman, J. E.; Arias-Pulido, H.; Lee, S.-J.; Fekrazad, M. H.; Ozawa, H.; Fertig, E. *et al.* (2013): A phase II study of temsirolimus and erlotinib in patients with recurrent and/or metastatic, platinum-refractory head and neck squamous cell carcinoma. In: *Oral Oncol* 49 (5), S. 461–467. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2012.12.016.
- Bektas-Kayhan, K.; Unur, M.; Boy-Metin, Z.; Cakmakoglu, B. (2012): MCP-1 and CCR2 gene variants in oral squamous cell carcinoma. In: *Oral Diseases* 18 (1), S. 55–59. DOI: 10.1111/j.1601-0825.2011.01843.x. [Abstract]
- Bertz, Joachim (2010): Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010; eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI. Berlin: Robert-Koch-Inst (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes). ISBN: 9783896062086.
- Bissett, D.; Setanoians, A.; Cassidy, J.; Graham, M. A.; Chadwick, G. A.; Wilson, P. *et al.* (1993): Phase I and pharmacokinetic study of taxotere (RP 56976) administered as a 24-hour infusion. In: *Cancer Res* 53 (3), S. 523–527.
- Bjornsti, M.-A.; Houghton, P. J. (2004): The TOR pathway: a target for cancer therapy. In: *Nat. Rev. Cancer* 4 (5), S. 335–348. DOI: 10.1038/nrc1362.
- Boehm, A. L.; Sen, M.; Seethala, R.; Gooding, W. E.; Freilino, M.; Wong, S. M. Y. *et al.* (2008): Combined Targeting of Epidermal Growth Factor Receptor, Signal Transducer and Activator of Transcription-3, and Bcl-XL Enhances Antitumor Effects in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. In: *Molecular Pharmacology* 73 (6), S. 1632–1642. DOI: 10.1124/mol.107.044636.
- Boenninghaus, H.-G.; Lenarz, T. (2007): Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 13. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg (Springer-Lehrbuch). ISBN: 9783540487210.

- Bootz, F.; Howaldt, H.-P. (2008): B1 Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes. In: A. Glöggler (Hg.): Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2008. Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen ; [Update]. Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes. [6. Aufl.]. München: Zuckschwerdt, S. 1–12. Online verfügbar unter [http://www.krebsgesellschaft.de/download/ll\\_b\\_01.pdf](http://www.krebsgesellschaft.de/download/ll_b_01.pdf), zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- Burgis, E. (2008): Intensivkurs Allgemeine und Spezielle Pharmakologie. 4. Aufl. s.l: Urban Fischer Verlag - Lehrbücher. ISBN: 9783437426131.
- Calabrese, E. J.; Nascarella, M. A. (2010): Tumor resistance explained by hormesis. In: *Dose Response* 8 (1), S. 80–82. DOI: 10.2203/dose-response.09-063.Calabrese.
- Califano, J.; van der Riet, P.; Westra, W.; Nawroz, H.; Clayman, G.; Piantadosi, S. *et al.* (1996): Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. In: *Cancer Res* 56 (11), S. 2488–2492. [Abstract]
- Callard, R. E.; Gearing, A. J. H. (1994): The cytokine factsbook. London: Acad. Press (FactsBook series). ISBN: 0121551431.
- Carmeliet, P. (2003): Angiogenesis in health and disease. In: *Nat Med* 9 (6), S. 653–660. DOI: 10.1038/nm0603-653.
- Carvalho, T. G. de; Carvalho, A. C. de; Maia, D. C. C.; Ogawa, J. K.; Carvalho, A. L.; Vettore, A. L. (2013): Search for mutations in signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Oncol Rep* 30 (1), S. 334–340. DOI: 10.3892/or.2013.2455.
- Chen, H.; Cowan, M. J.; Hasday, J. D.; Vogel, S. N.; Medvedev, A. E. (2007): Tobacco smoking inhibits expression of proinflammatory cytokines and activation of IL-1R-associated kinase, p38, and NF-kappaB in alveolar macrophages stimulated with TLR2 and TLR4 agonists. In: *J. Immunol* 179 (9), S. 6097–6106.
- Chen, M.-K.; Yeh, K.-T.; Chiou, H.-L.; Lin, C.-W.; Chung, T.-T.; Yang, S.-F. (2011): CCR2-64I gene polymorphism increase susceptibility to oral cancer. In: *Oral Oncol* 47 (7), S. 577–582. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2011.04.008. [Abstract]
- Chen, Z.; Malhotra, P. S.; Thomas, G. R.; Ondrey, F. G.; Duffey, D. C.; Smith, C. W. *et al.* (1999): Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. In: *Clin. Cancer Res* 5 (6), S. 1369–1379.
- Chung, A. S.; Ferrara, N. (2010): The Extracellular Matrix & Angiogenesis. In *SABiosciences Pathways Magazine* (11). Online verfügbar unter <http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/pathways11/extracellular-matrix-and-angiogenesis.php>, zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- ClinicalTrials.gov (2013): Efficacy Study of Temsirolimus to Treat Head and Neck Cancer (TEMHEAD). NCT01172769. Hg. v. A service of the U.S National Institutes of Health ClinicalTrials.gov. Online verfügbar unter <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01172769>, zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- Cynis, H.; Hoffmann, T.; Friedrich, D.; Kehlen, A.; Gans, K.; Kleinschmidt, M. *et al.* (2011): The isoenzyme of glutaminyl cyclase is an important regulator of monocyte infiltration under inflammatory conditions. In: *EMBO Mol Med* 3 (9), S. 545–558. DOI: 10.1002/emmm.201100158.
- Darland, D. C.; D'Amore, P. A. (1999): Blood vessel maturation: vascular development comes of age. In: *J. Clin. Invest* 103 (2), S. 157–158. DOI: 10.1172/JCI6127.
- David Dong, Z. M.; Aplin, A. C.; Nicosia, R. F. (2009): Regulation of angiogenesis by macrophages, dendritic cells, and circulating myelomonocytic cells. In: *Curr. Pharm. Des* 15 (4), S. 365–379. [Abstract]
- Del Bufalo, D.; Ciuffreda, L.; Trisciuglio, D. (2006): Antiangiogenic Potential of the Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Temsirolimus. In: *Cancer Research* 66 (11), S. 5549–5554. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2825.

- Denaro, N.; Lo Nigro, C.; Natoli, G.; Russi, E. G.; Adamo, V.; Merlano, M. C. (2011): The Role of p53 and MDM2 in Head and Neck Cancer. In: *ISRN Otolaryngology* 2011 (3), S. 1–8. DOI: 10.5402/2011/931813.
- Desgrosellier, J. S.; Cheresch, D. A. (2010): Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. In: *Nat Rev Cancer* 10 (1), S. 9–22. DOI: 10.1038/nrc2748. [Abstract]
- Desoize, B.; Berthiot, G.; Manot, L.; Coninx, P.; Dumont, P. (1996): Evaluation of a prediction model of cisplatin dose based on total platinum plasma concentration. In: *Eur. J. Cancer* 32A (10), S. 1734–1738.
- Dietz, A.; Flentje, M. (2010): Kopf-Hals-Tumoren. Therapie des Larynx-/ Hypopharynx-karzinoms unter besonderer Berücksichtigung des Larynxorganerhalts. Bremen [u.a.]: UNI-MED. ISBN: 9783837421422.
- Dietz, A.; Tschöp, K.; Wichmann, G.; Granzow, C. (2009): Method and kit for the ex vivo evaluation of the response of a tumor to conditions to be tested. Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 2009/124997 A1.
- Dietz, A.; Wichmann, G. (2011): Head and neck cancer: effective prevention in youth and predictive diagnostics for personalised treatment strategies according to biological differences. In: *EPMA J* 2 (2), S. 241–249. DOI: 10.1007/s13167-011-0082-1. [Abstract]
- Domingo-Domenech, J.; Oliva, C.; Rovira, A.; Codony-Servat, J.; Bosch, M.; Filella, X. *et al.* (2006): Interleukin 6, a Nuclear Factor- $\kappa$ B Target, Predicts Resistance to Docetaxel in Hormone-Independent Prostate Cancer and Nuclear Factor- $\kappa$ B Inhibition by PS-1145 Enhances Docetaxel Antitumor Activity. In: *Clinical Cancer Research* 12 (18), S. 5578–5586. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2767.
- Dreves, J. (Hg.) (2010): Tumorangiogenese - Grundlagen und therapeutische Ansätze. 3. Aufl. Bremen - London - Boston: Uni-Med Verlag AG. ISBN: 9783837421385.
- ECOG-ACRIN cancer research group (2013). Online verfügbar unter <http://ecog-acrin.org/active-clinical-trials/e1305-head-neck-cancer>, zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- Eheman, C.; Henley, S. J.; Ballard-Barbash, J.; Jacobs, E. J.; Schymura, M. J.; Noone, A.-M. *et al.* (2012): Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2008, Featuring Cancers Associated With Excess Weight and Lack of Sufficient Physical Activity. In: *Cancer* 118 (9). S. 2338–2366. DOI: 10.1002/cncr.27514.
- Fabricius, E. M.; Wildner G. P.; Kruse-Boitschenko, U.; Hoffmeister, B.; Goodman, S. L.; Raguse, J. D. (2011): Immunohistochemical analysis of integrins  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$  and  $\alpha 5\beta 1$ , and their ligands, fibrinogen, fibronectin, osteopontin and vitronectin, in frozen sections of human oral head and neck squamous cell carcinomas. In: *Exp Ther Med.* 2 (1), S. 9-19. DOI: 10.3892/etm.2010.171
- Fujita, K.; Sano, D.; Kimura, M.; Yamashita, Y.; Kawakami, M.; Ishiguro, Y. *et al.* (2007): Anti-tumor effects of bevacizumab in combination with paclitaxel on head and neck squamous cell carcinoma. In: *Oncol. Rep* 18 (1), S. 47–51.
- Gallo, M.; Luca, A. de; Lamura, L.; Normanno, N. (2012): Zoledronic acid blocks the interaction between mesenchymal stem cells and breast cancer cells: implications for adjuvant therapy of breast cancer. In: *Annals of Oncology* 23 (3), S. 597–604. DOI: 10.1093/annonc/mdr159.
- Gibbons, J. (2010): Angiogenesis: Emerging Roles for the TGF-beta Superfamily. Pathways (11). Online verfügbar unter <http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/pathways11/angiogenesis.php>, zuletzt geprüft am 21.12.2013.

- Gómez-Ruiz, S.; Maksimović-Ivanić, D.; Mijatović, S.; Kaluđerović, G. N. (2012): On the Discovery, Biological Effects, and Use of Cisplatin and Metallocenes in Anticancer Chemotherapy. In: *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2012 (5), S. 1–14. DOI: 10.1155/2012/140284.
- Goodman, S. L.; Hölzemann, G.; Sulyok, G. A. G.; Kessler, H. (2002): Nanomolar small molecule inhibitors for alphav(beta)6, alphav(beta)5, and alphav(beta)3 integrins. In: *J. Med. Chem* 45 (5), S. 1045–1051. [Abstract]
- Grünwald, V.; Keilholz, U.; Boehm, A.; Guntinas-Lichius, O.; Hennemann, B.; Schmoll, H. J. *et al.* (2012): Temsirolimus is active in refractory squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) failing platinum-based chemotherapy and cetuximab: efficacy and toxicity data from the phase II TEMHEAD STUDY. Hg. v. ESMO. Online verfügbar unter <http://oncologypro.esmo.org/Meeting-Resources/ESMO-2012/Temsirolimus-is-active-in-refractory-squamous-cell-carcinoma-of-the-head-and-neck-SCCHN-failing-platinum-based-chemotherapy-and-cetuximab-efficacy-and-toxicity-data-from-the-phase-II-TEMHEAD-study>, zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- Guntinas-Lichius, O.; Wendt, T.; Buentzel, J.; Esser, D.; Lochner, P.; Mueller, A. *et al.* (2010): Head and neck cancer in Germany: a site-specific analysis of survival of the Thuringian cancer registration database. In: *J. Cancer Res. Clin. Oncol* 136 (1), S. 55–63. DOI: 10.1007/s00432-009-0636-y. [Abstract]
- Haddad, R.; Tishler, R. B.; Norris, C. M.; Mahadevan, A.; Busse, P.; Wirth, L. *et al.* (2003): Docetaxel, cisplatin, 5-fluorouracil (TPF)-based induction chemotherapy for head and neck cancer and the case for sequential, combined-modality treatment. In: *Oncologist* 8 (1), S. 35–44.
- Hariharan, S.; Gustafson, D.; Holden, S.; McConkey, D.; Davis, D.; Morrow, M. *et al.* (2007): Assessment of the biological and pharmacological effects of the  $\alpha_v\beta_3$  integrin and  $\alpha_v\beta_5$  integrin receptor antagonist, cilengitide (EMD 121974), in patients with advanced solid tumors. In: *Annals of Oncology* 18 (8), S. 1400–1407. DOI: 10.1093/annonc/mdm140.
- Hasegawa, Y.; Tang, D.; Takahashi, N.; Hayashizaki, Y.; Forrest A. R. R. (2014): CCL2 enhances pluripotency of human induced pluripotent stem cells by activating hypoxia related genes. In: *Sci Rep.* 4:5228. DOI: 10.1038/srep05228.
- Hayashida, K.; Nanki, T.; Girschick, H.; Yavuz, S.; Ochi, T.; Lipsky, P. E. (2001): Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. In: *Arthritis Res.* 3 (2), S. 118–126.
- Heimdal, J.-H.; Olsnes, C.; Olofsson, J.; Aarstad, H. J. (2001): Monocyte and monocyte-derived macrophage secretion of MCP-1 in co-culture with autologous malignant and benign control fragment spheroids. In: *Cancer Immunol Immunother* 50, S. 300–306.
- Huang, S.; Mills, L.; Mian, B.; Tellez, C.; McCarty, M.; Yang, X.-D. *et al.* (2002): Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. In: *Am. J. Pathol* 161 (1), S. 125–134. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64164-8.
- Hudes, G.; Carducci, M.; Tomczak, P.; Dutcher, J.; Figlin, R.; Kapoor, A. *et al.* (2007): Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. In: *N. Engl. J. Med* 356 (22), S. 2271–2281. DOI: 10.1056/NEJMoa066838.
- Ji, W.-T.; Chen, H.-R.; Lin, C.-H.; Lee, J.-W.; Lee, C.-C. (2014): Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1) Modulates Pro-Survival Signaling to Promote Progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 9(2): e88952. DOI:10.1371/journal.pone.0088952.
- Jiang, Y.; Beller, D. I.; Frendl, G.; Graves, D. T. (1992): Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. In: *J. Immunol* 148 (8), S. 2423–2428. [Abstract]

- Jin, Z.-J (2004): About the evaluation of drug combination. In: *Acta Pharmacologica Sinica* 25 (2), S. 146–147.
- Johnson, L. A.; Jackson, D. G. (2013): The chemokine CX3CL1 promotes trafficking of dendritic cells through inflamed lymphatics. In: *J. Cell. Sci.* 126 (22). S. 5259-5270. DOI: 10.1242/jcs.135343.
- Kalyankrishna, S.; Grandis, J. R. (2006): Epidermal Growth Factor Receptor Biology in Head and Neck Cancer. In: *Journal of Clinical Oncology* 24 (17), S. 2666–2672. DOI: 10.1200/JCO.2005.04.8306.
- Karin, M. (2009): NF- $\kappa$ B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* (5). S. 1-14. DOI: 10.1101/cshperspect.a000141.
- Kartalou, M.; Essigmann, J. M. (2001): Mechanisms of resistance to cisplatin. In: *Mutat. Res* 478 (1-2), S. 23–43. [Abstract]
- Kirchner, H.; Kruse, A.; Neustock, P.; Rink, L. (1994): Cytokine und Interferone. Botenstoffe des Immunsystems. 1. korrigierter Nachdr. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. ISBN: 3860251082.
- Koch, A. E.; Kunkel, S. L.; Harlow, L. A.; Johnson, B.; Evanoff, H. L.; Haines, G. K. *et al.* (1992a): Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. In: *J. Clin. Invest* 90 (3), S. 772–779. DOI: 10.1172/JCI115950.
- Koch, A. E.; Polverini, P. J.; Kunkel, S. L.; Harlow, L. A.; Di Pietro, L. A.; Elnor, V. M. *et al.* (1992b): Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. In: *Science* 258 (5089), S. 1798–1801. [Abstract]
- Koide, N.; Nishio, A.; Sato, T. I.; Sugiyama, A.; Miyagawa, S.-I. (2004): Significance of Macrophage Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Infiltration in Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus. In: *Am J Gastroenterology* 99 (9), S. 1667–1674. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2004.30733.x.
- Körner, C.; Boehm, A.; Reiche, A.; Dietz, A.; Kehlen, A.; Hoffmann, T. *et al.*: CCL2 in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region: Belege für seine Beteiligung in der Tumorgenese? 83. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Mainz 16.-20.05.2012, Doc12hnod254. Online verfügbar unter <http://www.egms.de/static/de/meetings/hnod2012/12hnod254.shtml>, zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- Körner, C.; Meilke, L.; Dietz, A.; Reiche, A.; Herrmann, K.; Aust, W. *et al.* (2011): Zytokinexpressionsmuster in Serien von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region. 1. Workshop zur experimentellen und klinischen Forschung in der Kopf-Hals-Onkologie der Klinik und Poliklinik für HNO-Heilkunde am Universitätsklinikum Leipzig AöR unter Mitwirkung der Arbeitsgemeinschaft Onkologie der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie 11. – 12. Februar 2011, Leipzig.
- Körner, C.; Wichmann, G.; Boehm, A.; Reiche, A.; Kehlen, A.; Hoffmann, T. *et al.* (2012): Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in head and neck squamous cell carcinoma: evidence for its involvement in tumorigenic processes? // Abstracts for the 5th European Conference on Head and Neck Oncology 18–21 April 2012 in Poznan, Poland. In: *Eur Arch Otorhinolaryngol* 269 (4), S. 1368 // 1311–1410. Online verfügbar unter <http://link.springer.com/article/10.1007/s00405-012-1960-4>, zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- Kross, K. W.; Heimdal, J.-H.; Olsnes, C.; Olofsson, J.; Aarstad, H. J. (2005): Head and neck squamous cell carcinoma spheroid- and monocyte spheroid-stimulated IL-6 and monocyte chemotactic protein-1 secretion are related to TNM stage, inflammatory state and tumor macrophage density. In: *Acta Otolaryngol* 125 (10), S. 1097–1104. DOI: 10.1080/00016480510038031.

- Kunicka, Z.; Mucha, I.; Fajkus, J. (2008): Telomerase activity in head and neck cancer. In: *Anticancer Research* 28, S. 3125–3130. Online verfügbar unter <http://ar.iijournals.org/content/28/5B/3125.full.pdf>, zuletzt geprüft am 21.12.2013
- Kyzas, P. A.; Cunha, I. W.; Ioannidis, J. P. A. (2005): Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. In: *Clin. Cancer Res* 11 (4), S. 1434–1440. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1870.
- Laborpartnerschaft Scholz, S.; Grimmer, U.; Hummel, H.; Schmieder, J. (Hg.) (2005): Laborleistungsverzeichnis. Labormedizinische Partnerschaft. Chemnitz: Druckerei Schulze.
- Li, X.; Loberg, R.; Liao, J.; Ying, C.; Snyder, L. A.; Pienta, K. J.; McCauley, L. K. (2009): A Destructive Cascade Mediated by CCL2 Facilitates Prostate Cancer Growth in Bone. In: *Cancer Research* 69 (4), S. 1685–1692. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2164.
- Loetscher, P.; Dewald, B.; Baggiolini, M.; Seitz, M. (1994): Monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin 8 production by rheumatoid synoviocytes. Effects of anti-rheumatic drugs. In: *Cytokine* 6 (2), S. 162–170. DOI: 10.1016/1043-4666(94)90038-8. [Abstract]
- Lu, X.; Qian, C.-N.; Mu, Y.-G.; Li, N.-W. I.; Li, S.; Zhang, H.-B. *et al.* (2011): Serum CCL2 and serum TNF- $\alpha$  - two new biomarkers predict bone invasion, post-treatment distant metastasis and poor overall survival in nasopharyngeal carcinoma. In: *Eur. J. Cancer* 47 (3), S. 339–346. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.09.025.
- Lu, Y.; Cai, Z.; Xiao, G.; Keller, E. T.; Mizokami, A.; Yao, Z. *et al.* (2007): Monocyte Chemotactic Protein-1 Mediates Prostate Cancer-Induced Bone Resorption. In: *Cancer Research* 67 (8), S. 3646–3653. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1210.
- Lück, B.; Reiche, A.; Boehm, A.; Dietz, A.; Herrmann, K.; Wichmann, G.: Temsirolimus suppresses colony formation of head and neck squamous cell carcinoma epithelial cells. 82. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Freiburg i. Br. 01.-05.06.2011. Doc11hnod211. Online verfügbar unter <http://www.egms.de/static/de/meetings/hnod2011/11hnod211.shtml>, zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- Lukacs, N. W.; Strieter, R. M.; Elner, V.; Evanoff, H. L.; Burdick, M. D.; Kunkel, S. L. (1995): Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. In: *Blood* 86 (7), S. 2767–2773.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006): Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 2., komplett überarb. Stuttgart: Thieme. ISBN: 3131292423.
- Mann, E. A.; Spiro, J. D.; Chen L. L.; Kreutzer, D. L. (1992): Cytokine Expression by Head and Neck Spquamous Cell Carcinomas. In: *The American Journal of Surgery* 164, S. 567–573.
- Manna, S. K.; Ramesh, G. T. (2005): Interleukin-8 induces nuclear transcription factor-kappaB through a TRAF6-dependent pathway. In: *J. Biol. Chem* 280 (8), S. 7010–7021. DOI: 10.1074/jbc.M410994200.
- Manome, Y.; Wen, P. Y.; Hershowitz, A.; Tanaka, T.; Rollins, B. J.; Kufe, D. W.; Fine, H. A. (1995): Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene transduction: an effective tumor vaccine strategy for non-intracranial tumors. In: *Cancer Immunol. Immunother* 41 (4), S. 227–235. [Abstract]
- Masters, J. R. W. (2000): Human cancer cell lines: fact and fantasy. In: *Nature Rev Mol Cell Biol* 1, S. 233–236.
- Masuda, M.; Ruan, H.-Y.; Ito, A.; Nakashima, T.; Toh, S.; Wakasaki, T. *et al.* (2007): Signal transducers and activators of transcription 3 up-regulates vascular endothelial growth factor production and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Oral Oncology* 43 (8), S. 785–790. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2006.10.007.

- Mattson, M. P. (2008): Hormesis defined. In: *Ageing Res. Rev* 7 (1), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.arr.2007.08.007.
- Maxwell, P. J.; Gallagher, R.; Seaton, A.; Wilson, C.; Scullin, P.; Pettigrew, J. *et al.* (2007): HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. In: *Oncogene* 26 (52), S. 7333–7345. DOI: 10.1038/sj.onc.1210536.
- McLoughlin, R. M.; Hurst, S. M.; Nowell M. A.; Harris, D. A.; Horiuchi, S.; Morgan, L. W. *et al.* (2004): Differential Regulation of Neutrophil-Activating Chemokines by IL-6 and Its Soluble Receptor Isoforms. In: *J Immunol* (172), S. 5676–5683.
- Mosmann, T. (1983): Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. In: *J Immunol Methods* (65), S. 55–63.
- Murphy, K. M.; Travers, P.; Walport, M.; Janeway, C. A.; Seidler, L.; Ehrenstein, M. (2009): Janeway immunologie. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. ISBN: 3827420474.
- Nagasaki, T.; Hara, M.; Nakanishi, H.; Takahashi, H.; Sato, M.; Takeyama, H. (2014): Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour–stroma interaction. In *Br J Cancer* 110 (2), S. 469–478.
- National Cancer Institute (2013): Head and Neck Cancers. Online verfügbar unter: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/head-and-neck>, zuletzt geprüft am 23.02.2014
- NCBI (2013a): HeLa Cells. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68006367>, zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- NCBI (2013b): KB Cells. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=kb+cell>, zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- Negus, R.; Stamp, G.; Relf, M.; Burke, F.; Malik, S.; Bernasconi, S. *et al.* (1995): The Detection and Localization of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Human Ovarian Cancer. In: *J. Clin. Invest.* 95, S. 2391–2396.
- Nesbit, M.; Schaidt, H.; Miller, T. H.; Herlyn, M. (2001): Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. In: *J. Immunol.* 166 (11), S. 6483–6490.
- Nguyen, S. A.; Walker, D.; Gillespie, M. B.; Gutkind, J. S.; Day, T. A. (2012): mTOR inhibitors and its role in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. In: *Curr Treat Options Oncol.* 13 (1), S. 71–81. DOI: 10.1007/s11864-011-0180-2.
- Nicola, N. A. (1997): Guidebook to cytokines and their receptors. Reprinted. Oxford: Oxford Univ. Press (A Sambrook and Tooze publication). ISBN: 0198599463.
- Niu, J.; Azfer, A.; Zhelyabovska, O.; Fatma, S.; Kolattukudy, P. E. (2008): Monocyte Chemotactic Protein (MCP)-1 Promotes Angiogenesis via a Novel Transcription Factor, MCP-1-induced Protein (MCPIP). In: *Journal of Biological Chemistry* 283 (21), S. 14542–14551. DOI: 10.1074/jbc.M802139200.
- Oldenhuis, C.N.A.M.; Oosting, S.F.; Gietema, J.A.; de Vries, E.G.E. (2008): Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. In: *Eur J Cancer* 44 (7), S. 946–53. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.03.006. [Abstract]
- Parenti, A.; Bellik, L.; Brogelli, L.; Filippi, S.; Ledda, F. (2004): Endogenous VEGF-A is responsible for mitogenic effects of MCP-1 on vascular smooth muscle cells. In: *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 286 (5), S. H1978–H1984. DOI: 10.1152/ajpheart.00414.2003.
- Pries, R.; Wollenberg, B. (2006): Cytokines in head and neck cancer. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 17 (3), S. 141–146. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2006.02.001.

- Psyrrri, A.; Seiwert, T. Y.; Jimeno, A. (2013): Molecular pathways in head and neck cancer. In: *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, S. 246–255. DOI: 10.1200/EdBook\_AM.2013.33.246
- Pugh, C. W.; Ratcliffe, P. J. (2003): Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. In: *Nat. Med* 9 (6), S. 677–684. DOI: 10.1038/nm0603-677.
- Qian, D. Z.; Rademacher, B. L.S; Pittsenbarger, J.; Huang, C.-Y; Myrthue, A.; Higano, C. S. *et al.* (2009): CCL2 is induced by chemotherapy and protects prostate cancer cells from docetaxel-induced cytotoxicity. In: *Prostate* 70 (4), S. 334-442. DOI: 10.1002/pros.21077.
- Ramroth, H.; Dietz, A.; Becher, H. (2004): Interaction Effects and Population-attributable Risks for Smoking and Alcohol on Laryngeal Cancer and Its Subsites. A Case-control Study from Germany. In: *Methods Inf Med* 43 (5), S. 499–504.
- Reardon, D. A.; Cheresch, D. (2012): Cilengitide: A Prototypic Integrin Inhibitor for the Treatment of Glioblastoma and Other Malignancies. In: *Genes & Cancer* 2 (12), S. 1159–1165. DOI: 10.1177/1947601912450586.
- Reynolds, A. R.; Hart, I. R.; Watson, A. R.; Welti, J. C.; Silva, R. G.; Robinson, S. D. *et al.* (2009): Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. In: *Nat. Med* 15 (4), S. 392–400. DOI: 10.1038/nm.1941.
- Riedel, F.; Götte, K.; Schwalb, J.; Wirtz, H.; Bergler, W.; Hörmann, K. (2000): Serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with head and neck cancer. In: *Eur Arch Otorhinolaryngol* 257 (6), S. 332–336. [Abstract]
- Robert-Koch-Institut (Hg.) (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Aufl. Berlin. ISBN: 9783896062147.
- Rodriguez-Frade, J. M.; Mellada, M.; Martinez-A., C. (2000): CCR2. Online verfügbar unter <http://reslib.com/book/CCR2>, DOI: 10.1006/rwcy.2000.22002. zuletzt geprüft am 04.06.2012.
- Rollins, B. J. (1997): Chemokines. In: *Blood* 90 (3), S. 909–928.
- Rollins, B. J.; Sunday, M. E. (1991): Suppression of tumor formation in vivo by expression of the JE gene in malignant cells. In: *Mol. Cell. Biol* 11 (6), S. 3125–3131.
- Rousseau, A.; Badoual, C.: Head and Neck: Squamous cell carcinoma: an overview. In: *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. September 2011. Online verfügbar unter: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Tumors/HeadNeckSCCID5090.html>, zuletzt geprüft am 23.02.2014
- Salcedo, R.; Ponce, M. L.; Young, H. A.; Wasserman, K.; Ward, J. M.; Kleinman, H. K. *et al.* (2000): Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. In: *Blood* 96 (1), S. 34–40.
- Sanofi-Aventis (2010). Online verfügbar unter <http://products.sanofi.us/Taxotere/taxotere.pdf>, zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- Sansone, P.; Bromberg, J. (2012): Targeting the Interleukin-6/Jak/Stat Pathway in Human Malignancies. In: *Journal of Clinical Oncology* 30 (9), S. 1005–1014. DOI: 10.1200/JCO.2010.31.8907.
- Scheller, J.; Ohnesorge, N.; Rose-John, S. (2006): Interleukin-6 Trans-Signalling in Chronic Inflammation and Cancer. In: *Scand J Immunol* 63 (5), S. 321–329. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2006.01750.x.
- Schrimpf, G. (2013): Pressemitteilung. Online verfügbar unter [http://news.merck.de/N/0/C47977D13865FCB9C1257B1D001EF9CA/\\$File/CENTRIC-Deu.pdf](http://news.merck.de/N/0/C47977D13865FCB9C1257B1D001EF9CA/$File/CENTRIC-Deu.pdf), zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- Seiwert, T. Y.; Cohen, E. E. W. (2005): State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. In: *Br. J. Cancer* 92 (8), S. 1341–1348. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602510.

- Strauss, L.; Volland, D.; Guerrero, A.; Reichert, T. (2005): Tumorangiogenese und Immunsuppression. In: *Mund Kiefer GesichtsChir* 9 (5), S. 273–281. DOI: 10.1007/s10006-005-0635-3.
- Stupp, R.; Hegi, M. E.; Neyns, B.; Goldbrunner, R.; Schlegel, U.; Clement, P. M. J. *et al.* (2010): Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. In: *J. Clin. Oncol* 28 (16), S. 2712–2718. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.6650.
- Tawara, K.; Oxford, J. T.; Jorcyk, C. L. (2011): Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone: potential of anti-IL-6 therapies. In: *Cancer Manag Res* 3, S. 177–189. DOI: 10.2147/CMR.S18101.
- Ueno, T.; Toi, M.; Saji, H.; Muta, M.; Bando, H.; Kuroi, K. *et al.* (2000): Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. In: *Clin. Cancer Res* 6 (8), S. 3282–3289.
- Varney, M. L.; Olsen, K. J.; Mosley, R. L.; Bucana, C. D.; Talmadge, J. E.; Singh, R. K. (2002): Monocyte/macrophage recruitment, activation and differentiation modulate interleukin-8 production: a paracrine role of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis. In: *In Vivo* 16 (6), S. 471–477. [Abstract]
- Vermorken, J. B.; Guigay, J.; Mesia, R.; Trigo, J. M.; Keilholz, U.; Kerber, A. *et al.* (2011): Phase I/II trial of cilengitide with cetuximab, cisplatin and 5-fluorouracil in recurrent and/or metastatic squamous cell cancer of the head and neck: findings of the phase I part. In: *Br. J. Cancer* 104 (11), S. 1691–1696. DOI: 10.1038/bjc.2011.152.
- Vermorken, J. B.; Mesia, R.; Rivera, F.; Remenar, E.; Kawecki, A.; Rottey, S. *et al.* (2008): Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. In: *N. Engl. J. Med* 359 (11), S. 1116–1127. DOI: 10.1056/NEJMoa0802656.
- Vermorken, J. B.; Peyrade, F.; Krauss, J.; Mesia, R.; Remenar, E.; Gauler, T. C. *et al.* (2012): Cilengitide with cetuximab, cisplatin, and 5-FU in recurrent and/or metastatic squamous cell cancer of the head and neck: The ADVANTAGE phase II trial. In: *J Clin Oncol* 30, 2012 (suppl; abstr 5516<sup>^</sup>). Online verfügbar unter: <http://meetinglibrary.asco.org/content/95031-114>, zuletzt geprüft am 08.02.2014
- Wang, X.; Pavelic, Z. P.; Li, Y. Q.; Wang, L.; Gleich, L.; Radack, K. *et al.* (1995): Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Clin. Mol. Pathol* 48 (5), S. M256-9.
- Weis, S. M.; Cheresh, D. A. (2011):  $\alpha$ v Integrins in Angiogenesis and Cancer. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1 (1), S. a006478. DOI: 10.1101/cshperspect.a006478.
- Wichmann, G.; Körner, C.; Dietz, A. (2011a): Ex-vivo-Chemosensitesting von Kopf-Hals-Tumoren: Ein alter Hut? In: *Laryngo-Rhino-Otol* 90 (08), S. 464–468. DOI: 10.1055/s-0031-1283137.
- Wichmann, G.; Daegelmann, C.; Herbarth, O.; Strauch, G.; Schirmer, K.; Wöstemeyer, J.; Lehmann, I. (2004): Inflammatory activity in river-water samples. In: *Environ. Toxicol* 19 (6), S. 594–602. DOI: 10.1002/tox.20067.
- Wichmann, G.; Dietz, A. (2011): Pharmakologische Charakterisierung von Kopf-Hals-Tumoren in Ex-vivo-Tests. In: *HNO* 59 (9), S. 866–873. DOI: 10.1007/s00106-011-2362-4.
- Wichmann, G.; Horn, I.-S.; Boehm, A.; Mozet, C.; Tschöp, K.; Dollner, R.; Dietz, A. (2009): Single Tissue Samples from Head and Neck Squamous Cell Carcinomas are Representative Regarding the Entire Tumor's Chemosensitivity to Cisplatin and Docetaxel. In: *Onkologie* 32 (5), S. 264-272. DOI: 10.1159/000209148.

- Wichmann, G.; Körner, C.; Meilke, L.; Dietz, A.; Reiche, A.; Herrmann, K. *et al.* (2011b): Cytokine expression patterns in sera of head and neck squamous cell carcinoma patients. 82. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Freiburg i. Br. 01.-05.06. Doc11hnod276. Online verfügbar unter <http://www.egms.de/static/de/meetings/hnod2011/11hnod276.shtml>, zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- Wolf, J. S.; Chen, Z.; Dong, G.; Sunwoo, J. B.; Bancroft, C. C.; Capo, D. E. *et al.* (2001): IL (interleukin)-1alpha promotes nuclear factor-kappaB and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas. In: *Clin. Cancer Res* 7 (6), S. 1812–1820.
- Wolf, M. J.; Hoos, A.; Bauer, J.; Boettcher, S.; Knust, M.; Weber, A. *et al.* (2012): Endothelial CCR2 Signaling Induced by Colon Carcinoma Cells Enables Extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK Pathway. In: *Cancer Cell* 22 (1), S. 91–105. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.05.023.
- Wyeth Pharmaceuticals Inc. (2012). Online verfügbar unter <http://labeling.pfizer.com/showlabeling.aspx?id=490>, zuletzt geprüft am 21.12.2013.
- Yavrouian, E. J.; Sinha, U. K. (2012): Recent Advances in Biomarkers and Potential Targeted Therapies in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. In: *ISRN Surgery* 2012, S. 1–7. DOI: 10.5402/2012/715743.
- Yoo, G. H.; Piechocki, M. P.; Ensley, J. F.; Nguyen, T.; Oliver, J.; Meng, H. *et al.* (2002): Docetaxel induced gene expression patterns in head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarray and PowerBlot. In: *Clin. Cancer Res* 8 (12), S. 3910–3921.
- Zernecke, A.; Weber, C. (2010): Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. In: *Cardiovascular Research* 86 (2), S. 192–201. DOI: 10.1093/cvr/cvp391.
- Zhu, Y. M.; Webster, S. J.; Flower, D.; Woll, P. J. (2004): Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. In: *Br. J. Cancer* 91 (11), S. 1970–1976. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602227.

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen	Seite
<b>Abb. 1:</b> Verteilung der primären Lokalisationen der untersuchten Tumoren	19
<b>Abb. 2:</b> Verteilung der Tumorstadien nach UICC	19
<b>Abb. 3:</b> Der experimentelle Aufbau der Arbeit beinhaltet die <i>Chemoresponse</i> -Testung von HNSCC <i>ex vivo</i> unter den Bedingungen des FLAVINO-Assays. Dieser erfährt durch den KB-Zell-Kontrolltest seine Qualitätskontrolle. Zytokine in Seren und Kulturüberständen wurden über ELISA quantifiziert.	24
<b>Abb. 4:</b> Lichtmikroskopische Darstellung frei flottierender Zellen und eines Zellkonglomerats nach Kollagenase-Verdau, 200-fache Vergrößerung	28
<b>Abb. 5:</b> Lichtmikroskopische Darstellung frei flottierender Zellen und eines Zellkonglomerats nach Kollagenase-Verdau, 400-fache Vergrößerung	28
<b>Abb. 6:</b> Lichtmikroskopischer Nachweis fixierter Zellkolonien nach 72-stündiger Kultur. Die exakte Differenzierung zwischen epithelialen Zellen und Stromazellen wird erst in der Fluoreszenzfärbung möglich. 200-fache Vergrößerung, Pat.-Nr. 43	31
<b>Abb. 7:</b> Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis epithelialer Kolonien nach 72-stündiger Kultur in 200-facher Vergrößerung, Pat.-Nr. 43	31
<b>Abb. 8:</b> Lichtmikroskopischer Nachweis fixierter Zellkolonien nach 72-stündiger Kultur. Die exakte Differenzierung zwischen epithelialen Zellen und Stromazellen wird erst in der Fluoreszenzfärbung möglich. 200-fache Vergrößerung, Pat.-Nr. 17	32
<b>Abb. 9:</b> Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis epithelialer Kolonien nach 72-stündiger Kultur in 200-facher Vergrößerung, Pat.-Nr. 17	32
<b>Abb. 10:</b> Lichtmikroskopische Darstellung von KB-Zellen nach eintägiger Kultur, 200-fache Vergrößerung	32
<b>Abb. 11:</b> Lichtmikroskopische Darstellung von KB-Zellen nach eintägiger Kultur, 400-fache Vergrößerung	32
<b>Abb. 12:</b> Lichtmikroskopische Darstellung von KB-Zellen nach Zugabe von MTT unter Herausbildung violetter Formazan-Kristalle, 100-fache Vergrößerung	34

- Abb. 13:** Lichtmikroskopische Darstellung von KB-Zellen nach Zugabe von MTT unter Herausbildung violetter Formazan-Kristalle, 200-fache Vergrößerung 34
- Abb. 14:** Konzentrationsabhängig differente Farbintensität der gelben Färbung des Oxidationsproduktes von TMB im sauren pH-Bereich (Farbumschlag von blau nach gelb durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure), gezeigt am Beispiel eines ELISA von Kulturüberständen aus dem 6-Well-Ansatz zur Quantifizierung von IL-6. Duplikate von Proben wurden in den Zeilen A bis F gemessen, während in G und H die jeweiligen Duplikate der für die Erstellung der Kalibrierkurve genutzten Standard-Konzentrationen aufgetragen wurden. Die mit der Verminderung der IL-6-Konzentration einhergehende Verminderung der Farbintensität belegt die für die Quantifizierung nutzbare Korrelation. 37
- Abb. 15:** Gezeigt ist der signifikante Unterschied der VEGF-Expression in Patientenseren fernmetastasierter Tumoren (M1) und nicht fernmetastasierter Tumoren (M0). 40
- Abb. 16:** Gezeigt sind signifikante Unterschiede der Konzentrationen für MCP-1, VEGF, IL-6 und IL-8 im Patientenserum und im Kulturüberstand. 41
- Abb. 17:** Gezeigt sind die Effekte von Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Temezirolimus auf die MCP-1-Produktion in HNSCC *ex vivo*, normiert auf die individuelle Kontrolle in Prozent. Durch Cisplatin ( $p=8,69 \cdot 10^{-6}$ ) und Temezirolimus ( $p=0,0054$ ) wurde die MCP-1 Konzentration im Kulturüberstand signifikant reduziert. 45
- Abb. 18:** Gezeigt sind die Effekte von Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Temezirolimus auf die IL-6-Produktion in HNSCC *ex vivo*, normiert auf die individuelle Kontrolle in Prozent. Durch Cisplatin ( $p=4,04 \cdot 10^{-7}$ ), Docetaxel ( $p=0,0049$ ) und Temezirolimus ( $p=0,0049$ ) wurde die IL-6-Konzentration im Kulturüberstand signifikant reduziert. 46
- Abb. 19:** Gezeigt sind die Effekte von Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Temezirolimus auf die IL-8-Produktion in HNSCC *ex vivo*, normiert auf die individuelle Kontrolle in Prozent. Durch Cisplatin ( $p=3,72 \cdot 10^{-6}$ ), Docetaxel ( $p=0,0005$ ) und Temezirolimus ( $p=0,0038$ ) wurde die IL-8-Konzentration im Kulturüberstand signifikant reduziert. 46
- Abb. 20:** Gezeigt sind die Effekte von Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Temezirolimus auf die VEGF-Produktion in HNSCC *ex vivo*, normiert auf die individuelle Kontrolle in Prozent. Durch Cisplatin ( $p=0,0020$ ) und Temezirolimus ( $p=0,0002$ ) wurde die VEGF-Konzentration im Kulturüberstand signifikant reduziert. 46

- Abb. 21:** Gezeigt ist die MCP-1-Produktion in HNSCC *ex vivo* in Abhängigkeit der MCP-1-Inhibition bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent. Die MCP-1-Expression wird durch den Anti-MCP-1-Antikörper signifikant gesenkt ( $p=0,0071$ ). 50
- Abb. 22:** Gezeigt ist die IL-6-Produktion in HNSCC *ex vivo* in Abhängigkeit der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent. Es gibt einen Trend zu niedrigeren IL-6-Konzentrationen unter MCP-1-Einfluss als unter dem Einfluss des Anti-MCP-1-Antikörpers. Es zeigt sich jedoch keine statistische Signifikanz. 50
- Abb. 23:** Gezeigt ist die IL-8-Produktion in HNSCC *ex vivo* in Abhängigkeit der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent. Die IL-8-Expression wird durch den Anti-MCP-1-Antikörper signifikant gesenkt ( $p=0,0053$ ). 50
- Abb. 24:** Gezeigt ist die VEGF-Produktion in HNSCC *ex vivo* in Abhängigkeit der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent. Es gibt einen Trend zu niedrigeren VEGF-Konzentrationen unter MCP-1-Einfluss als unter dem Einfluss des Anti-MCP-1-Antikörpers. Es zeigt sich jedoch keine statistische Signifikanz. 51
- Abb. 25:** Dargestellt ist der Effekt der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 auf die Koloniebildung. Cisplatin ( $p=5,0995 \cdot 10^{-36}$ ) und MCP-1 ( $p=0,0020$ ) senkten die Koloniebildung signifikant. Die Effekte von Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus blieben ohne statistische Signifikanz (Docetaxel:  $p=0,5699$ ; Cilengitide:  $p=0,3507$ ; Temsirolimus:  $p=0,2445$ ). Der Anti-MCP-1-Antikörper führte zu keiner signifikanten Modulation der Koloniebildung ( $p=0,8954$ ). Die Effekte der MCP-1-Stimulation und -Inhibition unterschieden sich in der unbehandelten Kontrolle nicht signifikant voneinander ( $p=0,0798$ ). 56
- Abb. 26:** Dargestellt ist der Effekt der Inhibition von MCP-1 auf die MCP-1-Expression. Cisplatin senkte die MCP-1-Expression ( $p=4,117 \cdot 10^{-18}$ ), Cilengitide ( $p=0,0028$ ) wirkte steigernd. Cisplatin war gegenüber Docetaxel ( $p=4,883 \cdot 10^{-8}$ ), Cilengitide ( $p=2,515 \cdot 10^{-7}$ ) und Temsirolimus ( $p=2,663 \cdot 10^{-10}$ ) signifikant überlegen. Temsirolimus war Cilengitide signifikant überlegen ( $p=0,0391$ ). Der Anti-MCP-1-Antikörper senkte die MCP-1-Expression signifikant ( $p=6,936 \cdot 10^{-10}$ ). 56

- Abb. 27:** Dargestellt ist der Effekt der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 auf die IL-6-Expression. Cisplatin senkte die IL-6-Expression ( $p=6,947 \cdot 10^{-24}$ ), während Docetaxel ( $p=0,0015$ ), Cilengitide ( $p=0,001$ ) und Temsirolimus ( $p=0,0036$ ) steigernd wirkten. Cisplatin war gegenüber Docetaxel ( $p=1,425 \cdot 10^{-12}$ ), Cilengitide ( $p=5,328 \cdot 10^{-14}$ ) und Temsirolimus ( $p=6,444 \cdot 10^{-16}$ ) signifikant überlegen. Der Anti-MCP-1-Antikörper ( $p=0,0137$ ) und MCP-1 ( $p=0,3274$ ) senkten die IL-6-Expression ebenfalls. 57
- Abb. 28:** Dargestellt ist der Effekt der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 auf die IL-8-Expression. Cisplatin senkte die IL-8-Expression ( $p=1,800 \cdot 10^{-26}$ ), während Docetaxel ( $p=0,1668$ ), Cilengitide ( $p=0,0001$ ) und Temsirolimus ( $p=0,0029$ ) steigernd wirkten. Cisplatin war gegenüber Docetaxel ( $p=2,098 \cdot 10^{-10}$ ), Cilengitide ( $p=2,913 \cdot 10^{-14}$ ) und Temsirolimus ( $p=6,672 \cdot 10^{-12}$ ) signifikant überlegen. Docetaxel war gegenüber Cilengitide signifikant überlegen ( $p=0,0196$ ). Sowohl der Anti-MCP-1-Antikörper ( $p=0,0008$ ) als auch MCP-1 ( $p=0,0006$ ) senkten die IL-8-Expression signifikant. 57
- Abb. 29:** Gezeigt sind die für die Koloniebildung bestimmten Interaktionsmechanismen. Es überwiegen die additiven Effekte von Cisplatin und dem Anti-MCP-1-Antikörper bzw. MCP-1. 66
- Abb. 30:** Gezeigt sind die für die MCP-1-Expression bestimmten Interaktionsmechanismen. Bei Cisplatin und dem Anti-MCP-1-Antikörper überwiegen additive Effekte. Bei Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus liegt Antagonismus vor. 66
- Abb. 31:** Gezeigt sind die für die IL-6-Expression bestimmten Interaktionsmechanismen. Obwohl in der individuellen Betrachtung häufiger antagonistische Effekte zwischen Cisplatin und MCP-1 beobachtet wurden, liegt für die gemittelte Gesamtheit Additivität vor. 66
- Abb. 32:** Gezeigt sind die für die IL-8-Expression bestimmten Interaktionsmechanismen. Die additiven Effekte von Cisplatin und dem Anti-MCP-1-Antikörper bzw. MCP-1 überwiegen. Bei Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus liegt vermehrt Antagonismus vor. 66

<b>Tabellen</b>		Seite
<b>Tab. 1:</b>	Übersicht zu Alter und Geschlecht der eingeschlossenen Patienten sowie Lokalisation des Primums, Staging (TNM) und Tumorstadium (UICC), Grading (G), Risikoanamnese und Histologie sowie Art der untersuchten Probe. Vorbehandelte (y) oder rezidivierende (r) HNSCC sind gelb markiert.	18
<b>Tab. 2:</b>	Reagenzien	20
<b>Tab. 3:</b>	Zytostatika	21
<b>Tab. 4:</b>	Antikörper und Zytokine	21
<b>Tab. 5:</b>	ELISA-Kits	21
<b>Tab. 6:</b>	Einmalartikel	21
<b>Tab. 7:</b>	Glaswaren	22
<b>Tab. 8:</b>	Geräte	22
<b>Tab. 9:</b>	Software	23
<b>Tab. 10:</b>	Konzentrationen der im MTT-Vitalitätstest getesteten Zytostatika	34
<b>Tab. 11:</b>	Konzentrationen der zur Zytokinquantifizierung genutzten Standards	36
<b>Tab. 12:</b>	Deskriptive Statistik der Zytokinquantifizierung in Patientenseren (n=45)	39
<b>Tab. 13:</b>	<i>H</i> -Test (Kruskal-Wallis) für Patientencharakteristik	39
<b>Tab. 14:</b>	Deskriptive Statistik für 20 Testungen mit Cisplatin (Cis), Docetaxel (DTX), Cilengitide (Cil) und Temsirolimus (Tem) in pg/ml und bezogen auf die individuelle unbehandelte, nur mit Tumormedium versetzte Kontrolle (K) in Prozent.	43
<b>Tab. 15:</b>	Gezeigt sind die <i>p</i> -Werte des <i>U</i> -Tests für 20 Testungen mit Cisplatin, Docetaxel, Cilengitide und Temsirolimus in pg/ml und bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent.	45

<b>Tab. 16:</b>	Deskriptive Statistik für 57 Testungen mit Cisplatin (Cis) und Docetaxel (DTX) in pg/ml und bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle (K) in Prozent.	47
<b>Tab. 17:</b>	Gezeigt sind die $p$ -Werte des $U$ -Tests für 57 Testungen mit Cisplatin und Docetaxel in pg/ml und bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent.	47
<b>Tab. 18:</b>	Deskriptive Statistik für 5 Testungen zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 in pg/ml und bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle (K) in Prozent. Auf das Zeigen der MCP-1-stimulierten MCP-1-Expression im Kulturüberstand wurde aus oben beschriebenen Gründen verzichtet.	48
<b>Tab. 19:</b>	Gezeigt sind die $p$ -Werte des $U$ -Tests für 5 Testungen zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 in pg/ml und bezogen auf die individuelle unbehandelte Kontrolle in Prozent. „k. A.“ steht für „keine Angabe“. Auf das Zeigen der MCP-1-stimulierten MCP-1-Expression im Kulturüberstand wurde aus oben beschriebenen Gründen verzichtet.	49
<b>Tab. 20:</b>	Deskriptive Statistik für 14 Testungen zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 in Zytostatika-freiem Tumormedium (TM) und unter dem Einfluss der Zytostatika Cisplatin (Cis), Docetaxel (DTX), Cilengitide (Cil) und Temeirolimus (Tem) bezogen auf die individuelle, nicht mit MCP-1 oder dem Anti-MCP-1-Antikörper behandelte Kontrolle (K) in Prozent. Dargestellt sind die Ergebnisse der Koloniebildung im FLAVINO-Assay.	52
<b>Tab. 21:</b>	Deskriptive Statistik für 14 Testungen zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 in Zytostatika-freiem Tumormedium (TM) und unter dem Einfluss der Zytostatika Cisplatin (Cis), Docetaxel (DTX), Cilengitide (Cil) und Temeirolimus (Tem) bezogen auf die individuelle, nicht mit MCP-1 oder dem Anti-MCP-1-Antikörper behandelte Kontrolle (K) in Prozent. Dargestellt sind die Ergebnisse der MCP-1-Expression im Kulturüberstand. Auf das Zeigen der MCP-1-stimulierten MCP-1-Expression im Kulturüberstand wurde aus oben beschriebenen Gründen verzichtet.	53
<b>Tab. 22:</b>	Deskriptive Statistik für 14 Testungen zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 in Zytostatika-freiem Tumormedium (TM) und unter dem Einfluss der Zytostatika Cisplatin (Cis), Docetaxel (DTX), Cilengitide (Cil) und Temeirolimus (Tem) bezogen auf die individuelle, nicht mit MCP-1 oder dem Anti-MCP-1-Antikörper behandelte Kontrolle (K) in Prozent. Dargestellt sind die Ergebnisse der IL-6-Expression im Kulturüberstand.	54

- Tab. 23:** Deskriptive Statistik für 14 Testungen zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 in Zytostatika-freiem Tumormedium (TM) und unter dem Einfluss der Zytostatika Cisplatin (Cis), Docetaxel (DTX), Cilengitide (Cil) und Temsirolimus (Tem) bezogen auf die individuelle, nicht mit MCP-1 oder dem Anti-MCP-1-Antikörper behandelte Kontrolle (K) in Prozent. Dargestellt sind die Ergebnisse der IL-8-Expression im Kulturüberstand. 55
- Tab. 24:** Gezeigt sind die  $p$ -Werte aus dem zweiseitigen  $t$ -Test bei ungleicher Varianz für 14 Testungen aus den Kombinationsexperimenten zur Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 unter dem Einfluss von Cisplatin (Cis), Docetaxel (DTX), Cilengitide (Cil) und Temsirolimus (Tem). 59
- Tab. 25:** Die Tabelle zeigt die Chemoreaktivität der 14 getesteten Plattenepithelkarzinome auf individueller Ebene. Dargestellt sind signifikante Steigerungen (↑) oder Senkungen (↓) der Koloniebildung und Zytokinexpression mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $<5\%$ ,  $<1\%$  bzw.  $<0,1\%$  im zweiseitigen  $t$ -Test bei ungleicher Varianz. Nicht markierte Felder entsprechen nicht signifikanten Modifikationen der Chemoreaktivität. \* Auf die Darstellung der Interaktionsmechanismen zwischen Zytostatikum und MCP-1 bezogen auf die MCP-1-Expression wurde verzichtet. 61
- Tab. 26:** Gezeigt sind die Interaktionsmechanismen der Kombination der Zytostatika und der Inhibition von und Stimulation durch MCP-1 gemittelt für 14 getestete Tumoren. Dabei steht „ANTI“ für einen echten Antagonismus im Sinne einer entgegengesetzten Wirkung. „Ant.“ bedeutet ein nach der Jin-Formel errechneter Antagonismus ( $q < 0,85$ ), während „Add.“ für Additivität ( $0,85 \leq q \leq 1,15$ ) und „Syn.“ für Synergismus ( $q > 1,15$ ) stehen. „k. A.“ bedeutet „keine Angabe“. 65

## 8. Anlagen

### **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

## Verzeichnis wissenschaftlicher Veröffentlichungen

Körner, C.; Meilke, L.; Dietz, A.; Reiche, A.; Herrmann, K.; Aust, W. *et al.* (2011): Zytokinexpressionsmuster in Seren von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region. 1. Workshop zur experimentellen und klinischen Forschung in der Kopf-Hals-Onkologie der Klinik und Poliklinik für HNO-Heilkunde am Universitätsklinikum Leipzig AöR unter Mitwirkung der Arbeitsgemeinschaft Onkologie der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie 11. – 12. Februar 2011, Leipzig.

Wichmann, G.; Körner, C.; Dietz, A. (2011): Ex-vivo-Chemoresponsetestung von Kopf-Hals-Tumoren: Ein alter Hut? In: *Laryngo-Rhino-Otol* 90 (08), S. 464–468. DOI: 10.1055/s-0031-1283137.

Wichmann, G.; Körner, C.; Meilke, L.; Dietz, A.; Reiche, A.; Herrmann, K. *et al.* (2011): Cytokine expression patterns in sera of head and neck squamous cell carcinoma patients. 82. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Freiburg i. Br. 01.-05.06. Doc11hnod276. Online verfügbar unter <http://www.egms.de/static/de/meetings/hnod2011/11hnod276.shtm>

Körner, C.; Wichmann, G.; Boehm, A.; Reiche, A.; Kehlen, A.; Hoffmann, T. *et al.* (2012): Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in head and neck squamous cell carcinoma: evidence for its involvement in tumorigenic processes?, Abstracts for the 5th European Conference on Head and Neck Oncology 18–21 April 2012 in Poznan, Poland. In: *Eur Arch Otorhinolaryngol* 269 (4), S. 1368. 1311–1410. Online verfügbar unter <http://link.springer.com/article/10.1007/s00405-012-1960-4>

Körner, C.; Boehm, A.; Reiche, A.; Dietz, A.; Kehlen, A.; Hoffmann, T. *et al.* (2012): CCL2 in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region: Belege für seine Beteiligung in der Tumorgenese? 83. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Mainz 16.-20.05.2012, Doc12hnod254. Online verfügbar unter <http://www.egms.de/static/de/meetings/hnod2012/12hnod254.shtml>

Körner, C.; Boehm, A.; Reiche, A.; Dietz, A.; Herrmann, K.; Wichmann, G. (2013): The Role of Stimulation and Inhibition of Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC), 12. Research Festival Leipzig 2013, Leipzig, 19.12.2013

## 9. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Dr. rer. nat. Gunnar Wichmann für seine umfassende Betreuung beginnend bei der Planung der Experimente, für zwischenzeitliche Gespräche über den aktuellen Fortschritt des Entstehungsprozesses dieser Dissertation sowie für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der gewonnenen Daten und seine konstruktive Kritik.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Dietz für die Möglichkeit an der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität Leipzig zu promovieren und für die Ermöglichung dieser Dissertation.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Anett Reiche, Kristin Herrmann und Franziska Voigt für die labortechnische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente bedanken.

Ich bedanke mich bei den Patienten der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität Leipzig für ihre Bereitschaft zur Teilnahme an der experimentellen Forschung im Rahmen dieser Arbeit.

Zudem bedanke ich mich bei allen Operateuren der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität Leipzig für die Gewinnung der Tumorproben sowie bei allen Kooperationspartnern.

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern. Danke für eure Unterstützung, eure Geduld und das richtige Gespür Ideen zu säen.