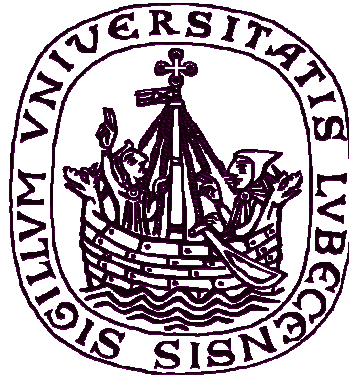


Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Direktorin: Frau Prof. Dr. med. B. Wollenberg



Einfluss einer in-vitro-Chemotherapie auf die Zytokin- und Stammzellproteinexpression von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Stefan Reers
aus Bottrop

Lübeck 2013

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Frank Noack

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.11.2013

Promotionskommission der Sektion Medizin

Meinen Eltern
- in Liebe und Dankbarkeit -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis		
Abkürzungsverzeichnis		
1 Einleitung		1
1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC)		1
1.2 Chemotherapie bei HNSCC		2
1.3 Allgemeine Tumorbilogie bei HNSCC		4
1.4 Zytokine		5
1.4.1 Zytokine in HNSCC		6
1.4.2 Einfluss von Zytostatikatherapie auf die Zytokinsekretion		9
1.5 Tumorstammzelltheorie		10
1.6 Potentielle Tumorstammzellmarker in HNSCC		15
1.6.1 Potentielle Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur		15
1.6.1.1 CD34		15
1.6.1.2 CD44		16
1.6.1.3 CD59		17
1.6.1.4 CD117		17
1.6.1.5 CD133		17
1.6.2 Potentielle Tumorstammzellmarker des Wnt-Signalweges		18
1.6.2.1 Frizzled-3		19
1.6.2.2 Frizzled-7		19
1.6.3 Potentielle Tumorstammzellmarker embryonalen Ursprungs und Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)		20
1.6.3.1 E-Cadherin		20
1.6.3.2 Snail		21
1.6.3.3 Goosecoid		21
1.6.3.4 Oct-4		21
1.6.3.5 Sox2		22
1.6.3.6 Nanog		23
1.6.3.7 Sox17		23
1.6.3.8 GATA-4		24
1.6.4 Einfluss von Zytostatika auf die Expression potentieller Tumorstammzellmarker		24
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit		26

2	Material und Methoden.....	27
2.1	Verwendete Materialien.....	27
2.1.1	Verwendete Laborgeräte.....	27
2.1.2	Verwendete Software.....	28
2.1.3	Verwendete Materialien.....	28
2.1.4	Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medien.....	29
2.1.5	Zusammensetzung von Medien.....	30
2.1.6	Verwendete Puffer und Lösungen.....	31
2.1.7	Verwendete Kits.....	31
2.1.8	Verwendete Antikörper.....	32
2.1.9	Verwendete Zelllinien.....	33
2.1.10	Verwendete Gewebeproben.....	33
2.2	Methoden.....	35
2.2.1	Allgemeine Zellkulturarbeiten.....	35
2.2.1.1	Kultivierung von HNSCC-Zelllinien.....	35
2.2.1.2	Herstellung von Primärkulturen.....	36
2.2.1.3	Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest.....	36
2.2.1.4	Einfrieren von Zellen.....	37
2.2.1.5	Auftauen von Zellen.....	38
2.2.2	MTT-Zytotoxizitäts-Assay.....	38
2.2.3	Bestimmung der Chemosensitivität.....	39
2.2.4	Bestimmung der Zytokinkonzentration von Zellen.....	39
2.2.4.1	Bio-Plex™-System.....	40
2.2.4.2	Flex-Set™-System.....	40
2.2.5	Durchflusszytometrie.....	41
2.2.5.1	Prinzip.....	41
2.2.5.2	Durchführung.....	41
2.2.5.3	Annexin/PI-Färbung.....	42
2.2.6	Immunhistochemie.....	42
2.2.6.1	Gefrierschnitte.....	43
2.2.6.2	Cytospin-Präparate.....	43
2.2.6.3	Durchführung.....	43

2.2.7	<i>Proteom Profiler™ Array</i> (R & D System)	44
2.2.7.1	Proteinpräparation.....	44
2.2.7.2	Proteinquantifizierung nach <i>Bradford</i>	44
2.2.7.3	Durchführung des Human Pluripotent Stem Cell Array	44
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Einfluss von Zytostatika auf das Wachstumsverhalten von HNSCC-Zelllinien	47
3.1.1	Wachstumsverhalten unter 5-Fluorouracilbehandlung.....	47
3.1.2	Wachstumsverhalten unter Cisplatinbehandlung	49
3.1.3	Wachstumsverhalten unter Paclitaxelbehandlung	50
3.1.4	Vergleich der verwendeten Zytostatika anhand von IC-Werten.....	51
3.2	Einfluss von Zytostatika auf die Zytokinsekretion von HNSCC- Zelllinien	51
3.2.1	Zytokinsekretion ohne Zytostatikabehandlung.....	52
3.2.2	Zytokinsekretion unter 5-Fluorouracilbehandlung	53
3.2.3	Zytokinsekretion unter Cisplatinbehandlung	56
3.2.4	Zytokinsekretion unter Paclitaxelbehandlung	58
3.3	Potentielle Tumorstammzellmarker	60
3.3.1	Potentielle Tumorstammzellmarker in HNSCC-Zelllinien.....	60
3.3.1.1	Potentielle Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur.....	60
3.3.1.2	Potentielle Tumorstammzellmarker des Wnt-Signalweges	62
3.3.1.3	Potentielle Tumorstammzellmarker embryonalen Ursprungs	63
3.3.1.4	Coexpression potentieller Tumorstammzellmarker mit Oct-4.....	67
3.3.2	Potentielle Tumorstammzellmarker in Tumorgewebeproben	71
3.3.2.1	Potentielle Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur.....	71
3.3.2.2	Potentielle Tumorstammzellmarker des Wnt-Signalweges	73
3.3.2.3	Potentielle Tumorstammzellmarker embryonalen Ursprungs	74
3.3.2.4	Coexpression potentieller Tumorstammzellmarker mit Oct-4.....	79
3.3.2.5	Charakterisierung der Tumorgewebeproben	81
3.3.2.6	Einfluss von Differenzierungsgrad und Tumorstadium auf die Expression potentieller Tumorstammzellmarker	81
3.4	Einfluss von Zytostatika auf die Expression potentieller Tumorstammzellmarker	83

4	Diskussion.....	86
4.1	Einfluss von Zytostatika auf das Wachstumsverhalten von HNSCC-Zelllinien	86
4.2	Einfluss von Zytostatika auf die Zytokinsekretion von HNSCC-Zelllinien	87
4.3	Potentielle Tumorstammzellmarker in HNSCC sowie der Einfluss von Zytostatika auf die Expression potentieller Tumorstammzellmarker von HNSCC-Zelllinien	90
4.4	Ausblick	101
5	Zusammenfassung.....	102
6	Literaturverzeichnis	104
7	Abbildungsverzeichnis	126
8	Tabellenverzeichnis	128

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil: Zytostatikum
APC	Allophycocyanin: Fluoreszenzfarbstoff
ATP	Adenosintriphosphat: energiereicher Nukleinsäureverbindung
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor: Zytokin
BSA	bovines Serumalbumin: Rinderserumprotein
CD	Cluster of differentiation: Oberflächenantigen
CIS	Cisplatin: Zytostatikum
c-Kit	zelluläres (cellular) Homolog des Katzen-(Kitten) Sarkom-Virus: zelluläres Rezeptorprotein
CSC	Cancer Stem Cells: Tumorstammzelle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol: Fluoreszenzfarbstoff
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> : Nährmedium
DMSO	Dimethylsulfonsäureoxid: organisches Lösungsmittel, wird u. a. zur Kryokonservierung verwendet
DNA	Desoxyribonucleic acid: Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E-Cadherin	Epithelial Calcium adhering: Adhäsionsprotein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat: chemischer Komplexbildner
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor: zelluläres Rezeptorprotein
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay: Nachweismethode
EMT	Epitheliale-mesenchymale-Transition: biologischer Zelltransformationsprozess
FACS	Fluorescence activated cell sorter: Nachweismethode; Synonym: Durchflusszytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat: Fluoreszenzfarbstoff
FKS	Fetales Kälberserum: Zusatz für Zellkulturen; Synonym: fetal bovine serum (FBS), fetal calf serum (FCS)
FSC	Forward scatter: Maßeinheit in der Durchflusszytometrie
FZD	Frizzled: zelluläres Rezeptorprotein
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulocyte - Colony Stimulating Factor: Zytokin
GM-CSF	Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor: Zytokin
GSC	Goosecoid: embryonales Stammzellprotein
Gy	Gray: physikalische Einheit (1 Gy = 1 J/kg)
HER3	Human Epidermal Growth Factor Rezeptor 3: zelluläres Rezeptorprotein

HGF	Hepatocyte Growth Factor: Zytokin
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma: Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs
HPV	Humanes Papillomavirus: humanpathogenes DNA-Virus
IC	Inhibitory Concentration: Maßeinheit der Wirkungsstärke von Zytostatika
IFN	Interferon: Zytokin
Ig	Immunglobulin: Antikörper
IL	Interleukin: Zytokin
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma: Signaltransduktionsprotein
LDL	Low Density Lipoprotein: Transportprotein im Blut für lipophile Substanzen
LRP	Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein: zelluläres Rezeptorprotein für LDL
MDR	Multi Drug Resistance: Transporterproteine für Medikamente
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor: Zytokin
MW	Mittelwert
Nanog	Tir Na Nog: embryonales Stammzellprotein
Oct-4	Octamer-binding transcription factor 4: embryonales Stammzellprotein
OP	Operation
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells: einkernige Blutzellen
PBS	Phosphate-buffered Saline: Pufferlösung
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor: Zytokin
PE	Phycoerythrin: Fluoreszenzfarbstoff
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein: Fluoreszenzfarbstoff
PGE2	Prostaglandin E2: Zytokin
PI	Propidiumjodid: Fluoreszenzfarbstoff
PTX	Paclitaxel: Zytostatikum
RNA	Ribonucleic acid: Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-Time-Polymerase Chain Reaction: Nachweismethode auf Nukleinsäurebasis
SCF	Stem Cell Factor (auch Kit-Ligand oder Steel factor): lösliches Protein, v. a. von hämatologischen Stammzellen
SCFR	Stem Cell Factor Receptor: Rezeptorprotein von hauptsächlich hämatologischen Stammzellen
SD	Standard Deviation: Maß für die Streuung von Werten um ihren Mittelwert
SH	Sulfanylgruppe: funktionellen Gruppe in der organischen Chemie
siRNA	short interference RNA: kurze Ribonukleinsäure-Moleküle
Sox	Sry-related HMG-box: embryonales Stammzellprotein
SSC	Somatic Stem Cells: Gewebestammzelle
SSC	Sideward scatter: Maßeinheit in der Durchflusszytometrie

TGF- β	Transforming Growth Factor- β : Zytokin
TH	T-Helfer-Zelle: Immunzelle
TNF- α	Tumor Necrosis Factor - alpha: Zytokin
UICC	Union for International Cancer Control: Internationale Vereinigung gegen Krebserkrankungen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor: Zytokin

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; HNSCC) gehören zu den Krebserkrankungen des oberen speise- und luftleitenden Systems, welches die Mundhöhle, den Rachen, den Kehlkopf, die Speicheldrüsen sowie die Nasenhaupt- und -nebenhöhlen einbezieht [1]. Sie stellen mit einem histologischen Anteil von über 90 % den Großteil der malignen Neubildungen im Kopf-Hals-Bereich dar [2]. Mit ca. 900.000 diagnostizierten Neuerkrankungen pro Jahr weltweit liegen Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich an sechster Stelle der am häufigsten auftretenden Neoplasien. Regionsabhängig liegt die Inzidenzrate zwischen 20 und 30 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner, wobei Männer wesentlich häufiger betroffen sind als Frauen ($\text{♂} : \text{♀} = 9 : 1$) [3, 4].

Trotz des enormen Fortschrittes der letzten 30 Jahren im Verständnis von Prävention und Behandlung vieler Tumorerkrankungen bleibt die 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 50 % nach Diagnosestellung von HPV-negativen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich fast unverändert niedrig [5]. Die geringe Überlebensrate von HNSCC-Patienten liegt darin begründet, dass mehr als 50 % der Patienten bei Diagnosestellung bereits Lymphknoten-Metastasen aufweisen, was als einer der wichtigsten Faktoren für eine schlechte Prognose angesehen wird [6, 7]. Die Inzidenz von Fernmetastasen variiert je nach Literaturangabe zwischen 6 und 21 % [8-13], wobei die mediane Überlebensrate bei Fernmetastasen auf 16 Monate sinkt, im Vergleich zu 66 Monaten bei alleiniger Lymphknoten-Metastasierung [4]. Weitere stadienabhängige Prognosefaktoren sind die Lokalisation sowie die Größe des Primärtumors [14].

Wie Untersuchungen sowohl auf histologischer als auch auf molekularer Ebene gezeigt haben, handelt es sich bei HNSCC um eine sehr heterogene Neoplasie-Form [15, 16]. Trotz dieser ausgeprägten Heterogenität können der Ätiologie nach zwei Hauptgruppen dieser Tumorentität unterschieden werden: auf der einen Seite HPV-negative Tumore, welche durch klassischen Toxine, wie Tabak- und Alkoholkonsum, hervorgerufen werden, auf der anderen Seite HPV-positive Tumore, welche durch eine persistierende Infektion mit dem Humanen-Papilloma-Virus (HPV) induziert sind [17]. Diese ätiologische Einteilung hat auch prognostische Bedeutung, da für Patienten mit HPV-positiven Tumoren eine deutlich höhere Überlebensrate als bei HPV-negativen Tumoren nachgewiesen werden konnte [18]. Weitere Risikofaktoren, neben der Infektion mit den HPV-Typen 16, 18 und 31 sowie dem Tabak- und Alkoholkonsum, sind eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus, genetische Dispositionen, Vitamin-A-Mangel, Eisenmangel beim Plummer-Vinson-Syndrom sowie das Kauen der Betelnuss in Teilen Asiens [2, 15, 19, 20].

Die Stadieneinteilung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches erfolgt nach der Systematik des TNM-System der UICC (Union for International Cancer Control), welches die Größe des Primärtumors (T), das Ausmaß der regionalen Lymphknoten-Metastasen (N) und das Ausmaß der Fernmetastasen (M) beinhaltet. In Abhängigkeit von dem TNM-System kann eine prognostische Einteilung in die vier UICC-Stadien (I - IV) vorgenommen werden, wie in Tabelle 1 gezeigt [9, 21].

Stadium	Primärtumor	Regionale Metastasen	Entfernte Metastasen	5-Jahres-Überlebensrate	Ungefähre prozentuale Fallanzahl
I	T1	N0	M0	56 – 68,1 %	30 – 40 %
II	T2	N0	M0	45,4 – 52,9 %	
III	T1	N1	M0	36,3 – 56,3 %	> 50 %
	T2	N1	M0		
	T3	N0	M0		
	T3	N1	M0		
IV	T4	jedes N	M0	26,5 – 38,9 %	10 %
	jedes T	jedes N	M1-3		

Tabelle 1: Allgemeine UICC-Einteilung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches

Die Stadieneinteilung erfolgt nach der Systematik des TNM-Systems der UICC und ist für jede Tumorlokalisation gesondert definiert. In dieser Tabelle ist die allgemeine Einteilung dargestellt. T1-4: ansteigende Größe des Primärtumors; jedes T: T1-4; N0: keine regionalen Lymphknoten-Metastasen; N0-3: ansteigende Größe und Lokalisation der Lymphknoten-Metastasen; jedes N: N1-3; M0: keine Fernmetastasen; M1-3: Fernmetastasen; [21, 22].

Die Therapie eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches ist sehr komplex und im ständigen Wandel. Abhängig von der Lokalisation des Primärtumors sowie des Tumorstadiums kommen als Therapieoptionen chirurgische, strahlen- sowie chemotherapeutische Behandlungsstrategien infrage. Da mehr als 50 % aller Patienten mit HNSCC bei Diagnosestellung Lymphknoten-Metastasen aufweisen, wird meist eine multimodale Therapiestrategie gewählt und angewendet [2, 6]. Während in naher Vergangenheit häufig eine Kombination aus chirurgischem sowie strahlentherapeutischem Vorgehen bevorzugt wurde, erhalten zunehmend chemo- sowie immuntherapeutische Verfahren Einzug in die Behandlung dieser Tumorerkrankung [23].

1.2 Chemotherapie bei HNSCC

Während die seltenen frühen Tumorstadien I und II hauptsächlich operativ und strahlentherapeutisch behandelt werden, erhalten Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen (Stadium III und IV) häufig eine multimodale Therapie, bestehend aus

Operation, Bestrahlung und Chemotherapie [24]. Das Indikationsspektrum der Chemotherapie, die früher größtenteils auf palliative Behandlungen beschränkt war, wurde somit in den letzten Jahren auf kurative Behandlungsansätze ausgeweitet [23]. Berniere et al. sowie Cooper et al. konnten 2004 unabhängig voneinander belegen, dass durch Addition einer Chemotherapie mit Cisplatin zur adjuvanten Strahlentherapie bei fortgeschrittenen HNSCCs sowohl eine bessere lokoregionale Kontrolle als auch eine Zunahme des Gesamtüberlebens gelang [25, 26]. Zu demselben Ergebnis gelangte 2007 eine große Meta-Analyse von Bourhis et al., welche Daten von über 25.000 Patienten auswertete [27]. Die Chemotherapie kann als adjuvante sowie als neoadjuvante Behandlungsstrategie angewendet werden. Dabei finden adjuvante Chemotherapien, meist in Kombination mit einer Bestrahlung, bei primär resektablen Tumoren Anwendung, während neoadjuvante Chemotherapien, meist ebenfalls als Radiochemotherapie, bei primärer Inoperabilität, großen Tumormassen („bulky disease“) sowie zum Organerhalt eingesetzt werden [26]. Außerdem gewannen in den letzten Jahren zunehmend immuntherapeutische Behandlungskonzepte an Bedeutung. Seit der 2006 publizierten Studie von Bonner et al., in der der EGFR (Epidermal-Growth-Factor-Receptor)-Antikörper Cetuximab bei Patienten mit fortgeschrittenen HNSCC zu einer signifikant besseren Gesamtüberlebensrate sowie einer besseren lokoregionalen Kontrolle führte, wurde auch dieser Wirkstoff in das Behandlungsmanagement von HNSCC eingeführt [28].

Als Standard-Zytostatikum bei HNSCC gelten Platin-haltige Wirkstoffe, wie z. B. Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin [24]. Zur Erzielung der größten Wirksamkeit und einer längeren Gesamtüberlebensrate erfolgt häufig eine Kombinationstherapie mit 5-Fluorouracil sowie einem Taxan (Paclitaxel oder Docetaxel) [24, 29]. Aus diesen Kenntnissen sind verschiedene Therapiestrategien entwickelt worden, welche bei fortgeschrittenen HNSCC meist eine Radiochemotherapie mit 5-Fluorouracil, Cisplatin und einem Taxan beinhalten. Die hierdurch erzielten höheren Gesamtüberlebensraten haben jedoch nicht selten hohe Abbruchraten und therapiebedingte Todesfälle zur Folge [4]. Einen Überblick über die aktuell verwendeten chemotherapeutischen Wirkstoffe gibt Tabelle 2.

Wirkstoff	Wirk-mechanismus	Therapie-strategie	Unerwünschte Arzneimittel-wirkungen	Resistenz-mechanismen	Referenzen
5-Fluoro-uracil	Antimetabolit (Pyrimidin-analoga, Hemmung der Thymidylat-Synthase)	5-Fluorouracil in Kombination mit Cisplatin/ Carboplatin und mit oder ohne Paclitaxel	Kardiotoxizität, Übelkeit, Erbrechen, Knochenmark-suppression, Thrombo-phlebitis, Dermatitis	Verminderung der Aktivierung von 5-Fluoro-uracil, Amplifikation der Thymidylat-Synthase	[29-31]

Fortsetzung von Tabelle 2 auf Seite 4

Wirkstoff	Wirk-mechanismus	Therapie-strategie	Unerwünschte Arzneimittel-wirkungen	Resistenz-mechanismen	Referenzen
Platin-haltige Wirkstoffe (Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin)	Vernetzung der DNA-Stränge, Induktion der Apoptose	Cisplatin/ Carboplatin Monotherapie; Cisplatin/ Carboplatin-Kombinations-therapie mit 5-Fluorouracil und mit oder ohne Paclitaxel	Nephrotoxizität, Ototoxizität, Neurotoxizität, Knochenmark-suppression, Erbrechen, Elektrolyt-verschiebungen	Intrazelluläre Zunahme von Glutathion, SH-Gruppen tragende Metallproteine, Cisplatin-resistente Gene	[29-31]
Taxane (Paclitaxel, Docetaxel)	Verhinderung der Depoly-merisation der Mikrotubuli (Hemmung der Mitose)	Paclitaxel in Kombination mit Cisplatin/ Carboplatin und mit oder ohne 5-Fluorouracil	Kardiotoxizität, Erbrechen, Übelkeit, Knochenmark-suppression, Neurotoxizität, Hepatotoxizität	Vermehrte Expression des MDR-1-Gens und des P-Glykoproteins	[29-32]
Cetuximab	Monoklonaler EGFR-Antikörper	Cetuximab in Kombination mit Strahlen-therapie, Monotherapie bei Cisplatin-resistenz	Atemnot, Über-empfindlich-keitsreaktionen (Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit, Erbrechen, Hautausschlag), neuromuskuläre Schwäche	Fehlregulation der EGFR-Internalisierung und des Abbaus, EGFR-abhängige Aktivierung von HER3, KRAS-Mutation	[28, 30, 33, 34]

Tabelle 2: Aktuelle chemotherapeutische Behandlungsstrategien von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches

Dargestellt sind die wichtigsten aktuellen Chemotherapeutika, die in der Behandlung von HNSCC Verwendung finden.

EGFR: Epidermal Growth Factor Rezeptor; MDR: Multi Drug Resistance; HER3: Human Epidermal Growth Factor Rezeptor 3; KRAS: Kirsten Rat Sarcoma. In Anlehnung an [35].

1.3 Allgemeine Tumorbilogie bei HNSCC

Die Kanzerogenese umfasst einen mehrstufigen Prozess, welcher aus einer Häufung von genetischen sowie epigenetischen Defekten und somit konsekutiv zu einer klonalen Expansion einer Zellpopulation führt (*Mehrschritt-Theorie* der Krebsentstehung) [36]. Dieser mehrstufige Prozess bis zum invasiven Karzinom schließt Zwischenstufen, sogenannte Dysplasien, ein, worunter man eine Proliferation atypischer neoplastischer Zellen innerhalb des Epithelverbandes versteht. Da Dysplasien häufig mit einer abnormen Verhornung und einer weißen Verfärbung einhergehen, werden sie auch als Leukoplakien (griech. leukós - „weiß“,

griech. plakós - „Fläche“) bezeichnet [37]. Die Transformationsrate einer oralen Leukoplakie zu einem invasiven Plattenepithelkarzinom wird mit einer Frequenz von 1 - 2 % pro Jahr angenommen [38]. Damit malignes Wachstum möglich ist, werden auf Zellebene sechs pathophysiologische Veränderungen als notwendig angesehen: autonome Produktion von Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose), ausgeprägte Proliferationsneigung, anhaltende Gefäßneubildung (Angiogenese) sowie Gewebsinfiltration als Teil der Metastasierung [36]. Für manche dieser pathophysiologischen Charakteristika sind auf molekularer Ebene Veränderungen in Signaltransduktionswegen bei HNSCC nachgewiesen worden, welche das maligne Verhalten erklären und neue therapeutische Angriffspunkte offerieren. Als Beispiele seien an dieser Stelle der „P53-Pathway“ in Bezug auf die ausgeprägte Proliferationsneigung oder der „EGFR-Pathway“ sowie der „TGF- β -Pathway“ in Bezug auf die veränderte Produktion von Wachstumssignalen genannt [39]. Weiterhin konnten für Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereiches molekulare Strategien aufgezeigt werden, mit denen sie sich den inhibitorischen oder zytotoxischen Effekten der Zytokine sowie der Zellen des Immunsystems entziehen und somit ein eigenes Tumormikromilieu schaffen [40]. Auf dieses Mikromilieu, besonders auf die Zytokine von HNSCC, wird im nun folgenden Kapitel gesondert eingegangen.

1.4 Zytokine

Zytokine sind lösliche Proteine niedrigen Molekulargewichtes, welche von vielen Körperzellen sowie nahezu allen Zellen des Immunsystems gebildet werden und vielfältige interzelluläre Kommunikationsprozesse vermitteln können [41]. Sie sind fähig sowohl stimulierende als auch inhibitorische Funktionen auf die Proliferation und Differenzierung von Zielzellen auszulösen. Weiterhin können Zytokine auf verschiedene Zielzellen wirken, d. h. sie sind pleiotrop, und können dort spezifische Funktionen vermitteln, d. h. sie sind redundant [42].

Die Klassifikation der Zytokine kann entweder nach der Gruppenzugehörigkeit in Hämatopoetine/Interleukine (IL), Interferone (IFN), Immunglobuline (Ig), Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie sowie Chemokine oder der immunologischen Funktion nach in T-Helfer (TH) 1 und TH₂ erfolgen [37, 41]. In dieser Arbeit wird die Einteilung nach der Immunantwort in TH₁- und TH₂-Zytokine, wie bei HNSCC geläufig, verfolgt.

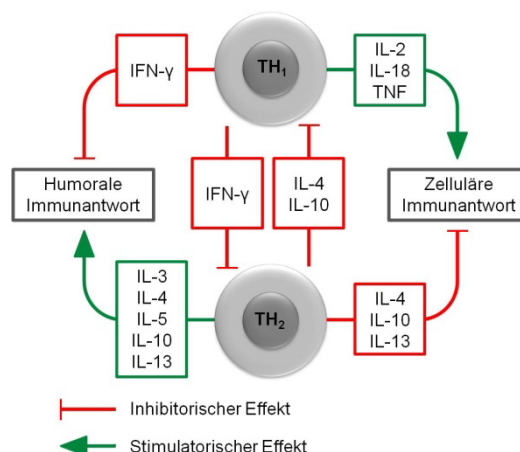


Abbildung 1: Physiologische Funktion der von T-Helfer-Zellen sezernierten Zytokine

Gezeigt sind die inhibitorischen und stimulatorischen Effekte der von T-Helfer-Zellen gebildeten Zytokine. TH₁-Zellen aktivieren die zytotoxischen T-Lymphozyten und damit die zelluläre Immunantwort, TH₂-Zellen die B-Zellen und damit die Antikörperbildung für die humorale Immunantwort. In Anlehnung an [37].

Kommt es, z. B. im Rahmen einer bakteriellen Entzündung, zu einer TH₁ dominierten Immunreaktion, werden Zytokine, wie IL-2 oder TNF- α , sezerniert und es erfolgt eine vorwiegend zelluläre Immunantwort mit Stimulation von zytotoxischen T-Lymphozyten. Bei Aktivierung einer TH₂-Zelle, z. B. im Rahmen einer parasitären Erkrankung, werden hingegen B-Zell-aktivierende Zytokine, wie IL-4, gebildet und es kommt über das Stadium der Plasmazelle zur Antikörperbildung und damit zur humoralen Immunantwort. In gesunden Personen wird ein Gleichgewicht zwischen den beiden Arten der Immunantwort beobachtet [43].

1.4.1 Zytokine in HNSCC

In Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches konnten hohe Zytokinlevel nachgewiesen werden, besonders der Zytokine bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor), IL-6 (Interleukin-6), IL-8 (Interleukin-8), PGE₂ (Prostaglandin E₂) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) [41].

Alle HNSCC-relevanten Zytokine mit den ihnen zugeschriebenen Funktionen sind graphisch in Abbildung 2 (Seite 7) dargestellt sowie in Tabelle 3 (Seite 8) aufgeführt.

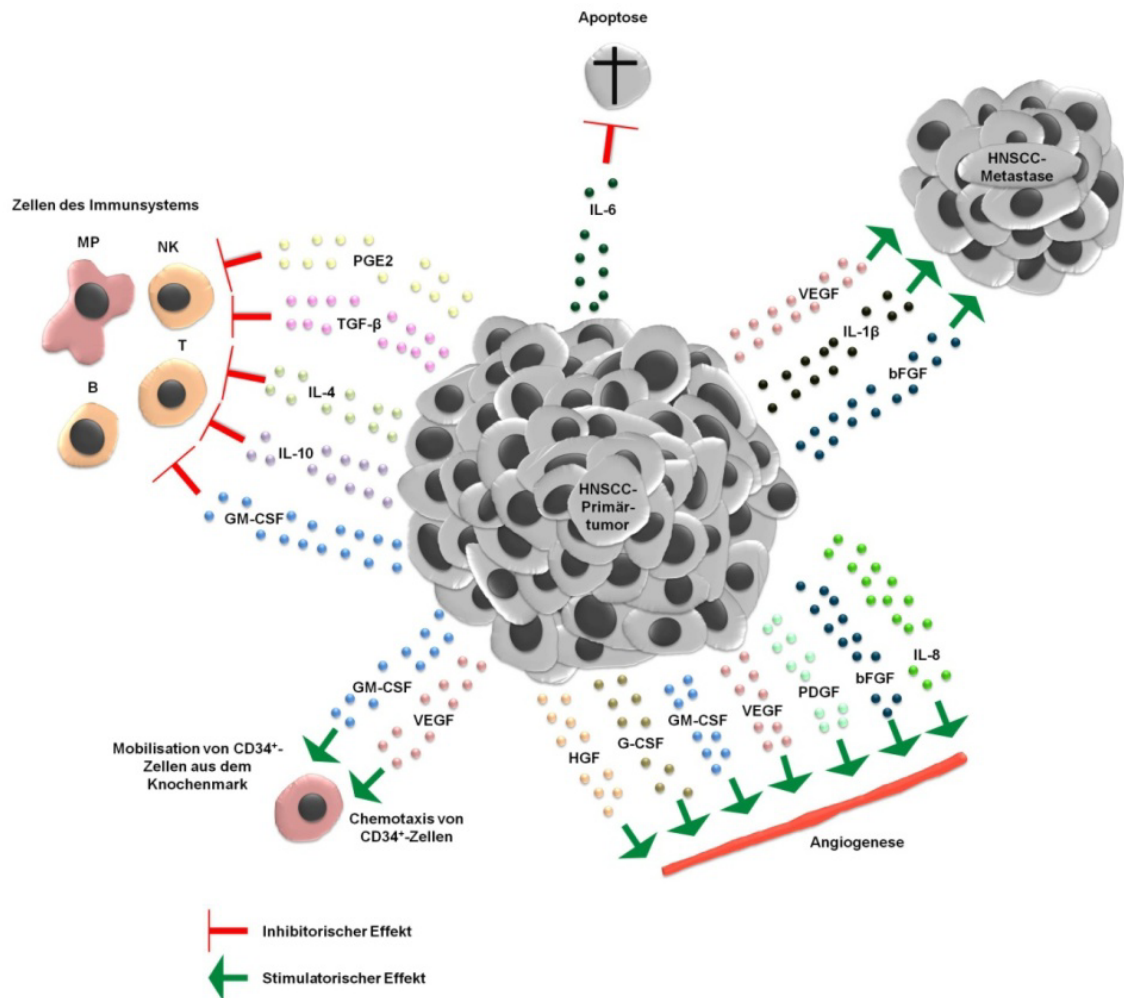


Abbildung 2: Auswahl HNSCC-relevanter Zytokine mit ihren Funktionen im Mikromilieu

Graphisch dargestellt sind die HNSCC-relevanten Zytokine mit den ihnen zugeschriebenen Funktionen. Detaillierte Funktionsbeschreibung siehe Tabelle 2 und Text.

MP: Makrophage; NK: Natürliche Killerzelle; T: T-Lymphozyt; B: B-Lymphozyt; HNSCC: Head and neck squamous cell carcinoma; Abkürzungen der Zytokine siehe Text zu Tabelle 3.

Zytokine	zugeschriebene Funktionen	Referenzen
bFGF	Angiogenese, Metastasierung	[41, 44, 45]
G-CSF	Angiogenese, Proliferation, Migration, Rekrutierung von Entzündungszellen	[44-46]
GM-CSF	Mobilisation von CD34 ⁺ -Zellen, Immunsuppression, Proliferation, Migration, Angiogenese	[41, 45-50]
HGF	Angiogenese	[41, 44, 51]
IL-1	Zytokinsekretion (IL-4, IL-6, GM-CSF)	[48]
IL-1 α	Angiogenese, Proliferation von HNSCC-Zellen, Überlebensfähigkeit, Gelatinase-Produktion	[41, 47, 52, 53]
IL-1 β	Tumorprogression, Resistenz gegenüber NK-Zellen, Metastasierung, Gelatinase-Produktion, Regulation von Snail und E-Cadherin	[53-57]
IL-4	Immunsuppression	[41]
IL-6	Entzündungsregulation, Hemmung der Apoptose, Proliferation, Invasion	[41, 58-61]
IL-8	Angiogenese	[47, 62]
IL-10	Immunsuppression	[41]
MIF	Wachstumsregulation	[63]
PDGF	Angiogenese	[44, 45, 51]
PGE ₂	Immunsuppression	[64, 65]
TGF- β	Immunsuppression	[64]
TNF- α	Tumorentstehung, Gelatinase-Produktion	[53, 66, 67]
VEGF	Angiogenese, Metastasierung, Chemotaxis von CD34 ⁺ -Zellen, Proliferation	[44, 45, 68]

Tabelle 3: HNSCC-relevante Zytokine mit ihren zugeschriebenen Funktionen

Die tabellarische Auflistung umfasst die für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches wichtigen.

bFGF: basic Fibroblast Growth Factor; G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor; GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor; HGF: Hepatocyte Growth Factor; IL: Interleukin; MIF: Macrophage Migration Inhibitory Factor; PDGF: Platelet-Derived Growth Factor; PGE₂: Prostaglandin E₂; TGF- β : Transforming Growth Factor- β ; TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor. In Anlehnung an [41].

In HNSCC konnten eine Reihe von Zytokinen gemessen und ihnen entsprechende Funktionen zugeordnet werden. Eine entscheidende Funktion der von HNSCC gebildeten Zytokinen kommt der Immunmodulation zu [69]. Weiterhin konnte bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich eine Verschiebung des TH₁/TH₂-Gleichgewichtes zugunsten der TH₂-Zytokine beobachtet werden. In erhöhten Konzentrationen wurden die Zytokine IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, HGF, VEGF und GM-CSF nachgewiesen, wohingegen sich die Konzentrationen von IFN- γ erniedrigt zeigten [70, 71]. Für die Zytokinkonzentrationen mancher dieser TH₂-Zytokine konnte zudem eine Abhängigkeit von dem Tumorstadium gezeigt werden: fortgeschrittene Tumorstadien (T3/T4) wiesen höhere IL-6- und IL-10-Konzentrationen auf als günstigere T1/T2-Tumorstadien [72]. Aus dieser TH₂ dominierten Zytokinsekretion ergeben sich prognostische und therapeutische Konsequenzen: wie gezeigt werden konnte, sind hohe

Serumkonzentrationen von bFGF, G-CSF, GM-CSF, HGF und TNF- α mit einer schlechten Prognose assoziiert [44, 45, 73, 74]. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass eine TH₂ dominierte Immunität spezifische Immuntherapien, wie z. B. mit dendritischen Zellen, negativ beeinträchtigt [75].

Die immunmodulatorische Wirkung der Zytokine ist dabei nicht nur lokal begrenzt: so werden CD34⁺-Progenitorzellen vom tumorgebildeten GM-CSF aus dem Knochenmark in die Blutbahn geschwemmt und mittels des Zytokins VEGF, welches ebenfalls vom Tumor gebildet wird, chemotaktisch angelockt [49, 50, 68, 76]. Die Funktion dieser CD34⁺-Progenitorzellen kann entweder in der Differenzierung in Endothelzellen und damit in der Angiogenese oder auch in der Immunmodulation durch Differenzierung in dendritische Zellen liegen [77-79]. Ebenfalls wird eine Differenzierung dieser tumorinfiltrierenden Knochenmarks-Stammzelle in eine Tumorstammzelle diskutiert [80].

1.4.2 Einfluss von Zytostatika auf die Zytokinsekretion

Eine geringe Anzahl von Studien konnte zeigen, dass es bei HNSCC-Patienten unter einer Radiochemotherapie zu Zytokinveränderungen im Serum kommt. Jedoch liegen keine Untersuchungsergebnisse unter einer alleinigen Chemotherapie vor, da klinisch häufig eine Kombination dieser beiden Behandlungsansätze gewählt wird. Die meisten Studien beinhalten die Zytokine IL-6 und IL-8, welche unter einer Radiochemotherapie einen Konzentrationsanstieg im Serum erfuhren [81, 82]. Auch ein Konzentrationsabfall von TNF- α konnte gemessen werden [81]. Silver et al. stellten vier Wochen nach einer Radiochemotherapie mit Paclitaxel und Carboplatin einen Konzentrationsanstieg von IL-6, IL-8, IL-10 und IL-1 β fest [82]. Meirovitz et al. konnten zwei Wochen nach einer Radiochemotherapie, bestehend aus 5-Fluorouracil, Carboplatin, Cisplatin und Docetaxel, einen Konzentrationsanstieg von IL-6 und IL-8 sowie einen Abfall von TNF- α ausmachen. Veränderungen in der Serumkonzentration von IL-1 und IL-10 konnten nicht festgestellt werden. In Bezug auf das Zytokin bFGF divergieren die Angaben in der Literatur [81, 83].

Studien zu Untersuchungen ex vivo sind kaum vorhanden. Lediglich Poth et al. publizierten eine erhöhte IL-6-Expression sowie verstärktes karzinogenes Potential anhand Cisplatin behandelter Zellen [84].

1.5 Tumorstammzelltheorie

Bei Stammzellen handelt es sich der Definition nach um eine Subpopulation von proliferierenden Zellen, die noch gar keinen oder nur einen sehr geringen Differenzierungsgrad, aber die ausdauernde Fähigkeit zur Bildung verschiedensten Zellen innerhalb eines Gewebes besitzen. Trotz ihrer Teilung mit Bildung unterschiedlichster Zellen erhalten sie ihre eigene Zellpopulation aufrecht und bilden somit das Reservoir zum Ersatz defekter oder abgestorbener Zellen [85].

Dass „Krebs“ aufgrund einer unreifen Zelle entsteht, wurde schon vor mehr als 150 Jahren von dem deutschen Pathologen Rudolf Virchow in seiner Theorie über die Cellularpathologien vermutet [86]. Erst knapp 100 Jahre später, 1959, führte Sajiyo Makino den Begriff *Tumorstammzelle* (Cancer Stem Cell; CSC) für eine kleine Subpopulation von Zellen ein, welche sich durch Unempfindlichkeit und genetische Eigenschaften von der Hauptmasse des Tumors unterscheiden [87]. Pierce et al. konnten einige Jahre später anhand mehrerer Tumorentitäten sowohl eine Heterogenität maligner Gewebe nachweisen, als auch die Fähigkeit zur Bildung gutartiger Gewebe durch maligne undifferenzierte Tumorzellen [88, 89]. Seine Untersuchungsergebnisse veranlassten Pierce als einen der ersten Forscher den Begriff *Tumorstammzelle* zu definieren [90]: „Ein Konzept der Neubildungen, basierend auf Entwicklungs- und onkologischen Prinzipien, welches besagt, dass Karzinome Karikaturen der Gewebeerneuerung sind, die zusammengesetzt sind aus vielfältigen malignen Stammzellen, die eine bestimmte Fähigkeit zur Proliferation und eine limitierte Kapazität zur Differenzierung unter normalen homöostatischen Bedingungen besitzen und möglicherweise gutartige Tochterzellen dieser malignen Zellen bilden können.“

Die erste Bestätigung über die Existenz von CSC wurde kurz vor der Jahrtausendwende veröffentlicht: bei der akuten myeloischen Leukämie konnte gezeigt werden, dass lediglich durch Transplantation einer $CD34^+CD38^-$ -Subpopulation eine Leukämie in einer immundefizienten Maus erzeugt werden kann [91, 92]. Es folgten viele verschiedene Studien, welche die Existenz einer Subpopulation mit tumorstammzellspezifischen Eigenschaften nicht nur bei Leukämieformen, sondern auch bei einer Vielzahl von soliden Tumorentitäten nachweisen konnten: Bronchial-Karzinom [93], Glioblastom [94], Hepatocelluläres Karzinom [95], Kolorektales Karzinom [96], Malignes Melanom [97], Mamma-Karzinom [98], Pankreas-Karzinom [99], Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches [100], Prostata-Karzinom und Ovarial-Karzinom [101, 102]. Die meisten Studien beruhten dabei auf der Versuchsdurchführung, dass ein Marker oder eine Markerkombination, für welche eine heterogene Expression in Tumoren nachgewiesen werden konnte, ausgewählt wurde. Nach positivem oder negativem Markernachweis wurden die Zellen durchflusszytometrisch sortiert und in eine immundefiziente Maus transplantiert. Wochen oder Monaten später sind Unterschiede in der Tumorentstehung als

Beweis für die Existenz von Tumorzellen mit stammzellspezifischen Eigenschaften interpretiert worden [103].

Folgende Eigenschaften werden für tumorstammzellspezifisch gehalten und sind den gesunden Gewebestammzellen (Somatic Stem Cells; SSC) in Tabelle 4 gegenübergestellt.

Eigenschaften	Normale Gewebestammzellen (SSC)	Tumorstammzellen (CSC)
Anteil im Gewebe	Subpopulation	Subpopulation
Definierende Marker	Größtenteils bekannt	In intensiver Erforschung, nur teilweise bekannt
Differenzierungsgrad	Undifferenziert	Undifferenziert
Gewebespezifität	Vorhanden	Fraglich
Homöostatische Kontrolle	Vorhanden	Verlust
Initiierung auf Einzelzellniveau	Durch symmetrische Teilung möglich	Durch symmetrische Teilung möglich
Kontrolle der Proliferation	Vorhanden	Verlust
Lebensdauer der differenzierten Tochterzellen	Limitiert	Limitiert
Resistenz	Gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie	Gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie
Selbsterneuerung	vorhanden	Unlimitiert vorhanden
Stammzellnische	Notwendig	Vermutlich
Teilungsrate	Gering	Unterschiedlich: hoch bis andauernder Ruhezustand
Unsterblichkeit	vorhanden	vorhanden

Tabelle 4: Vergleich der Eigenschaften von Gewebestammzellen und Tumorstammzellen [103-105]

Tabellarisch vergleichend dargestellt sind die charakteristischen Eigenschaften von normalen Gewebestammzellen sowie Tumorstammzellen. Wie zu erkennen ist, weisen beide Stammzellentitäten große Ähnlichkeiten auf. Dick gedruckt hervorgehoben sind die unterschiedlichen Eigenschaften beider Stammzellen, welche die homöostatische Kontrolle, die Kontrolle der Proliferation sowie die Teilungsrate umfasst.

Wie aus Tabelle 4 zu erkennen ist, unterscheiden sich die tumorstammzellspezifischen Eigenschaften in vielen Hinsichten nur geringgradig von denen der Gewebestammzellen, aber entscheidend im Bezug auf den Kontrollverlust der Proliferation und folglich einer hohen Teilungsrate (fett gedruckt in Tabelle 4). CSC können jedoch auch in einer Art Ruhezustand („dormancy“) verharren, was auf der einen Seite als ein entscheidender Mechanismus für die Resistenz dieser Zellen gegenüber der anti-proliferativen Chemotherapie angesehen wird, auf der anderen Seite das Auftreten von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen lange Zeit nach einer Behandlung erklären würde [103, 106].

Diese enge Verwandtschaft zwischen Gewebe- und Tumorstammzellen lässt die Frage nach dem Ursprungsmechanismus aufkommen. Auch hierfür gibt es bislang nur Hypothesen, die die Genese erklären könnten. Drei Hypothesen werden aktuell diskutiert [80, 107]:

- Entstehung aus Gewebestammzellen
- Entstehung aus differenzierten Zellen mit multiplen onkogenen Mutationen
- Fusion von Stammzellen und Tumorzellen

Für keine dieser Hypothesen zur Genese von Tumorstammzellen gibt es bisher gesicherte Nachweise, sodass der Entstehungsmechanismus immer noch insgesamt als unklar eingestuft werden muss.

Eine weitere Beobachtung, welche die Tumorstammzelltheorie trägt, ist die Heterogenität, welche bei allen gängigen Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte [103]. Zur Erklärung dieser Heterogenität werden zwei verschiedene Thesen, das stochastische und das hierarchische Modell, herangezogen, welche nun folgend in Abbildung 3 vorgestellt werden.

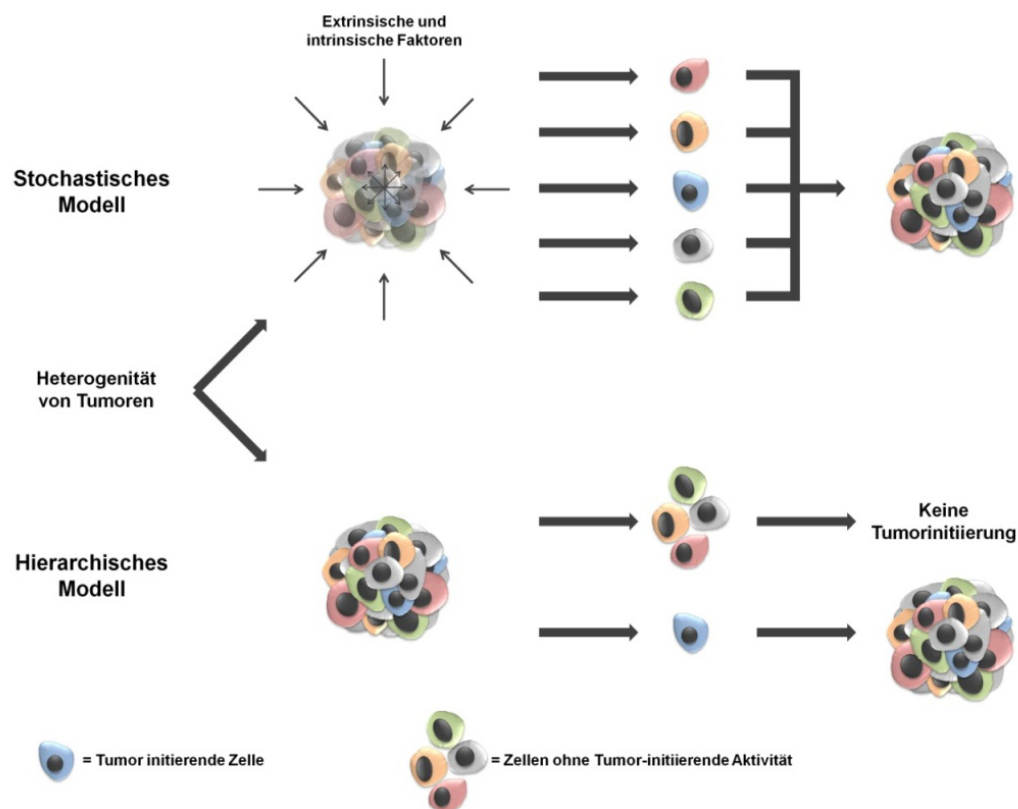


Abbildung 3: Stochastisches versus hierarchisches Modell der Heterogenität von Tumoren

Wie viele Studien gezeigt haben, bestehen Tumore aus phänotypisch und funktionell unterschiedlichen Zellen. Zur Erklärung dieser Beobachtung werden zwei unterschiedliche Modelle herangezogen, das stochastische und das hierarchische Modell. Ausführliche Erklärung siehe Text. In Anlehnung an [108].

Das stochastische oder auch evolutionäre Modell geht davon aus, dass alle Tumorzellen biologisch äquivalent sind. Dieses bedeutet, dass jede Zelle eines Tumors in der Lage ist das Tumorstadium zu beschleunigen und zu initiieren. Die Heterogenität in diesem Modell wird durch Einflüsse von extrinsischen und intrinsischen Faktoren bestimmt, welche konsekutiv zur Ungleichmäßigkeit in Bezug auf die Expression von Markern, dem Eintritt in den Zellzyklus, die Fähigkeit zur Tumorentstehung und somit zu einer Veränderung des Phänotyps führen. Im Gegensatz hierzu beschreibt das hierarchische Modell die Existenz von biologisch verschiedenen Zellklassen mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden und Fähigkeiten. Nur eine Subpopulation, im minimalen Fall eine CSC, würde bei diesem Modell ausreichen, einen Tumor zu initiieren. Der essentielle Unterschied dieser beiden Modelle besteht in der Fähigkeit der Tumorbildung. Bei dem stochastischen Modell ist es allen Tumorzellen gleichermaßen möglich einen Tumor zu erzeugen, während bei dem hierarchischen Modell nur eine gewisse Subpopulation von Zellen diese Fähigkeit der Tumorentstehung besitzt [108]. Welches Modell bei welcher Tumorentität Gültigkeit besitzt, ist bislang noch nicht geklärt. Bei HNSCC lassen sich viele der biologischen Phänomene ausreichend durch das stochastische Modell erklären, wie präneoplastische Läsionen, lokale Rezidive oder sekundäre Karzinome. Problematisch wird jedoch auf Grundlage des stochastischen Modells die Erläuterung der zellulären Heterogenität in Tumornestern, welche sich hingegen ausreichend anhand des hierarchischen Modells verdeutlichen lässt [109].

Weiterhin geht man nach der Tumorstammzelltheorie davon aus, dass die tumorösen Stammzellen in einer sogenannten Tumorstammzellnische lokalisiert sind. Darunter wird eine anatomische Struktur verstanden, bestehend aus zellulären und azellulären Komponenten, welche lokale und systemische Faktoren zur Stammzellproliferation, -differenzierung, -überleben und -lokalisierung beinhaltet. Als Synonym wird häufig auch der Begriff *Mikromilieu* verwendet [110]. Das Konzept der Tumorstammzellnische ist zwar abgeleitet von der physiologischen Gewebestammzellnische, unterscheidet sich aber in vielen Hinsichten von dieser entscheidend durch Faktoren, wie Durchblutung, löslichen Faktoren, aktiven Signalwegen, beteiligten Zellen, und ermöglicht erst damit eine Kanzerogenese und unkontrollierte Proliferation [111, 112]. Die Bestandteile einer Tumorstammzellnische unterliegen dynamischen und individuellen Eigenschaften, dennoch werden folgende Komponenten als Hauptbestandteile angesehen (Abbildung 4; Seite 14) [110, 113]: die Stammzelle selbst, Tumorstammzellen, differenzierte Tumorzellen, Stromazellen, Zellen des Immunsystems, Nervenzellen, lösliche Faktoren, Blutgefäße und Zell-Zell-Kontakte.

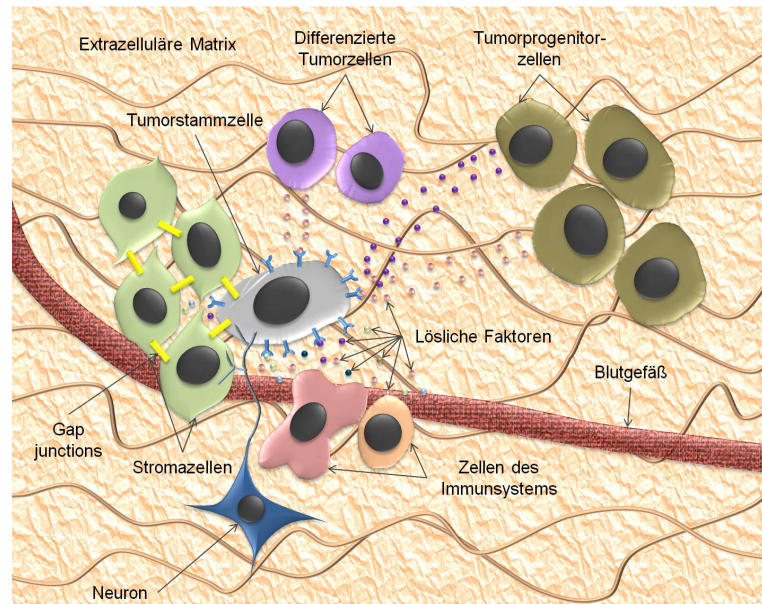


Abbildung 4: Bestandteile der Tumorstammzellnische

Schematische Darstellung der komplexen und dynamischen Struktur einer Tumorstammzellnische mit den wichtigsten Komponenten. Durch dynamischen Veränderungen sowie unterschiedliche biologische Eigenschaften eines Tumors variieren die Bestandteile jeder Tumorstammzellnische. Hier gezeigt ist eine stark vereinfachte und allgemeine Vorstellung einer Tumorstammzellnische. In Anlehnung an [110].

Es wird vermutet, dass die Tumorstammzellnische eine ganz entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung, Differenzierung, Metastasierung und Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie spielt. Weiterhin ist sie auch unter veränderten homöostatischen Bedingungen für die Aufrechterhaltung der Tumorstammzellen verantwortlich. Zu den wichtigsten Einflussfaktoren auf jenes Milieu zählen die Entzündung, die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT, siehe Kapitel 1.6.3, Seite 20), die Hypoxie und die Angiogenese [114, 115].

Zusammenfassend wird die Tumorstammzelltheorie und die Erforschung dieser noch als „in den Kinderschuhen steckend“ bezeichnet, da ein Großteil der durchgeführten Studien an Mäusen erfolgte und eine Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus nur teilweise möglich ist [116]. Um eine Transplantation auf andere Organismen zu vermeiden und um neue therapeutische Strategien zu offerieren, wären verlässliche Tumorstammzellmarker zur Charakterisierung der CSC notwendig [103].

1.6 Potentielle Tumorstammzellmarker bei HNSCC

Die Erforschung von verlässlichen Markern wird als primäres Ziel der Stammzellforschung angesehen. Mit Kenntnis von Markern könnten CSC therapeutisch angegangen und ihre vielleicht einzigartige Biologie verstanden werden [105]. Als potentielle Tumorstammzellmarker kommen sowohl Oberflächenmarker als auch spezifische Marker des Metabolismus und der Signalwege in Frage [109]. Bei der Identifizierung stellt sich häufig das Problem, dass viele Marker auch auf gewöhnlichen Zellen exprimiert werden und somit keine Tumorspezifität besitzen [80]. Im folgenden Absatz ist eine Auswahl von potentiellen Tumorstammzellmarkern zusammengefasst, welche aktueller Gegenstand der Forschung sind und im Rahmen dieser Dissertation Verwendung fanden.

1.6.1 Potentielle Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur

Bei der CD- (Cluster of Differentiation) Nomenklatur handelt es sich um ein Einteilungsprinzip von zellulären Oberflächenmarkern, welche auf Leukozyten gefunden wurden. Ihre physiologischen Funktionen sind vielfältig, sie können entweder als Rezeptoren oder auch als Liganden dienen und tragen somit ganz entscheidend zur Regulation des Immunsystems bei [117]. Aktuell sind über 500 leukozytäre Oberflächenmoleküle beschrieben und über 360 einer CD-Bezeichnung zugeordnet. Ein großer Teil dieser CD-Moleküle kann jedoch nicht nur auf Leukozyten, sondern auch auf vielen anderen Geweben nachgewiesen werden [118].

1.6.1.1 CD34

Bei CD34 handelt es sich um ein Glykoprotein, welches eine Rolle bei der Leukozyten-Migration und bei der Adhäsion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen an Stromazellen oder der extrazellulären Matrix des Knochenmarks spielt. Neben hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen wird CD34 auch auf den Endothelzellen vieler Gewebearten gefunden [119, 120]. Außerdem wird CD34 ein inhibitorischer Effekt bei der hämatopoetischen Differenzierung zugesprochen, wobei die genaue Funktion aktuell noch nicht vollständig geklärt ist [121]. Als Stammzellmarker bei der akuten myeloischen Leukämie hat CD34 Bedeutung in der Onkologie gewonnen [91].

Bei Patienten mit HNSCC konnte im peripheren Blut eine vermehrte Anzahl von CD34⁺-Zellen nachgewiesen werden. Die CD34⁺-Zellen werden durch GM-CSF vom Tumor angelockt, aus dem Knochenmark in die Blutbahn geschwemmt und reichern sich in diesem an [76, 122]. Die Anwesenheit von CD34⁺-Zellen führt u. a. durch eine Aktivitätsminderung von intratumoralen und im peripheren Blut befindlichen T-Zellen zur Immunsuppression [123].

1.6.1.2 CD44

CD44 gehört zu einer Familie von alternativen Splice-Varianten eines transmembranen Oberflächenglykoproteins und ist an Zell-Zell-Interaktionen, Zellmigration, Angiogenese, Proliferation, Lymphozyten-Homing und Adhäsionen sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Funktionen beteiligt [124, 125]. Alle Isoformen des CD44-Membran-Rezeptors bilden eine gemeinsame ligandenbindende Region für Hyaluronsäure, einem Glykosaminoglykans der extrazellulären Matrix [125, 126]. Weitere mögliche Bindungen mit dem CD44-Rezeptor sind für Osteopontin, FGF, Selectin, Collagen und Matrix-Metalloproteinasen beschrieben [126, 127]. Einzug in die Tumorforschung hat CD44 als möglicher Stammzellmarker erhalten, da viele maligne Eigenschaften, wie Tumor-Progression, Migration, Invasion, Metastasierung und Chemoresistenz auf diesen Rezeptor zurückgeführt werden [128-130]. In vielen Tumorentitäten, wie zum Beispiel Colon- [131], Mamma- [98], Pankreas- und Prostata-Karzinom [99, 101], konnte die Standard-Form von CD44 (CD44s) mit tumorinitiierenden Eigenschaften in Verbindung gebracht werden.

In HNSCC ließ sich jener Stammzellmarker sowohl in permanenten Zelllinien als auch in primären Gewebeproben darstellen [100, 132]. Prince et al. berichteten von einer Subpopulation von CD44s⁺-Zellen bei HNSCC-Primärtumoren in einer Größenordnung von weniger als 10 %, welcher stammzellspezifische Bedingungen, wie die Selbsterneuerung und Pluripotenz, zugewiesen werden konnten [100]. Die Literaturangaben in Bezug auf das Expressionsniveau dieses potentiellen Tumorstammzellmarkers bei HNSCC hingegen divergieren, da verschiedene Forschungsgruppen, unabhängig vom Malignitätsgrad und dem Tumorstadium, nachweisen konnten, dass der Großteil der HNSCC-Primärtumorzellen nicht nur CD44s sondern auch CD44v6 exprimiert [133, 134]. Kawano et al. beschrieben durchschnittliche Expressionsraten von 75,4 % bei CD44s und 78,9 % bei CD44v6 [135]. In den Mittelpunkt der Tumorforschung ist die Splice-Variante CD44v6 gerückt, da eine Abhängigkeit zwischen Expression und Metastasierungs- sowie der Überlebensrate gezeigt werden konnte. Ferner ist sie an einem stimulierenden Effekt auf die Proliferation beteiligt [136, 137]. Weiterhin ist bekannt, dass die Expression von CD44s durch den Wnt-Signalweg (siehe Kapitel 1.6.2, Seite 18) und damit die Selbsterneuerung sowie die Differenzierung von Tumorzellen reguliert ist [138]. Eine Rolle von CD44s bei der Metastasierung sowie eine Coexpression zwischen CD44 und CD133 ist ebenfalls beschrieben [139, 140]. Auch konnte anhand von HNSCC-Zelllinien eine signifikant höhere Expressionsrate von Oct-4 in CD44⁺-Zellen im direkten Vergleich zu CD44⁻-Zellen beobachtet werden [141]. Aktuelle Untersuchungen zeigen ferner, dass über eine Downregulation von CD44s das Tumorwachstum effektiv gehemmt werden kann [142].

Jedoch existieren auch widersprüchliche Untersuchungen, die auch CD44s⁻-Zellen Eigenschaften wie Chemoresistenz und Selbsterneuerung zuordnen konnten und lassen die Rolle von CD44s als potentieller Tumorstammzellmarker bei HNSCC komplex erscheinen [143].

1.6.1.3 CD59

CD59, auch Protectin genannt, ist ein Glycosylphosphatidylinositol-verankertes Protein, welches die Bildung des terminalen Membranangriff-Komplexes auf Ebene der Assoziation des Komplementfaktors C9 mit dem Komplex aus C5b, C6, C7 und C8 inhibiert [144, 145]. Auf diese Art und Weise können sich neoplastische Zellen durch eine Überexpression der komplement-abhängigen Zytotoxizität entziehen [146]. Eine Überexpression von Komplementrestriktions-faktoren konnte sowohl bei HNSCC-Zelllinien als auch bei Gewebeproben von HNSCC-Primärtumoren im Vergleich zu nicht-neoplastischem Plattenepithel gezeigt werden [147].

1.6.1.4 CD117

Bei CD117 handelt es sich um einen transmembranen Tyrosinkinase-Rezeptor, welcher ebenfalls als c-Kit (zelluläres (cellular) Homolog des Katzen-(Kitten) Sarkom-Virus) oder als SCFR (Stem Cell Factor Receptor) bezeichnet wird. Das Rezeptor-Protein stellt das Gen-Produkt des Proto-Onkogens c-Kit dar und bindet den Liganden SCF (Stem Cell Factor) [148, 149]. CD117 spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von Stammzellen und ist somit, da es insbesondere von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird, notwendig für die Hämatopoese und die Angiogenese [150, 151]. Überexpressionen und Mutationen im CD117-Proto-Onkogen konnten bei vielen Tumorentitäten nachgewiesen werden, wie z. B. der Mastzell-Leukämie und gastrointestinalen Stromatumoren [152, 153].

Auch in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches konnte man eine Überexpression von CD117 zusammen mit SCF nachweisen [154].

1.6.1.5 CD133

CD133, auch als Prominin oder AC133 bezeichnet, ist ein transmembranäres Glykoprotein, welches auf Oberflächen von hämatopoetischen Stammzellen, auf neuroepithelialen Zellen und verschiedenen anderen embryonalen Epithelzellen gefunden wurde [155, 156]. Die biologische Funktion von CD133 ist bisher nicht bekannt, CD133 gilt aber alleine oder in Kombination mit anderen Markern als Stammzellmarker für eine Vielzahl von Gewebearten [157-159]. Auch in vielen Tumorentitäten, inklusive Bronchial- [93], Kolon- [96], Leber- [95], Pankreas- [160], Prostatakarzinom [161] sowie diversen Gehirntumoren konnte der Marker CD133 identifiziert und den CD133⁺-Zellen stammzellspezifische Eigenschaften zugeschrieben werden [94].

Auch in HNSCC-Zelllinien und Tumorgewebeproben gelang der Nachweis des potentiellen Tumorstammzellmarkers CD133. Des Weiteren konnte nicht nur das Expressionslevel von Nanog/Oct-4/CD133⁺-Zellen bei HNSCC mit einer schlechten Überlebensrate in Verbindung

gebracht werden, sondern auch signifikant erhöhte CD133-Expressionslevel im Serum von HNSCC-Patienten gemessen werden [162-164]. Neuere Studien konnten außerdem zeigen, dass CD133⁺-HNSCC-Zellen eine erhöhte Chemoresistenz aufweisen [165].

1.6.2 Potentielle Tumorstammzellmarker des Wnt-Signalweges

Der Name *Wnt* leitet sich von *Wingless* und *Int-1* ab, da Mutationen im *wingless*-Gen der Taufliege *Drosophila melanogaster* zu einer flügellosen Variante und eine Überexpression des Proto-Onkogen *Int1* (heute *Wnt-1*) zu Brustkrebs bei Mäusen geführt haben. 1987 fand man eine Übereinstimmung dieser beiden Gene und bezeichnete diese als Wnt [166, 167]. Die Wnt-Glykoproteine fungieren als Liganden und binden mit mehreren Kofaktoren an einem Transmembranrezeptorkomplex, welcher aus den Frizzled-Proteinen und dem Corezeptor LRP 5/6, einem Protein aus der LDL Familie, besteht [168-170]. Die intrazelluläre Fortleitung erfolgt über das Protein Dishevelled und spaltet sich in mehrere Signalwege auf, von denen der canonische β -Catenin-Signalweg eine zentrale Rolle einnimmt [171]. Zytoplasmatisches β -Catenin wird bei Inaktivität des Signalweges dauerhaft von den Tumorsuppressoren Adenomatosis polyposis coli (APC) und Axis abgebaut [172]. Die Aktivierung des Wnt-Signalweges führt zur Akkumulation von β -Catenin zytoplasmatisch und nukleär sowie zur Komplexbildung mit dem Tcf/Lef-Transkriptions-Faktor. Der β -Catenin/Tcf/Lef-Proteinkomplex hat die Transkription von Ziel-Genen zur Folge [173]. Die wichtige Funktion des Wnt-Signalweges wird in der Aufrechterhaltung der Pluripotenz, Selbsterneuerung sowie der Differenzierung von embryonalen Stammzellen gesehen [174, 175]. Ebenfalls sind funktionelle Zusammenhänge zwischen dem Wnt-Signalweg und den embryonalen Transkriptionsfaktoren Nanog und Oct-4 beschrieben [176, 177]. Viele Studien konnten zeigen, dass nicht nur verschiedene onkogene Schlüsselgene, wie c-Myc, Cyclin D1 und Cox-2, durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert werden, sondern auch pluripotente Transkriptionsfaktoren wie z. B. Oct-4 [176, 178, 179]. Weiterhin konnten abnormale Aktivitäten des Wnt-Signalweges während der Malignitätsentstehung sowie eine Assoziation von Wnt-Genen mit der Entwicklung von verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden [180-182]. Diese Wnt-Überexpression hat zudem in Tumoren Einfluss auf die Aktivität des EGF (Epidermal-Growth-Factor)-Rezeptors [183]. Auch in HNSCC konnte eine abnormale Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweg und eine Assoziation mit der Entwicklung und der Progression von Tumorzellen beobachtet werden [184].

1.6.2.1 Frizzled-3

Bei Frizzled (FZD) handelt es sich um eine Familie von G-Protein gekoppelten transmembranären Glykoprotein-Rezeptoren, welche mit sekretorischen Wnt-Liganden interagieren und für die intrazelluläre Signalübertragung zuständig sind [169, 185]. Aktuell sind zehn Frizzled-Rezeptoren bekannt, denen wichtige Funktionen in der Embryogenese und der Zellproliferation, aber auch der Karzinogenese zukommen [186]. Dem Frizzled-3-Protein, welches im Jahre 2000 identifiziert und in sehr hoher Expression im zentralen Nervensystem identifiziert wurde, konnten viele wichtige Funktionen bei der neuronalen Entwicklung zugeschrieben werden [187, 188]. In vielen Tumorentitäten, wie dem Ewing Sarkom [189], hepatozellulärem Karzinom [190], Ösophaguskarzinom [191], Prostatakarzinom [192], konnte das Frizzled-3-Protein ebenfalls nachgewiesen werden, teilweise sogar mit einer Überexpression im Vergleich zum gesunden Gewebe. In HNSCC ist FZD3 bisher noch nicht beschrieben.

1.6.2.2 Frizzled-7

Das Glykoprotein Frizzled-7 ist ein weiteres der bisher zehn bekannten Oberflächenproteine des Wnt-Signalweges, welches 1998 von Sagara et al. identifiziert und bisher im gesamten Gastrointestinaltrakt, im Pankreas-, Lungen-, Herz-, Skelettmuskel-, Gehirn- und Plazentagewebe nachgewiesen werden konnte [193, 194]. Ebenfalls hat sich herausgestellt, dass es sich bei dem Frizzled-7-Rezeptor um ein spezifisches Oberflächenprotein von embryonalen Stammzellen handelt, welches eine wichtige Rolle in der Regulation der Selbsterneuerung von Stammzellen spielt [195]. Auch ein funktioneller Zusammenhang mit dem embryonalen Transkriptionsfaktor Oct-4 konnte gezeigt werden, da mit einem Knock-out von FZD7 ein Verlust der Oct-4-Expression sowie der typischen Morphologie undifferenzierter embryonaler Stammzellen einhergeht [195]. Eine Überexpression von FZD7 wurde bisher für das hepatozelluläre Karzinom [196], das kolorektale Karzinom [194], die lymphoblastische Leukämie [197], das Magenkarzinom und das Ösophaguskarzinom bestätigt [191, 198]. Als Grund für die Überexpression wurden Mutationen im APC- oder CTNNB1-Gen beschrieben [199]. Durch eine Down-Regulation des Frizzled-7-Gens mit siRNAs konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Einschränkung der Tumorentstehung, der Invasion, der Progression und der Motilität nachgewiesen werden [196, 200]. Zudem konnten Merle et al. zeigen, dass durch pharmakologische Inhibition des Frizzled-7-Proteins die Progression von Tumoren effektiv gehemmt werden kann [201]. Die angeführten Untersuchungen beziehen sich zumeist auf Neoplasien des Gastrointestinal-Traktes. Jedoch liegt auch eine Studie zur Überexpression von FZD7 in HNSCC vor [202].

1.6.3 Potentielle Tumorstammzellmarker embryonalen Ursprungs und Epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT)

Viele Untersuchungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass eine veränderte Aktivierung eines latenten embryonalen Zellprogramms, bezeichnet als die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT), den Krebszellen Fähigkeiten, wie die Invasion und die Migration, verleihen kann und damit Prozesse, wie die Metastasierung, unterstützt. Die EMT wurde zuerst 1982 von Greenburg und Hay beschrieben und besitzt entscheidende Funktionen in der Embryogenese und der Wundheilung [203, 204]. Diese vielschichtige phänotypische Umwandlung von einem epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp setzt eine organisierte Veränderung der Signaltransduktion sowie der EMT-Transkriptionsfaktoren voraus und hat Auswirkungen auf die Zellkontakte, die Differenzierung und die Migration [204, 205]. Während der Progression von Tumoren wird in der EMT der Schlüssel zur Infiltration des umgebenden Gewebes, der Metastasierung und der Chemoresistenz gesehen [205]. Zudem wurde bestätigt, dass Tumorzellen mit EMT-Phänotyp stammellspezifische Eigenschaften sowie erhöhte Expressionslevel der embryonalen Transkriptionsfaktoren Nanog, Oct-4 und Sox2 aufweisen [206]. Als Initiatorprotein der EMT konnte bei HNSCC Snail ausgemacht werden [207].

1.6.3.1 E-Cadherin

Bei E-Cadherin (Epithelial Calcium adhering) handelt es sich um ein Calcium-abhängiges transmembranes Glykoprotein aus der Cadherin-Superfamilie. Seine hauptsächliche Funktion wird in der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten gesehen, wobei auch eine Beteiligung an der Zellpolarität, der Embryogenese sowie verschiedenen Signaltransduktionen für E-Cadherin beschrieben wurden [208, 209]. E-Cadherin besteht aus zwei Domänen, wobei die extrazelluläre Domäne mit benachbarten Zell-Rezeptoren interagiert und die zytoplasmatische Domäne β -Catenin (siehe Wnt-Signalweg, Kapitel 1.6.2, Seite 18) bindet [210, 211]. Während der Tumorentstehung kann E-Cadherin durch verschiedene Mechanismen, einschließlich posttranslationaler Modifikation, somatischer Mutation und/oder transkriptionaler Repression funktionell inaktiviert oder reduziert sein [212]. Auch das zytoplasmatische β -Cateninlevel, welches zur Aufrechterhaltung von E-Cadherin notwendig und häufig in HNSCC reduziert ist, hat direkte Auswirkungen auf die E-Cadherinexpression [202, 213]. Eine Reduktion oder ein Verlust der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte wird als wichtiger Schritt der Invasion und Metastasierung von vielen epithelialen Tumorentitäten, einschließlich HNSCC, angesehen [214, 215]. Weiterhin wird in der abnormen Expression von E-Cadherin eine Schlüsselrolle der EMT gesehen [216]. In der Literatur sind Expressionsraten von HNSCC-Primärtumoren mit 82,5 – 85 % angegeben, wobei mit dem Ausprägungsgrad der lymphogenen Metastasierung das Expressionslevel von E-Cadherin abnimmt [135, 217].

1.6.3.2 Snail

Snail ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor aus der Snail-Familie (Snail, Snailp, Slug, Scratch1 und Scratch2), welcher 1984 in der Taufliege *Drosophila* entdeckt wurde [218]. Mittlerweile gelang auch der Nachweis in vielen verschiedenen anderen Wirbeltieren, einschließlich dem Menschen [219]. Diesem Transkriptionsfaktor konnte eine essentielle Rolle in der Entwicklung des Mesoderms, Neuroektoderms und einigen Organen zugeschrieben werden [220]. Eine entscheidende biologische Funktion der Snail-Proteine ist die Inhibition von E-Cadherin auf Promoter-Ebene, was einen Verlust der epithelialen Adhäsionsmoleküle zur Folge hat [221]. Durch diesen Zell-Zell-Kontaktverlust wird Snail als zentraler Regulator der EMT diskutiert und scheint damit an einigen Pathologien, wie der Fibrose von Organen und der Tumorbilogie, beteiligt zu sein [222, 223]. In vielen menschlichen Tumorzellen konnte nicht nur Snail nachgewiesen, sondern diesem Transkriptionsfaktor eine wesentliche Rolle an der EMT-vermittelten Zunahme der Motilität, Progression, Aggressivität und Invasion zugeschrieben werden [220, 221]. Bei Brustkrebs ist darüber hinaus eine Snail-Überexpression mit einer erhöhten Rezidivrate assoziiert [224]. Auch in HNSCC konnte Snail nachgewiesen und eine negative Korrelation zwischen der E-Cadherin- und der Snail-Expression beobachtet werden [225]. Außerdem wurde anhand von HNSCC-Zellen gezeigt, dass Snail alleinig in der Lage ist eine EMT einzuleiten und dass dessen Expressionslevel mit der Invasion, Metastasierung, lokalen Rezidivrate sowie Chemoresistenz korreliert [207, 226-228]. Induzierbar ist die Überexpression von Snail und die Suppression von E-Cadherin in HNSCC durch proinflammatorische Zytokine, wie z. B. IL-1 β [57].

1.6.3.3 Goosecoid

Bei Goosecoid (GSC) handelt es sich um ein Homöoboxgen, welches während der frühen Gastrulation exprimiert wird [229]. Die höchste Konzentration wurde in der dorsalen Urmundlippe im Bereich des Signalzentrums *Spemanns Organisator* gemessen, weshalb Goosecoid auch als *Spemann Organisator-Gen* bezeichnet wird [230]. Über eine Stimulation des Protein Forkhead-Box C2 (FOXC2) sowie des TGF- β (Transforming Growth Factor β)-Signalwegs induziert Goosecoid die EMT und damit die Metastasierung sowie Malignität von Tumoren [231, 232]. Eine Beschreibung von Goosecoid bei HNSCC liegt bisher nicht vor.

1.6.3.4 Oct-4

Bei dem Protein Oct-4 (Octamer-binding transcription factor 4), welches auch unter den Synonymen Oct-3 und POU5F1 (POU Domäne, Klasse 5, Transkriptions-Faktor 1) bekannt ist, handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der POU Familie, welcher von dem Gen POU5F1

kodiert wird. Durch alternatives Splicing entstehen aus dem Gen POU5F1 drei Varianten: Oct-4A (POU5F1_iA), Oct-4B (POU5F1_iB) und Oct-4B1 (POU5F1_iB1) [233]. Oct-4 ist notwendig für die Selbsterneuerung und Pluripotenz von embryonalen Stammzellen [234]. Ein Verlust des Oct-4-Gens in der frühen embryonalen Phase, wie an einer loss-of-function-Mutation für Oct-4 an Mäusen nachgewiesen werden konnte, hatte einen letalen Ausgang wegen der übermäßigen Differenzierung pluripotenter Ektodermalzellen im Trophektoderm zur Folge [235]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein bestimmtes Oct-4-Expressionsniveau erforderlich ist, um die Pluripotenz von embryonalen Stammzellen aufrecht zu erhalten [236]. Mittels einer Ein-Faktor-Induktion von Oct-4 ist es außerdem gelungen aus adulten Zellen pluripotente Stammzellen zu generieren [237].

Vielfältige Studien an nicht-tumorösem Gewebe sowie an Tumorzellen verdeutlichen, dass Oct-4 nicht nur in embryonalen Stammzellen, sondern auch in adulten Gewebestammzellen, immortalisierten nicht-tumorösen Zellen, Tumorzellen sowie Tumorzelllinien, jedoch nicht in entdifferenzierten Zellen exprimiert wird [163, 238, 239]. Oct-4 spielt somit eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese [238]. Auch in HNSCC konnte sowohl in Zelllinien als auch in Tumorgewebeproben Oct-4 nachgewiesen sowie eine positive Korrelation zwischen der Anzahl von Oct-4/Nanog/CD133-dreifach positiven Zellen und fortgeschrittenen Tumorstadium beobachtet werden [141, 163]. Ferner konnte eine Korrelation zwischen der Expression von Oct-4 sowie der Invasion bei HNSCC gezeigt werden [240].

Untersuchungen der letzten Jahre konnten bestätigen, dass die Oct-4 typischen Charakteristika, wie Pluripotenz und Selbsterneuerung, nicht durch alle Oct-4 Isoformen vermittelt werden können. Nur die Oct-4A-Isoform mit Lokalisation im Nucleolus wird für stammzellspezifische Eigenschaften verantwortlich gemacht, nicht jedoch die Oct-4B-Isoform mit zytoplasmatischer Lokalisation [241, 242]. Auch die Beteiligung an der Karzinogenese wird als Funktion der Oct-4A-Isoform angesehen [242]. Da Oct-4B unter zellulären Stressbedingungen hochreguliert wird, werden dieser Isoform Funktionen, wie Schutz vor der Apoptose und allgemeine Zellprotektion gegenüber Stress, zugeschrieben [243]. Über die dritte Splice-Variante Oct-4B1 und deren Funktion ist bisher nichts bekannt, sie wird ebenfalls als möglicher Marker für stammzellspezifische Eigenschaften diskutiert [244, 245].

1.6.3.5 Sox2

Sox2 (Sry-related HMG-box) ist ein DNA-bindendes Protein, welches zur Familie der HMG (High Mobility Group) gehört [246]. Der Transkriptionsfaktor Sox2 wird in embryonalen Stammzellen sowie Blastozysten exprimiert und ist erforderlich für den Fortbestand von Epiblast sowie extraembryonalem Ektoderm [247]. Sox2 kann mit Oct-4 und Nanog das undifferenzierte Stadium von embryonalen Stammzellen aufrechterhalten [248]. Weiterhin wurde bestätigt, dass Sox2 in Kombination mit Oct-4, c-Myc und KLF4 in der Lage ist, aus adulten Gewebezellen

pluripotente Stammzellen zu induzieren [249]. Sox2 spielt eine ganz entscheidende Rolle bei der Neurogenese und bleibt auch in adulten neuronalen Stammzellen detektierbar [250, 251]. Mutationen im Sox2-Gen führen neben der Anophthalmie zum beidseitigen Hörverlust sowie zu verschiedenartigen Hirnanomalien [252].

Viele aktuelle Studien konnten zeigen, dass Sox2 nicht nur an der physiologischen Organogenese, sondern auch an der Karzinogenese beteiligt ist [253, 254]. Neben vielen Tumorentitäten konnte auch in HNSCC Sox2 nachgewiesen werden [255].

1.6.3.6 Nanog

Der Name Nanog leitet sich ab von *Tir Na Nog*, dem *Land der ewigen Jugend* aus einer irischen Sage, welchen ihm bei seiner Entdeckung 2003 die Forscher um Mitsui et al. gegeben haben. Bei Nanog handelt es sich um einen Homöobox Transkriptionsfaktor, welcher neben Oct-4 und Sox2 als Hauptfaktor für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz angesehen wird [256, 257]. Nanog ist erforderlich für die Embryonal- und Keimbahnentwicklung. Ein Mangel an Nanog resultiert in einem Verlust der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen und einer Fixierung in einem präpluripotenten, undefinierten Stadium [258]. Untersuchungen der letzten Jahre konnten zeigen, dass Nanog eine wichtige Rolle in der Karzinogenese von soliden Tumoren spielt. Eine Überexpression dieses Transkriptionsfaktors konnte für viele Tumorentitäten bestätigt werden, wie zum Beispiel für das kolorektale Karzinom [259], Mammakarzinom [98], Ovarialkarzinom [260], Prostatakarzinom und nicht zuletzt für HNSCC [261, 262].

1.6.3.7 Sox17

Bei Sox17 (Sry-related HMG-box) handelt es sich um einen weiteren der insgesamt 20 bekannten Transkriptionsfaktoren der HMG-Familie (High Mobility Group) [263]. Sox17 wird in den verschiedensten humanen Geweben exprimiert und ist involviert in die Angiogenese, die Bildung des Endoderms, die Entwicklung von Oligodendrozyten und die Regulation von Stammzellfunktionen [264-267]. Weiterhin ist gezeigt worden, dass verschiedene Sox-Proteine, darunter auch Sox17, einen supprimierenden Effekt auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg ausüben [263]. Über diesen inhibitorischen Effekt kommt Sox17 eine Tumorsuppressorfunktion zu: so führt eine Down-Regulation von Sox17 über eine verstärkte Aktivierung des Wnt-Signalweges zur Förderung maligner Progression [268]. Eine Beschreibung von Sox17 bei HNSCC ist in der Literatur nicht zu finden.

1.6.3.8 GATA-4

Die GATA-Familie, benannt nach der Fähigkeit die DNA-Sequenz *GATA* zu binden, beinhaltet Transkriptionsfaktoren mit einer Zinkfingerdomäne [269]. GATA-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Embryogenese, Zelldifferenzierung und Genregulation [270, 271]. GATA-4 wird exprimiert von endodermal-abgeleiteten Organen, einschließlich Herz, intestinalen Epithels, Gonaden, Lungen, Ovarien und Hoden [269, 272-274]. In vielen Neoplasien dieser Gewebearten, mit Betonung auf den oberen Gastrointestinaltrakt, konnte GATA-4 nachgewiesen und diesem Transkriptionsfaktor eine tumorsupprimierende Wirkung zugeschrieben werden [275, 276]. In HNSCC ist GATA-4 bisher nicht beschrieben.

1.6.4 Einfluss von Zytostatika auf die Expression potentieller Tumorstammzellmarker

Patienten mit fortgeschrittenen HNSCC (UICC III und IV), welche einer primären Radiochemotherapie zugeführt worden sind, weisen mit einer lokalen Rezidivrate von 56 % und einer medianen Überlebenszeit von 34 Monaten eine schlechte Prognose [4]. Folgender Ablauf wird nach der Tumorstammzelltheorie für diese hohen Rezidivraten sowie der damit vergesellschafteten schlechten Prognose verantwortlich gemacht und ist in Abbildung 5 dargestellt: wenn Tumorreste nach der operativen Resektion in situ verbleiben oder der Tumor primär inoperabel ist, führen Radio- und/oder Chemotherapie zur Reduktion der Tumormasse (Bulk), es überleben jedoch therapieresistente Tumorstammzellen, welche aufgrund ihrer stammzellspezifischen Eigenschaften in der Lage sind einen neuen Tumor und damit ein Rezidiv entstehen zu lassen [80].

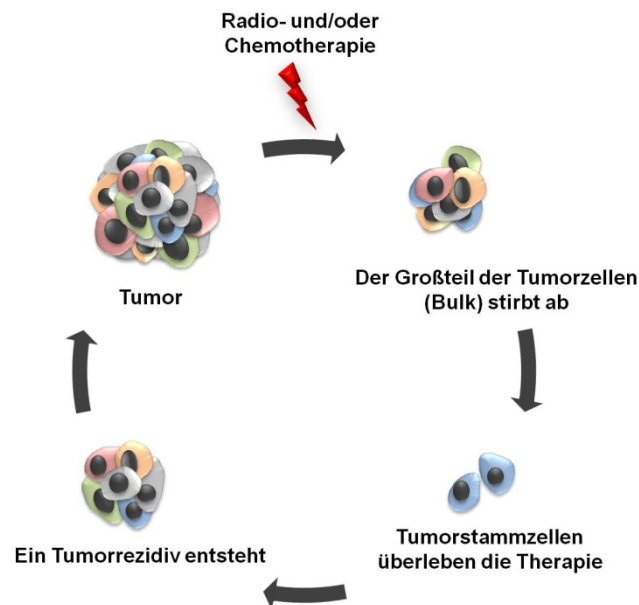


Abbildung 5: Kreislauf der Entstehung von Tumorrezidiven nach der Tumorstammzelltheorie

Nach der Tumorstammzelltheorie geht man davon aus, dass unter Radio- und/oder Chemotherapie eines heterogenen Tumors die enddifferenzierten Tumorzellen absterben und nur die therapieresistenten Tumorstammzellen überleben, welche für die Generierung von Rezidiven verantwortlich sind. In Anlehnung an [80].

Die Anzahl von Studien über den Einfluss von potentiellen Stammzellfaktoren bei HNSCC unter Radio- oder Chemotherapie ist überschaubar. Su et. al. konnten anhand einer HNSCC-Zelllinie zeigen, dass $CD44^{+}$ -Zellen sowohl gegenüber einer Bestrahlung als auch gegenüber den Zytostatika Cisplatin und Docetaxel höhere Überlebensraten aufweisen als $CD44^{-}$ -Zellen. Weiterhin gelang ihnen der Nachweis, dass $CD44^{+}$ -Zellen ein signifikant höheres Oct-4-Expressionslevel besitzen als $CD44^{-}$ -Zellen [141]. Eine ähnliche Beobachtung machten Gammon et al., nur wählten sie als zytostatischen Wirkstoff Mitomycin C [277]. Yang et al. wiesen mit einem ähnlichen Versuchsaufbau nach, dass $CD133^{+}$ -Zellen eine höhere Chemoresistenz gegenüber den Wirkstoffen 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel besitzen als $CD133^{-}$ -Zellen [165]. Felthaus et al. publizierten zum fast identischen Zeitpunkt die Beobachtung, dass mit Paclitaxelbehandlung einer HNSCC-Zelllinie eine signifikant erhöhte Zellzahl von $CD133^{+}$ -Zellen angereichert werden konnte [278]. Für die erhöhte Resistenz gegenüber einer Chemotherapie konnten sowohl bei $CD44^{+}$ - als auch bei $CD133^{+}$ -Zellen eine erhöhte Expression der Gene ABCB1, ABCG2, CYP2C8 und TERT, welche ATP-abhängige Efflux-Pumpen kodieren, mitverantwortlich gemacht werden [139]. Des Weiteren ließ sich in HNSCC-Zelllinien eine tumorstammzellähnliche Population (Hoechst 33342) nachweisen, welche neben einem erhöhten Expressionslevel von Oct-4 eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil zeigte [279]. Ferner konnte in aktuellen Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Expressionslevel von $CD44^{+}$ - und $Oct-4^{+}$ -Zellen sowie einer erhöhten Rate von Lokalrezidiven und ein schlechteren Prognose nach Bestrahlung hergestellt werden [280].

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Besonders in fortgeschrittenen Tumorstadien von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (UICC III und IV) stellt die systemische Chemotherapie, meist im Rahmen einer multimodalen Therapie, eine Behandlungsoption dar [24]. Mit lokalen Rezidivraten von über 50 % nach alleiniger Radiochemotherapie ist die Entstehung eines Rezidivs, welches therapeutisch schwer anzugehen ist, ein häufiges Problem in der Therapie des HNSCC [4, 281]. Die biologischen Auswirkungen einer systemischen Chemotherapie sowohl auf das Mikromilieu als auch den Tumor selbst sind aber weitestgehend unverstanden.

Die Arbeit gliedert sich in zwei Hauptteile:

1. Einfluss einer in-vitro-Chemotherapie auf die Zytokinsekretion von HNSCC:

Zytokine spielen im Mikromilieu von HNSCC durch die Immunmodulation eine wichtige Rolle [69]. Bei Patienten mit HNSCC wurde eine Verschiebung des TH₁/TH₂-Gleichgewichtes zugunsten der TH₂-Zytokine beobachtet [70, 71]. Eine kombinierte Radiochemotherapie führte zum weiteren Zytokinanstieg der TH₂-dominierten Immunantwort. Die Studien hierzu beschränken sich auf die Bestimmung der Serumzytokine [81, 82]. Über lokale Zytokinveränderungen einer Zytostatikabehandlung und deren Auswirkungen auf das TH₁/TH₂-Gleichgewicht ist in der Literatur bisher nichts bekannt. Da diese Zytokin-Inbalance Auswirkungen auf spezifische Immuntherapien besitzt, galt es das TH₁/TH₂-Gleichgewicht im Rahmen einer lokalen in-vitro-Chemotherapie zu untersuchen [75].

2. Expression verschiedener potentieller Tumorstammzellmarker in HNSCC und Einfluss einer in-vitro-Chemotherapie auf die Markerexpression:

In der onkologischen Forschung der letzten Jahre hat sich zunehmend die Tumorstammzelltheorie durchgesetzt, welche besagt, dass eine kleine Subpopulation von Tumorzellen für die malignen Eigenschaften, wie Aufrechterhaltung, Differenzierung, Initiierung, Resistenz, Selbsterneuerung und nicht zuletzt die Metastasierung von Tumorzellen verantwortlich ist [103, 105]. Verlässliche Tumorstammzellmarker zur Identifizierung und gezielten Behandlung dieser Zellen bei HNSCC fehlen weitestgehend [80]. Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit war es daher, verschiedene potentielle Tumorstammzellmarker in HNSCC-Zelllinien und Tumorgewebeproben nachzuweisen und das Expressionsverhalten dieser markertragenden, potentiellen Tumorstammzellen unter in-vitro-Chemotherapie zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Verwendete Laborgeräte

Geräte	Hersteller
AxioCam MRn	Carl Zeiss GmbH, Göttingen
Bio-Plex® – System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BioPhotometer Spectrometer	Eppendorf AG, Hamburg
CO ₂ -Inkubator	Heraeus/Kendro, Hanau
Durchflusszytometer FACS Canto™	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Elektrische Feinwaage AK160	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss GmbH, Göttingen
Kryostat Leica CM3050S	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
pH-Meter Calimatic 766	Knick, Berlin
Lichtmikroskop Wilovert S	Helmet Hund GmbH, Wetzlar
Mikroliterzentrifuge BioFuge Fresco	Heraeus/Kendro, Hanau
Microplate Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multipette® plus – Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer – Zählkammer	Brandt, Ludwigshafen
Schüttelinkubator ST5CAT	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
Shadon Cytospin Centrifuge 3	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Vakuum – Absauggerät	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen
Zentrifuge Allegra™ 25 R	Beckman Coulter, Palo Alto (CA, USA)

Tabelle 5: Verwendete Laborgeräte

2.1.2 Verwendete Software

Software	Hersteller
BD FACS Diva 6.0	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Bio-Plex®-Manager	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
FACP™ Array	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego (CA, USA)
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda (MD, USA)
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmont (WA, USA)
OriginPro 8G	OriginLab Corporation, Northampton (MA, USA)
Zeiss Axio Version Rel. 4.7	Zeiss, Jena

Tabelle 6: Verwendete Software

2.1.3 Verwendete Materialien

Material	Hersteller
Chamber Slides (4 Kavitäten)	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Combitips® plus – Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmalküvetten	Eppendorf AG, Hamburg
Einwegskalpell No. 22	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Kryokonservierungsröhrchen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Kunststoffröhrchen (15 ml, 50 ml; konisch, steril, mit Schraubverschluss)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mikrotiterplatten (6 bzw. 96 Kavitäten; Flachboden, mit Deckel)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
SuperFrost® plus – Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Zell- bzw. Gewebekulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 125 cm ²)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zell- bzw. Gewebekulturschalen (steril)	Falcon, Heidelberg
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellsiebe (40 µm bzw. 70 µm)	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)

Tabelle 7: Verwendete Materialien

2.1.4 Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medien

Chemikalien, Reagenzien, Medien	Hersteller
Aceton	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Antibiotikum/Antimykotikum (Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B)	PAA Laboratories, Pasching (A)
Antikörper-Verdünnungs-Puffer	DCS, Hamburg
Aqua Spüllösung	Delta Select, Dreieich
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bradford Dye Reagent	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Collagenase Typ II	Invitrogen, Eugene (OR, USA)
DAPI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dispase	Invitrogen, Eugene (OR, USA)
DMEM + D-Glucose (4,5 g/l) + L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching (A)
DMSO	Merck, Darmstadt
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories, Pasching (A)
Tissue-Tek® O.C.T. TM compound Einbettmedium	Miles Inc. Elkhart (IN, USA)
Eosin G Lösung (0,5 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Apotheke UK S-H, Campus Lübeck
Eukitt	Kindler GmbH
FACS Flow TM	Becton & Dickinson, Heidelberg
FKS, inaktiviert	GIBCO, New York (CT, USA)
Fluoromount G	SouthernBiotech, Birmingham (AL, USA)
Hämalaunlösung, sauer, nach Mayer	Dr. K. Hollborn u. Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig
Hyaluronidase Typ Is	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Mycoplasma-Off®	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching (A)
Saponin	Fluka, Buchs (CH)
Triton X-100 (0,3 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Pasching (A)

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medien

2.1.5 Zusammensetzung von Medien

Medium, Zusatz	Hersteller
500 ml DMEM + D-Glucose (4,5 g/l) + L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching (A)
1mM Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
1 x NEA (nicht-essentielle Aminosäuren)	GIBCO, New York (CT, USA)
25 mM HEPES	PAA Laboratories, Pasching (A)

Tabelle 9: Zellkulturmedium und Zusätze für adhärente Zellen

Medium, Zusatz	Hersteller
500 ml DMEM + D-Glucose (4,5 g/l) + L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching (A)
1mM Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
1 x NEA (nicht-essentielle Aminosäuren)	GIBCO, New York (CT, USA)
25 mM HEPES	PAA Laboratories, Pasching (A)
5 % Antibiotikum/Antimykotikum (Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B)	PAA Laboratories, Pasching (A)
5 % Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching (A)

Tabelle 10: Zellkulturmedium und Zusätze für Primärkulturen

Medium, Zusatz	Hersteller
70 % DMEM + D-Glucose (4,5 g/l) + L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching (A)
20 % FKS, inaktiviert	GIBCO, New York (CT, USA)
10 % DMSO (Dimethylsulfonat)	PAA Laboratories, Pasching (A)

Tabelle 11: Einfriermedium für Zelllinien und Primärkulturen

2.1.6 Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer, Lösungen	Bestandteile
Permeabilisierungspuffer (pH 7,4 - 7,6)	1 % FKS 0,1 % Saponin PBS
Dispersionsmedium	1 ml Dispase (33,4 mg/ml) 19 ml 70 % DMEM + D-Glucose (4,5 g/l) + L-Glutamin 4-6 % Antibiotikum/Antimykotikum (Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B) 4-6 % Penicillin/Streptomycin
Dissektionsmedium	1 ml Collagenase (31,5 mg/ml) 1 ml Hyaluronidase (3,99 mg/ml) 8 ml 70 % DMEM + D-Glucose (4,5 g/l) + L-Glutamin 4-6 % Antibiotikum/Antimykotikum (Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B) 4-6 % Penicillin/Streptomycin

Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen

2.1.7 Verwendete Kits

Kits	Hersteller
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Bio-Plex Calibration Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bio-Plex Cytokine Reagent Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bio-Plex Human Serum Diluent Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bio-Plex Validation Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CBA Human Immunoglobulin Flex-Set	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Human Cytokine TH ₁ /TH ₂ Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Human Pluripotent Stem Cell Antibody Array Kit	R & D Systems, Minneapolis (MN, USA)
In vitro Toxikologie Assay Kit (MTT-Test)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs GmbH, Berlin

Tabelle 13: Verwendete Kits

2.1.8 Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Human-CD34, <i>mouse</i> , IgG1, PE	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Anti-Human-CD44, <i>mouse</i> , IgG1, PE	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Anti-Human-CD59, <i>mouse</i> , IgG2a, FITC	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Anti-Human-CD117, <i>mouse</i> , IgG1, PE	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Anti-Human-CD133, <i>mouse</i> , IgG1, APC	Miltenye Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Anti-Human-FZD-3, <i>rat</i> , IgG2a, APC	R & D Systems, Minneapolis (MN, USA)
Anti-Human-FZD-7, <i>rat</i> , IgG2a, PE	R & D Systems, Minneapolis (MN, USA)
Anti-Human-Oct-4, <i>rat</i> , IgG2b, APC	R & D Systems, Minneapolis (MN, USA)
Anti-Human-Oct-4, <i>rat</i> , IgG2b, PerCP	R & D Systems, Minneapolis (MN, USA)
Lineage mix1: Anti-Human-CD3, -CD14, -CD16, -CD19, -CD20, -CD56, <i>mouse</i> , IgG1, FITC	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Isotypenkontrolle, <i>mouse</i> , IgG1, APC	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Isotypenkontrolle, <i>mouse</i> , IgG1, PE	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Isotypenkontrolle, <i>mouse</i> , IgG2a, FITC	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Isotypenkontrolle, <i>rat</i> , IgG2a, APC	R & D Systems, Minneapolis (MN, USA)
Isotypenkontrolle, <i>rat</i> , IgG2a, PE	R & D Systems, Minneapolis (MN, USA)
Isotypenkontrolle, <i>rat</i> , IgG2b, APC	R & D Systems, Minneapolis (MN, USA)
Isotypenkontrolle, <i>rat</i> , IgG2b, PerCP	R & D Systems, Minneapolis (MN, USA)

Tabelle 14: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper mit Verdünnung	Hersteller
Anti-Human-CD34, <i>mouse</i> , IgG1, 1:30	Acris Antibodies, Hiddenhausen
Anti-Human-CD44, <i>rabbit</i> , IgG, 1:100	Epitomics, Inc., Burlingame (CA, USA)
Anti-Human-CD44v6, <i>mouse</i> , IgG1, 1:300	R & D Systems, Minneapolis (MN, USA)
Anti-Human-CD59, <i>mouse</i> , IgG2a, 1:20	Abcam, Cambridge (MA, USA)
Anti-Human-CD117, <i>mouse</i> , IgG1, 1:50	Acris Antibodies, Hiddenhausen
Anti-Human-CD133, <i>mouse</i> , IgG1, 1:200	Abcam, Cambridge (MA, USA)
Anti-Human-Nanog, <i>mouse</i> , 1:100	Abcam, Cambridge (MA, USA)
Anti-Human-Oct-4, <i>rabbit</i> , 20µg/ml	BioVision, Mountain View (CA, USA)
Anti-Human-Oct-4 Isoform A, <i>rat</i> , 1:50	Epitomics, Inc., Burlingame (CA, USA)
Anti-Ki-67, <i>rabbit</i> , 1:200	Abcam, Cambridge (MA, USA)
Sekundärantikörper, Anti- <i>mouse</i> -Cy2, <i>goat</i> , IgG, 1:200	Jackso ImmunoResearch/ Dianova, Hamburg
Sekundärantikörper, Anti- <i>rabbit</i> -Cy3, <i>goat</i> , IgG, 1:100	Jackso ImmunoResearch/ Dianova, Hamburg

Tabelle 15: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

2.1.9 Verwendete Zelllinien

Insgesamt fanden im Rahmen dieser Dissertationsarbeit acht humane permanente HNSCC-Zelllinien Verwendung, welche in Tabelle 16 zusammenfassend dargestellt sind. Als Ursprung dienten bei allen acht Zelllinien Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich.

Zelllinie	Alter; Geschlecht	Entität	Lokalisation	Staging	Grading	Vor- therapie
BHY	65 J.; ♂	PT	Larynx	T2N0M0	G2	-
PCI-I	52 J.; ♂	PT	Alevolarfortsatz	rT4N0M0	G1	O
UT-SCC 12A	81 J.; ♀	PT	Cutis nasi	T2N0M0	G1	-
UT-SCC 12B	81 J.; ♀	LKM	Hals	rT0N1M0	G2	-
UT-SCC 60A	59 J.; ♀	PT	Tonsille li.	T4N1M0	G1	-
UT-SCC 60B	59 J.; ♀	LKM	Hals	T4N1M0	G1	Rx
UT-SCC 74A	31 J.; ♂	PT	Zunge	T4N1M0	G1-2	-
UT-SCC 74B	31 J.; ♂	LKM	Hals	rN2	G2	Rx

Tabelle 16: Verwendete permanente HNSCC-Zelllinien (n = 8)

J.: Jahre; PT: Primärtumor; LKM: Lymphknoten-Metastase; -: keine Therapie; O: Operation; Rx: Radiatio

2.1.10 Verwendete Gewebeproben

Neben permanenten Zelllinien wurden ebenfalls Tumor- und Nasenmuschelgewebeproben aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universität zu Lübeck untersucht. Ein befürwortender Ethikantrag der Universität zu Lübeck (Aktenzeichen: 04-158) für die Entnahme von Tumorgewebeproben nach vorausgehender schriftlicher Einwilligung der Patienten liegt vor. Aus datenschutzrechtlichen Gründen erfolgte eine Kennzeichnung der Gewebeentitäten mit einem Buchstaben (T für Primärtumor und G für nicht-neoplastisch veränderte Gewebearten) sowie für die Gewebeanzahl eine fortlaufende Nummerierung. Die histopathologische Befundung aller verwendeten Proben erfolgte am Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck.

Nasen- muschel	Alter; Geschlecht	Klinische Diagnose
G913	17 J.; ♀	NM-Hyperplasie, Adenoide
G918	33 J.; ♀	NM-Hyperplasie
G934	27 J.; ♀	NM-Hyperplasie bds.
G943	54 J.; ♀	Nasenseptumdeviation
G961	65 J.; ♂	Nasenseptumsubluxation
G962	65 J.; ♂	Nasenseptumdeviation, NM-Hyperplasie
G997	36 J.; ♀	Nasenseptumdeviation, NM-Hyperplasie

Tabelle 17: Verwendete Nasenmuschelgewebeprobe (n = 7)

G: Gesunde Gewebeprobe; J.: Jahre; NM: Nasenmuschel; bds.: beidseits

Tumor- gewebe	Alter; Geschlecht	Entität	Lokalisation	Staging	Grading	Vor- therapie
T601	61 J.; ♂	PT	Zungengrund	cT3cN2bM0	G3	O, Rx, G
T800	64 J.; ♀	PT	Tonsille	pT2pN2bcM0	G3	-
T898	72 J.; ♂	PT	Larynx	cT3 cN0 cM0	G2	Cx
T951	55 J.; ♂	PT	Hypopharynx	pT2pN2bcM0	G2	-
T956	86 J.; ♂	PT	Zungengrund	rpT3rpN1M0	G2	O
T969	50 J.; ♂	PT	Uvula	pT3pN1cM0	G2	-
T977	55 J.; ♂	PT	Hypopharynx	pT1pN0cM0	G3	-
T982	64 J.; ♀	PT	Oropharynx	pT3pN1cM0	G2	-
T1005	58 J.; ♂	PT	Zungengrund	pT2pN2bcM0	G3	-
T1010	65 J.; ♂	PT	Nasopharynx	cT1cN0cM0	G2	Rx, Cx
T1012	74 J.; ♂	PT	Oropharynx	cT4cN2bcM0	G3	-
T1014	50 J.; ♀	PT	Oropharynx	cT4cN2cMx	G1	-

Tabelle 18: Verwendete HNSCC-Gewebeprobe (n = 12)

T: Tumorgewebe; J.: Jahre; PT: Primärtumor; O: Operation; Rx: Radiatio; Cx: Chemotherapie; G: G-CSF - Therapie

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten

Bei allen Zellkulturarbeiten ist auf sterile Bedingungen geachtet worden, indem sterile Medien, Lösungen und Kulturflaschen nur unterhalb der Sterilbank geöffnet und verwendet wurden. Alle dabei verwendeten Materialien wurden zuvor entweder im Dampfsterilisator autoklaviert oder mit 70 %iger Ethanollösung gereinigt. Um eine Keimzahlreduktion an der Werkbank zu erzielen, ist vor der Inbetriebnahme eine UV-Bestrahlung sowie eine desinfizierende Reinigung mit Ethanol und Mycoplasma-Off® durchgeführt worden.

2.2.1.1 Kultivierung von HNSCC-Zelllinien

Die Kultivierung der adhärenenten HNSCC-Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Verwendung fanden Zellkulturmedien mit Zusätzen für adhärenente Monolayerkulturen, wobei auf antibiotische und antimykotische Zusätze bei permanenten HNSCC-Zelllinien verzichtet wurde. Ein Mediumwechsel nach vorherigem Waschen der adhärenenten Zellen mit vorgewärmten PBS fand in der Regel nach 48 bis 72 Stunden statt. Abhängig von dem Ausprägungsgrad der Konfluenz (> 80 %), welche lichtmikroskopisch bestimmt wurde, erfolgte in regelmäßigen Abständen eine Passagierung der Zelllinien. Hierfür wurden die adhärenenten Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen und die Zell-Zell- sowie die Zell-Kunststoff-Adhäsionen mittels Trypsin-EDTA gelöst. Bei Trypsin handelt es sich um eine Serinprotease, welche zu den Verdauungsenzymen gehört. Während Trypsin Zell-Matrix- sowie Zell-Kunststoff-Adhäsionen löst, führt EDTA als Ca²⁺- und Mg²⁺-Chelator zur Unterbindung von Zell-Zell-Verbindungen. Ergänzend zum Lösungsverfahren mit Trypsin wurde gegebenenfalls ein Abklopfen der Zellen (Shake-off-Verfahren) eingesetzt. Nach 5 - 8 minütiger Inkubationszeit mit Trypsin-EDTA wurde eine Inaktivierung mit FCS haltigem DMEM vorgenommen, die Zellen resuspendiert und zum Pelletieren zentrifugiert (200 x g, 8 min, 30°C). Nach Entfernung des Überstandes wurde die gewünschte resuspendierte Zellmenge zusammen mit Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt [282]. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit ist darauf geachtet worden, dass die permanenten Zelllinien eine Passagenanzahl von 40 nicht überschritten. Mittels Mycoplasmadetektionstest (Mycoplasma Detection Kit) wurden Mycoplasmainfektionen in den verwendeten Zellen regelmäßig ausgeschlossen.

2.2.1.2 Herstellung von Primärkulturen

Als Primärkultur versteht man eine Zellkultur, deren Lebensdauer unter *in-vitro* Bedingungen limitiert ist. Diese Art der Zellkultur wird gewonnen aus Organen oder Geweben verschiedener Spenderorganismen, wobei man sich *in-vivo* ähnliche Eigenschaften und Charakteristika der zu untersuchenden Zellen erhofft. Abhängig vom Ausgangsgewebe erhält man meist eine heterogene und vollständig dissoziierte Zellpopulation. Zur Herstellung wurde folgenderweise vorgegangen: die Gewebeprobe wurde in sterilem PBS vom Operationssaal zum Labor transportiert, unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell manuell zerkleinert, mit PBS gewaschen und zentrifugiert (1200 x g, 5 min, 30°C). Anschließend erfolgte die erste enzymatische Behandlung mit dem Dissektionsmedium (Tabelle 12, Seite 31) im Wasserbad bei 37°C. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde durch Zentrifugation das Dissektionsmedium entfernt und durch Resuspension im Dispersionsmedium (Tabelle 12, Seite 31) die zweite enzymatische Behandlung eingeleitet. Diese zweite enzymatische Phase wurde nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden durch Zentrifugation, Entfernung des Überstandes und mehrmaligen Waschvorgängen mit PBS terminiert. Um größere Zellverbände aus der anbehandelten Gewebeprobe zu entfernen, wurde eine Filtration zuerst mit einem 70 µm- und danach mit einem 40 µm-Zellsieb durchgeführt. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblaufärbung (siehe Kapitel 2.2.1.3) wurde eine definierte Zellzahl in ein Zellkulturgefäß übernommen und kultiviert.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die biologische Eigenschaft von Trypanblau (syn. Benzaminblau), einem anionischen Diazo-Farbstoff, ausgenutzt, welche Proteine von kollagenem Bindegewebe blau färbt und intakte Zellmembranen vitaler Zellen aufgrund seiner Größe ($M = 960,8 \text{ g/mol}$) nicht durchdringen kann (sog. Ausschlussfärbung). Geschädigte Zellmembranen von nicht vitalen Zellen, bei denen sich das Zytosol ebenfalls blau färbt, können somit von vitalen Zellen optisch mit Hilfe eines Lichtmikroskops und einer Neubauer-Zählkammer unterschieden werden (siehe Abbildung 6, Seite 37) [283].

Um die Zellzahl bestimmen zu können, wurde zunächst eine Einzelzellsuspension erstellt, 10 µl dieser Suspension im Mischungsverhältnis 1 : 1 mit 10 µl Trypanblau gut durchmischt und schließlich 10 µl dieser Mischung in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Dieses entspricht einem Verdünnungsfaktor von 2 (siehe Formel unten). Mikroskopisch wurden die Zellen mit intakter Zellmembran mit hellem Zytosol in den vier Eckquadranten der Zählkammer ausgezählt (siehe Abbildung 6, Seite 37).

Folgende Formel wurde zur durchschnittlichen Zellzahlbestimmung verwendet:

$$\text{Zellen/ml} = \left(\frac{\sum \text{Zellzahl}}{n_{\text{Quadrat}}} \right) \times F_V \times F_K$$

mit: n_{Quadrat} = Anzahl der ausgezählten Quadrate (in einer standardisierten Neubauer-Zählkammer = 4)

F_V = Verdünnungsfaktor, bei einem 1 : 1 – Verhältnis entspricht dieser „2“

F_K = Kammerfaktor, bei einer standardisierten Neubauer-Zählkammer entspricht dieser „10⁴“

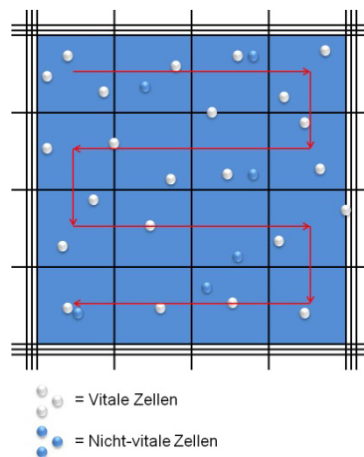


Abbildung 6: Prinzip der Zellzahl- sowie Vitalitätsbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer

Mikroskopisch wurde ein Quadrat, bestehend aus 4 x 4 kleinen Quadraten (blau), ausgezählt und nach der oben aufgeführten Formel berechnet. Außerdem ist eine Vitalitätsbestimmung mikroskopisch durchführbar, indem blau angefärbte Zellen als nicht-vital sowie nicht angefärbte Zellen als vital eingeordnet wurden. In Anlehnung an [283].

2.2.1.4 Einfrieren von Zellen

Um eine längerfristige Lagerung von Zellen zu ermöglichen, wurde zunächst eine Einzelzellsuspension aus Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase erstellt, wie zuvor beschrieben. Nach der Zentrifugation (200 x g, 8 min, 30 °C) wurde das Zellpellet mit DMEM ohne FCS resuspendiert und in einem 1 : 1 – Verhältnis mit einem 2-fach-konzentrierten Einfriermedium versetzt. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO (Dimethylsulfoxid), ein farbloses und fast geruchsloses organisches Lösungsmittel, diente dabei als Kryoprotektivum eingefrorener Zellen. Es penetriert vollständig in die Zelle und schützt die Zellen vor intrazellulärer Kristallbildung. Bei Raumtemperatur wirkt es zytotoxisch. Die erstellten Kryoröhrchen, welche eine Zellzahl von ca. 10⁶ Zellen beinhalteten, wurden nach Vermischung von Zellen und Einfriermedium zunächst für 24 Stunden in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierkarussell auf -80°C herunter gekühlt, bevor sie zur Langzeitkonservierung in Kryoboxen bei -80°C gelagert werden konnten [283].

2.2.1.5 Auftauen von Zellen

Die in den Kryoröhrchen enthaltenen Zellen wurden zuerst zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis sich der größte Teil des Eiskristalles aufgelöst hatte, und danach in 10 ml vorgewärmtes Nährmedium überführt. Nach der Zentrifugation (200 x g, 8 min, 30°C) wurde das Zellpellet im Nährmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche pipettiert. Nach 24 Stunden erfolgte zur Elimination von restlichen DMSO-Bestandteilen ein Mediumwechsel [283].

2.2.2 MTT-Zytotoxizität-Assay

Der MTT-Zytotoxizitäts-Assay (MTT-Test) ist ein kolorimetrischer Test zur Quantifizierung von lebenden Zellen. Er beruht auf dem Prinzip, dass das gelbe und wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) von lebenden Zellen mittels mitochondrialer Dehydrogenase durch enzymatische Spaltung des Tetrazolrings zum violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert wird. Mosmann beschrieb dieses Testprinzip als Erster bei Zellkulturen [284]. Methodisch wurde der MTT-Test folgendermaßen durchgeführt: 5.000 Zellen wurden jeweils in eine Kavität einer 96-Loch-Mikrotiterplatte zusammen mit 100 µl Medium pipettiert. Nach einer primären Wachstumszeit von 24 Stunden wurde der Überstand dekantiert und 100 µl von dem mit Medium verdünnten Wirkstoff zugeführt. Es folgt nach der gewünschten Inkubationszeit von 0, 48, 96 und 144 Stunden die Zugabe der MTT-Gebrauchslösung (5 mg/ml) für 120 Minuten im Brutschrank. Durch den Zusatz von 100 µl der MTT-Solubilisierungs-Lösung wurde die enzymatische Reaktion beendet. Um eine Homogenisierung der entstandenen violetten Farbkristalle zu erreichen, wurde für weitere 24 Stunden unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur die 96-Loch-Mikrotiterplatte gleichmäßigen Schüttelbewegungen ausgesetzt. Die Bestimmung der Extinktion bei 570 nm gegen die Referenzwellenlänge von 690 nm erfolgte im Mikrotiterplattenphotometer (ELISA-Reader). Dabei ist der elektronisch bestimmte optische Dichteunterschied (DU) direkt proportional zu der Anzahl vitaler Zellen [284]. Zur statistischen Auswertung wurden die Einzelwerte einer Mehrfachmessung (n = 3 - 6) prozentual in Relation zur Negativkontrolle nach folgender Formel gesetzt:

$$\text{Relative Lebensfähigkeit [\%]} = \frac{\bar{x}_{\text{DU}_{\text{Test}}}}{\bar{x}_{\text{DU}_{\text{Kontrolle}}}} \times 100$$

mit: $\bar{x}_{\text{DU}}$ = Mittelwert von DU

$\text{DU}_{\text{Test/Kontrolle}}$ = Dichteunterschied des Tests bzw. der Kontrolle

2.2.3 Bestimmung der Chemosensitivität

Zur besseren Vergleichbarkeit der Chemosensitivität von verschiedenen HNSCC-Zelllinien wurden die IC₅₀- und IC₉₀-Werte ermittelt. Als Berechnungsgrundlage diente die ermittelte relative Lebensfähigkeit, aus der mit Hilfe der Software OriginPro 8 nach Einfügen einer nicht-linearen Einphasen-exponentiellen Funktion die IC₅₀- und IC₉₀-Werte nach folgender Formel errechnet wurden:

$$y = y_0 + A \left(\frac{x}{-k} \right)$$

mit: A = Anfangskonzentration
 y₀ = Hintergrundfaktor
 k = Inhibitorkonstante

2.2.4 Bestimmung der Zytokinkonzentration von Zellen

Zur Bestimmung der Zytokine fanden im Rahmen dieser Dissertation zwei unterschiedliche Methoden Verwendung: der BioPlex™-Assay (BioRad) sowie der Flex-Set-Assay (BD Biosciences). Beide Methoden basieren auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA, in welchem Antikörper gegen verschiedene Zytokine eingesetzt werden, die an fluoreszierende *Beads* (Polystyrenkügelchen) gekoppelt sind. Die Durchführungen und Messmethoden dieser beiden Assays unterscheiden sich. Beide Methoden wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Insgesamt wurde anhand von acht permanenten HNSCC-Zelllinien das Zytokinsekretionsverhalten unter in-vitro-Chemotherapie mit drei Zytostatika (5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel) und drei Inkubationszeiträumen (0, 48, 96 und 144 Stunden) untersucht. Dafür wurden 250.000 Tumorzellen mit 5 ml Medium in eine 25 cm² Zellkulturflasche pipettiert und 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert, der im Medium verdünnte Zytostatika-Wirkstoff in entsprechender Konzentration zugeführt und im Brutschrank aufbewahrt. Nach 0, 48, 96 oder 144 Stunden erfolgte die Abnahme von 200µl-Aliquots in 1,5 ml-Reaktionsgefäße sowie die Konservierung bei -80°C.

2.2.4.1 Bio-Plex™-System

Eingesetzt wurde im Rahmen dieser Arbeit das TH₁/TH₂-Assay-Kit, welches die Bestimmung der Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN- γ sowie TNF- α beinhaltet. Die einzelnen Zytokine des enthaltenen Standard-Stocks wurden so verdünnt, dass der Messbereich in einer Größenordnung von 5,0 – 8.000 pg/ml lag. Messergebnisse über 8.000 pg/ml sind anhand der erstellten Standardkurve rechnerisch ermittelt worden.

Methodisch wurde wie nun folgend aufgeführt vorgegangen: 50 μ l der zu bestimmenden Probe oder der seriellen Verdünnung der Standard-Zytokine wurden zusammen mit den Antikörpergekoppelten *Beads* in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und 120 Minuten bei 300 U/min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte ein mehrmaliges Waschen in Kombination mit einer Vakuumfiltration. Als nächster Schritt wurde der biotinylierte sekundäre Detektionsantikörper hinzugefügt und für weitere 30 Minuten bei 300 U/min inkubiert, bevor wieder ein Waschschriff mit Vakuumfiltration folgte. Der sekundäre Detektionsantikörper richtet sich gegen das zu bestimmende Zytokin und durch Zugabe des PE-(Phycoerythrin-) markierten Streptavidin an Biotin konnte die durchflusszytometrische Messung im Bio-Plex-Reader durchgeführt werden. Anhand der erstellten Standardkurve aus der Verdünnungsreihe erfolgte eine Quantifizierung der zu bestimmenden Zytokine in der Konzentrationseinheit pg/ml.

2.2.4.2 Flex-Set™-System

Mit Hilfe der Cytometric Bead Array®- Methode wurden die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, G-CSF und GM-CSF in den Proben bestimmt. Auch bei dieser Zytokin-Bestimmungsart wurde zuerst eine Standardkurve für die zu messenden Zytokine erstellt, welche einen Konzentrationsbereich von 5,0 - 5.000 pg/ml erfasst. Wie schon bei der Bio-Plex™-Methode wurden auch bei dem Flex-Set™-System Zytokinkonzentrationswerte oberhalb von 5000 pg/ml rechentechnisch ermittelt. Ebenfalls wurden zur Bestimmung 50 μ l der entsprechenden Probe oder Zytokinstandard mit 50 μ l der *Mastermix*-Lösung vermischt, welche die *Beads* enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten erfolgte ein Waschschriff mit Abzentrifugation sowie eine weitere 120 minütige Inkubation mit dem entsprechenden biotinylierten PE-konjugierten Detektionsantikörper unter Lichtausschluss. Daraufhin wurde ein erneuter Waschschriff mit Abzentrifugation durchgeführt, bevor im PE-Kanal des FACSCanto die Quantifizierung erfolgen konnte. Jede Bead-Population konnte im FACS-Gerät einer spezifischen Region zugeordnet und die Fluoreszenzintensität mittels der Software FCAP™ anhand der erstellten Standardkurve in eine Konzentrationseinheit von pg/ml umgerechnet werden.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (FACS; Fluorescence Activated Cell Sorting) handelt es sich um eine Nachweismethode von molekularen Antigenen, inklusive dem quantitativen Proteinnachweis.

2.2.5.1 Prinzip

Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf der Antigen-Antikörper-Reaktion. Mit Antikörper-gekoppelten Fluorochromen werden nach Färbung der Einzelzellsuspension die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl entsprechender Wellenlänge vorbeigeleitet. Wenn bei exakter Anregung die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau (Streulichtbildung) angehoben werden, wird dieses von den Photodetektoren gemessen und in eine Messinformation umgewandelt. Diese beinhalten das Vorwärtsstreulicht (Forward Light Scatter; FSC), welches ein Maß für das Volumen von Zellen darstellt, und das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter; SSC), welches ein Maß für die Granularität von Zellen ist. Die vom Photodetektor registrierten Messinformationen verhalten sich dabei proportional zur Menge an Antikörper-gebundenen Zellen. Durch die im FACSCanto eingesetzten drei Laser verschiedenfarbiger Art können bis zu drei unterschiedliche Fluorochrome in einer Probe bestimmt werden. Mit Hilfe der Kompensation von Photodetektorkanälen mit gefärbten *Kompensationsbeads* können Artefakte aus überlappenden Fluoreszenzbereichen verringert werden [285]. Zusätzlich wurden zum Vitalitätsnachweis der untersuchten Zellen Annexin/PI-Färbungen (siehe Kapitel 2.2.6.3, Seite 42) durchgeführt.

2.2.5.2 Durchführung

In einem auf Eis befindlichen FACS-Röhrchen wurden $0,5 - 3 \times 10^6$ Zellen pipettiert und die Überstände durch Zentrifugation ($300 \times g$, 10 min, 4°C) entfernt. Nach Resuspension in 50 μl PBS sowie Zugabe des Antikörpers nach Herstellerangaben erfolgte die Inkubation für 15 Minuten bei 4°C . Bei der intrazellulären Färbung wurde statt der Resuspension in PBS 50 μl der Permeabilisierungspuffer (Tabelle 12, Seite 31) verwendet. Nach der Inkubationszeit wurde die Probe mit 2 ml PBS verdünnt und der Überstand nach Zentrifugation ($300 \times g$, 10 min, 4°C) dekantiert. Zur Probenanalyse fand eine erneute Resuspension in 1 ml PBS statt sowie eine dauerhaften Aufbewahrung bei 4°C . Analog zu diesem Vorgang wurden, um unspezifische Bindungen zu reduzieren, Isotypen- sowie Negativkontrollen durchgeführt. Zur Kompensation sowie zur Messung und Auswertung wurde die FACSDiva-Software verwendet.

2.2.5.3 Annexin/PI-Färbung

Die Annexin V- und Propidiumjodid- (PI-) Färbung wurde zum Vitalitätsnachweis von Zellen durchgeführt. Annexin V (FITC) bindet an das Phosphatidylserin, welches physiologisch an der Innenseite von Zellmembranen vorkommt und somit ohne Zugabe eines Permeabilisierungspuffers bei intakten Zellmembranen vitaler Zellen nicht gebunden werden kann. Erst Zellen in der frühen apoptotischen Phase, bei denen es zur zunehmenden Externalisierung von Phosphatidylserin kommt, können mittels Annexin V gefärbt werden. Da bei der Nekrose die Zellmembranintegrität beeinträchtigt ist, kann auch in diesem Fall Annexin binden, d.h. durch alleinige Zugabe von Annexin V kann nicht zwischen früher Apoptose und Nekrose differenziert werden. Erst durch Kombination mit Propidiumjodid, welches selektiv nukleäre DNA-Bestandteile nekrotischer Zellen anfärbt, können Apoptose und Nekrose unterschieden werden. Drei Konstellationen sind somit mit der Annexin/PI-Methode denkbar und in Tabelle 19 aufgeführt.

Zustand der Zellen	Annexin-Färbung	Propidiumjodid-Färbung
Vitale Zellen	Negativ	Negativ
Apoptotische Zellen (frühe Phase)	Positiv	Negativ
Nekrotische Zellen	Positiv	Positiv

Tabelle 19: Abgrenzung vitaler Zellen, Apoptose und Nekrose in Abhängigkeit von der Annexin/PI-Färbung.

In zwei FACS-Röhrchen wurden jeweils 10^5 Zellen in 100 μ l Annexin-Binding-Buffer (BB-Puffer) verdünnt und mit 5 μ l Annexin V bzw. PI gefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten unter Lichtausschluss sowie der Verdünnung mit 400 μ l BB-Puffer pro Röhrchen konnte die FACS-Analyse durchgeführt werden.

2.2.6 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist ein Sammelbegriff für spezifische Untersuchungen, welche auf dem Nachweis von zell- und gewebespezifischen Antigenen durch fluoreszierende Antikörper beruht. Mit dieser Methode sind die Visualisierung von gebundenen Antikörpern und die Lokalisierung dieser in Gewebe- oder Zellstrukturen möglich.

2.2.6.1 Gefrierschnitte

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die Gewebeproben bei -80°C in Einfriermedium (Tissue-Tek®) in flüssigem Stickstoff konserviert und mittels des Kryostaten (Leica CM3050S) aus dem tiefgefrorenen Gewebeblock $6\text{ }\mu\text{m}$ dünne Gefrierschnitte erstellt. Diese wurden auf Objektträger übertragen und bis zur Färbung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.6.2 Cytospin-Präparate

Zur Herstellung von Cytospin-Präparaten wurde eine Einzelzellsuspension erstellt, 10^4 Zellen in $100\text{ }\mu\text{l}$ PBS in den Trichter der Cytospinzentrifuge (Shadon Cytospin Centrifuge 3) pipettiert und 4 Minuten lang bei $800 \times g$ zentrifugiert. Die Aufbewahrung bis zur Färbung erfolgte bei -80°C nach vorheriger Trocknung der Objektträger.

2.2.6.3 Durchführung

Zuerst wurde eine Fixierung der zu untersuchenden Objektträger vorgenommen, indem diese 20 Minuten in Methanol (-20°C) inkubiert und anschließend 5 Minuten lang getrocknet wurden. Danach folgten ein dreimaliger Waschschrift mit PBS sowie die Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für eine Stunde oder 12 - 15 Stunden bei 4°C mit dem Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung, wie in Tabelle 15 (Seite 32) angegeben. Bei einer intrazellulären Färbung, z. B. bei Oct-4 und Nanog, wurden die Zellen zusätzlich vor Applikation des Primärantikörpers mit 0,3 %igem Triton X-100 permeabilisiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS erfolgte die Inkubation für 45 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 15, Seite 32), welcher in der Antikörperpufferlösung verdünnt wurde. Anschließend erfolgten ein erneuter Waschschrift sowie die Zellkernfärbung mit DAPI in der Konzentration 1 : 5000 ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$) für eine Minute. Als nächstes wurde ein dreimaliger Waschschrift mit PBS durchgeführt sowie die Objektträger mit FluoromountG eingedeckt und getrocknet. Bei Doppelfärbungen wurde zunächst der erste Primär- und Sekundärantikörper, wie zuvor beschrieben, angewendet, bevor über Nacht (nach 12 - 15 Stunden) bei 4°C der zweite Primärantikörper und am folgenden Tag der zweite Sekundärantikörper folgten. Zum Ausschluss von Färbeartefakten durch unspezifische Bindungen der Sekundärantikörper wurde bei jeder Färbung ein gesonderter Kontrollobjektträger angefertigt. Die Visualisierung der angefertigten Objektträger wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200M) mit Hilfe Differentialer Interferenz Kontrast (DIC) Mikroskopie oder Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung verschiedener Filtersets durchgeführt. Die Photographien erfolgten mit dem Zeiss AxioCam MRm Rev.3 FireWire und die Analyse mit der Software Zeiss AxioVision Rel. 4.7.

2.2.7 *Proteome Profiler™ Array* (R & D System)

Der *Proteome Profiler Human Pluripotent Stem Cell Array* ist ein *Screening*-Verfahren zur Detektion potentieller embryonaler Stammzellmarker mittels geringer Proteinmengen. Der Aufbau des Arrays mit der Zuordnung der jeweiligen Marker ist in Tabelle 20 dargestellt.

Koordinate	Potentielle SZM
A 1, 2, 7, 8	Positivkontrolle
B 1, 2	Oct-4
B 3, 4	Nanog
B 5, 6	Sox2
B 7, 8	E-Cadherin
C 1, 2	AFP
C 3, 4	Gata-4
C 5, 6	HNF-3 β /FoxA2
C 7, 8	PDX-1/IPF1
D 1, 2	Sox17
D 3, 4	Otx2
D 5, 6	TP63/TP31
D 7, 8	Goosecoid
E 1, 2	Snail
E 3, 4	VEGF R2/KDR/Flk-1
E 5, 6	HCG
E 7, 8	Negativkontrolle
F 1, 2	Positivkontrolle

Tabelle 20: Aufbau des *Human Pluripotent Stem Cell Array Kit*

Tabellarisch dargestellt sind die Potentiellen Stammzellmarker (SZM) embryonalen Ursprungs mit den zugehörigen Koordinaten (bezüglich der Schablone siehe Abbildung 7, Seite 46), welche in dem Human Pluripotent Stem Cell Array Kit enthalten sind.

2.2.7.1 Proteinpräparation

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden sowohl Zelllinien als auch solide Tumorgewebeproben mittels des *Human Pluripotent Stem Cell Array* untersucht.

Um Zelllysate aus Zelllinien zu gewinnen, wurde das Nährmedium aus den Zellkulturflaschen (125 cm²) dekantiert, die adhären Zellen mehrmalig mit 4°C kaltem PBS gewaschen und mit 50 μ l des Lysispuffers 16 aus dem Kit inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die noch adhären Zellen mittels eines Zellscrapers vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Analog zu der beschriebenen Bearbeitung von Zelllinien wurden auch die Gewebeproben behandelt, jedoch wurden die soliden Tumore vor der enzymatischen Behandlung manuell mit einem Skalpell zerkleinert und es wurde ein Volumen von 100 μ l Lysispuffer eingesetzt. Nach der Lyse der Proteine erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 13.000 U/min für 10 Minuten bei 4°C sowie die Übertragung der Überstände in ein neues Reaktionsgefäß. Als nächstes erfolgten die Quantifizierung der Proteinkonzentrationen und die Lagerung in 200 μ g-Protein-Aliquots bei -80°C.

2.2.7.2 Proteinquantifizierung nach *Bradford*

Die Quantifizierung der Proteine wurde nach der Methode von *Bradford* mit Hilfe eines Protein-Assays durchgeführt. Bei den Zelllinien-Lysaten wurden hierfür 5 µl einer 1 : 10 - Verdünnung mit destilliertem H₂O bzw. 5 µl einer 1 : 50 - Verdünnung bei den Gewebeproben-Lysaten zusammen mit 250 µl *Bradford*-Reagenz vermischt und für 10 Minuten inkubiert. Das *Bradford*-Reagenz mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau (G250) bildet mit Proteinen Komplexe, welche nach der Inkubationszeit mit dem Microplate Spectrophotometer (Absorptionsmaximum von 595 nm) photometrisch erfasst werden können [286]. Die Quantifizierung erfolgte im Vergleich zu einer Standard-Verdünnungsreihe.

2.2.7.3 Durchführung des *Human Pluripotent Stem Cell Array*

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers: auf der Nitrozellulosemembran des Arrays befanden sich gespottete Primär- und Kontrollantikörper (*capture antibodies*) gegen die zu untersuchenden Stammzellproteine. Zuerst wurde die Nitrozellulosemembran für 12 - 15 Stunden bei 4°C mit 200 µg Zelllysate inkubiert. Danach erfolgten mehrere Waschschrte, um die ungebundenen Proteine zu entfernen. Nach der Inkubation mit einem spezifischen biotinylierten Antikörper und dem Anti-Biotin-Alkalische-Phosphatase-Sekundärantikörper (*Goat-Anti-Biotin-AP-Antibody*) wurde die Visualisierung mit dem Alkalische-Phosphatase-Substrat (*AP-Conjugate Substrate Kit*) durchgeführt. Die Intensität der Färbung eines Spottes war dabei direkt proportional zur gebundenen Proteinmenge. Nach dem Trocknen der Nitrozellulosemembran sind diese hochauflösend eingescannt und mittels des Programms ImageJ (National Institutes of Health, USA) ausgewertet worden, wobei jede Pixelintensität in einem Histogramm einem dimensionslosen Graustufenwert auf einer Skala zwischen 0 (Schwarz) und 255 (weiß) entsprach.

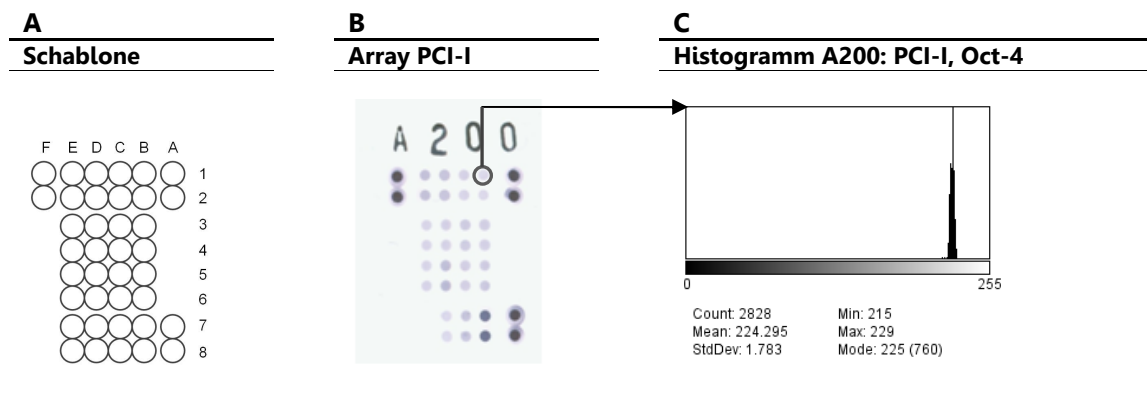


Abbildung 7: Auswertung des *Human Pluripotent Stem Cell Array Kit*

Beispielhaft ist die Schablone (Teilabbildung A) der Membran A200 der Zelllinie PCI-I (Teilabbildung B) mit dem dazugehörigen Histogramm (Teilabbildung C) von Oct-4 abgebildet. Aus der Pixelintensität des Graustufenwertes (Teilabbildung C, x-Achse) wurde ein Wert einer dimensionslosen Skala zwischen 0 (Schwarz) und 255 (weiß) erstellt. Die y-Achse in Teilabbildung C gibt die Anzahl der für den Graubereich gemessenen Pixel wieder. Der erhaltene Mittelwert (Mean) wurde zur weiteren Berechnung (siehe unten) herangezogen.

Um eine richtige Zuordnung zwischen Pixelintensität und Expressionswert zu gewährleisten, wurde der Pixelintensitätswert nach folgender Formel invertiert:

$$PI_{\text{korr.}} = (PI_{\text{unkorr.}} - 255) \times (-1)$$

mit: $PI_{\text{unkorr.}}$ = unkorrigierte Pixelintensität
 $PI_{\text{korr.}}$ = korrigierte Pixelintensität

Der mit der Formel ermittelte korrigierte Pixelintensitätswert wurde auf den Mittelwert der sechs Positivkontrollen bezogen und auf 100 % nach folgender Formel normiert:

$$y = \frac{PI_{\text{korr.}}}{\bar{x}_{\text{PK}}} \times 100$$

mit: $PI_{\text{korr.}}$ = korrigierte Pixelintensität
 $\bar{x}_{\text{PK}}$ = Mittelwert der Positivkontrolle
 y = Expressionswert [%]

Die ermittelten Werte geben die prozentuale Expression des Stammzellmarkers wieder. Das identische Procedere wurde zur Expressionsbestimmung jedes Stammzellmarkers angewendet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Zytostatika auf das Wachstumsverhalten von HNSCC-Zelllinien

Um das Ansprechen verschiedener HNSCC-Zelllinien auf ausgewählte Konzentrationen der drei Chemotherapeutika 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel zu untersuchen, wurden insgesamt acht HNSCC-Zelllinien einer in-vitro-Chemotherapie unterzogen. Im Folgenden sind die Inkubationszeiträume 48, 96 und 144 Stunden betrachtet worden. Unter den Zelllinien befanden sich zwei Primärtumor-Zelllinien (BHY, PCI-I) sowie drei Primärtumor-Lymphknoten-Metastasen-Paare (UT-SCC 12A/B, UT-SCC 60A/B, UT-SCC 74A/B). Zur Bestimmung der jeweiligen Zytostatikaresistenz wurde der MTT-Zytotoxizitäts-Assay, wie in Kapitel 2.2.2 (Seite 38) beschrieben, angewendet. Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Zelllinien wurden die IC_{50} - und IC_{90} -Werte (Inhibitory Concentration) ermittelt. Die Werte beschreiben die Zytostatikakonzentrationen, welche notwendig sind, um im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 50 bzw. 90 % der Zellen im Wachstum zu hemmen und damit 50 bzw. 10 % der Ausgangszellanzahl zu erhalten. Sie wurden mit Hilfe der Software OriginPro® sowie GraphPad Prism® ermittelt.

3.1.1 Wachstumsverhalten unter 5-Fluorouracilbehandlung

Das Zytostatikum 5-Fluorouracil wurde in vier verschiedenen Konzentrationen (10, 50, 100, 200 μ M) mit drei unterschiedlichen Inkubationszeiträumen (48, 96, 144 Stunden) eingesetzt. Die erhaltenen Werte wurden in Konzentrations-Effekt-Kurven als Mittelwerte mit Standardabweichungen einer Mehrfachbestimmung ($n = 3 - 6$) dargestellt, wie am Beispiel von Abbildung 8 (Seite 48) gezeigt. Anhand der Konzentrations-Effekt-Kurven sind Software-gestützt die IC_{50} - und IC_{90} -Werte ermittelt worden. Sowohl die Konzentrations-Effekt-Kurven als auch die IC-Werte ließen zwei Variablen mit Einfluss auf die Zytotoxizität erkennen: die Konzentration des Zytostatikums und der Inkubationszeitraum.

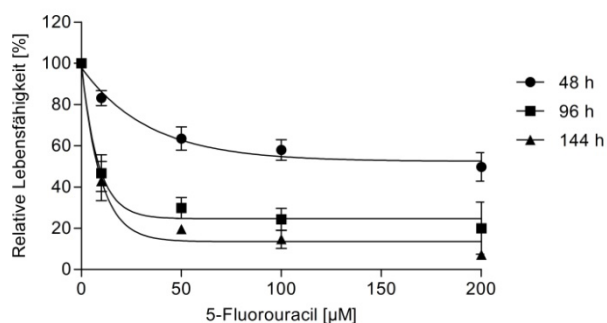


Abbildung 8: Konzentrations-Effekt-Kurven unter 5-Fluorouracilbehandlung am Beispiel der HNSCC-Zelllinie PCI-I

In eine 96-Well-Platte wurde pro Kavität eine Anzahl von 5000 Zellen eingesetzt und mit vier unterschiedlichen Konzentrationen von 5-Fluorouracil behandelt. Als Inkubationszeiträume wurden 48, 96 und 144 Stunden gewählt. Nach dieser Zeit wurde mittels eines MTT-Zytotoxizitäts-Assay der relative Anteil der vitalen Zellen bestimmt. Dargestellt sind dosisabhängige Konzentrations-Effekt-Kurven der HNSCC-Zelllinie PCI-I unter 5-Fluorouracilbehandlung, welche den Einfluss sowohl der Inkubationszeit als auch der Zytostatikakonzentration auf die Zytotoxizität verdeutlichen. Mit Hilfe der Software GraphPad Prism® wurde aus den erhaltenen Messergebnissen eine Ein-Phasen exponentielle Funktion berechnet und als Verlaufskurve im Diagramm eingefügt. Die exponentielle Funktion diente als Grundlage zur Bestimmung der IC₅₀- und IC₉₀-Werte. Die graphische Darstellung der Konzentrations-Effekt-Kurven der HNSCC-Zelllinie PCI-I soll den Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiträume auf die Zytotoxizität verdeutlichen.

Zelllinie	48h		96h		144h	
	IC ₅₀ -Wert [µM]	IC ₉₀ -Wert [µM]	IC ₅₀ -Wert [µM]	IC ₉₀ -Wert [µM]	IC ₅₀ -Wert [µM]	IC ₉₀ -Wert [µM]
BHY	94,8	-	34,9	-	26,8	-
PCI-I	-	-	8,8	-	8,7	95,1
UT-SCC 12A	-	-	90,7	-	34,7	-
UT-SCC 12B	-	-	24,4	-	23,9	-
UT-SCC 60A	32,6	-	19,3	-	5,4	-
UT-SCC 60B	-	-	27,7	-	3,8	-
UT-SCC 74A	-	-	17,5	-	13,2	-
UT-SCC 74B	50,9	-	20,9	-	15,6	63,6

Tabelle 21: IC₅₀- und IC₉₀-Werte von acht HNSCC-Zelllinien unter 5-Fluorouracilbehandlung

Tabellarisch dargestellt sind die ermittelten IC₅₀- und IC₉₀-Werte für das Zytostatikum 5-Fluorouracil. Die IC-Werte dienen der besseren Vergleichbarkeit im Hinblick auf die 5-Fluorouracilresistenz. Wegen der subletalen Dosierung sind die IC₉₀-Werte nur selten ermittelbar gewesen.

Tabelle 21 verdeutlicht anhand von IC₅₀- und IC₉₀-Werten die Resistenz der acht ausgewählten HNSCC-Zelllinien gegenüber 5-Fluorouracil. Zu erkennen ist, dass die IC₉₀-Werte aufgrund der subletalen Dosierungen häufig nicht erreicht wurden. Daher ist nur ein Vergleich der IC₅₀-Werte möglich. Die meisten IC₅₀-Werte liegen nach 96-stündiger Inkubation im Bereich zwischen 17,5 und 34,9 µM und nach 144 Stunden zwischen 13,2 und 26,8 µM. Lediglich die Zelllinien PCI-I und UT-SCC 60A/B wiesen nach 144 Stunden geringere IC₅₀-Werte auf. Die höchsten IC₅₀-Werte hingegen konnten bei diesem Zeitraum für die Zelllinie UT-SCC 12A ermittelt werden.

3.1.2 Wachstumsverhalten unter Cisplatinbehandlung

Bei dem Zytostatikum Cisplatin wurden dieselben Inkubationszeiträume (48, 96, 144 Stunden) wie bei der 5-Fluorouracilbehandlung gewählt, jedoch die eingesetzten Konzentrationen aufgrund der beschriebenen höheren Toxizität mit 1, 10, 20 und 50 μM niedriger angesetzt [287]. Die Konzentrations-Effekt-Kurven unter Cisplatin wurden analog zu denen unter 5-Fluorouracilbehandlung angefertigt.

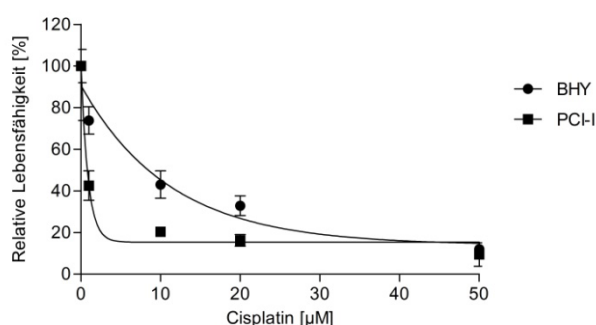


Abbildung 9: Konzentrations-Effekt-Kurven nach 48-stündiger Cisplatinbehandlung am Beispiel der beiden HNSCC-Primärtumorzelllinien BHY und PCI-I

Der Versuchsdurchführung sowie die Graphikerstellung sind identisch zu Abbildung 8 (Seite 48). Der Graph zeigt dosisabhängige Konzentrations-Effekt-Kurven der Primärtumorzelllinien BHY und PCI-I nach einer 48-stündigen Cisplatinbehandlung. Veranschaulicht werden soll das andersartige Reaktionsverhalten von zwei HNSCC-Primärtumorzelllinien gegenüber dem Zytostatikum Cisplatin.

Zelllinie	48h		96h		144h	
	IC ₅₀ -Wert [μM]	IC ₉₀ -Wert [μM]	IC ₅₀ -Wert [μM]	IC ₉₀ -Wert [μM]	IC ₅₀ -Wert [μM]	IC ₉₀ -Wert [μM]
BHY	8,6	62,5	4,9	28,6	4,8	24,1
PCI-I	1,3	52,2	1,1	16,3	0,1	6,1
UT-SCC 12A	5,7	44,5	1,3	14,5	0,6	3,2
UT-SCC 12B	12,1	-	5,4	20,1	0,7	19,0
UT-SCC 60A	4,6	21,4	2,4	10,4	0,9	3,6
UT-SCC 60B	13,8	-	5,1	26,9	2,0	11,6
UT-SCC 74A	4,4	15,6	3,1	10,6	2,5	8,6
UT-SCC 74B	11,6	55,9	4,4	15,9	3,4	12,5

Tabelle 22: IC₅₀- und IC₉₀-Werte von acht HNSCC-Zelllinien unter Cisplatinbehandlung

Die hier dargestellten IC₅₀- und IC₉₀-Werte zeigen deutliche Unterschiede der acht untersuchten HNSCC-Zelllinien bezogen auf die Cisplatinresistenz. Besonders deutlich wird diese beim direkten Vergleich zwischen einer Cisplatin-resistenten (z. B. BHY, UT-SCC 12B, UT-SCC 60B) und einer Cisplatin-sensiblen Zelllinie (z. B. PCI-I).

Tabelle 22 ermöglicht einen direkten Vergleich der Cisplatinresistenz der acht untersuchten HNSCC-Zelllinien. Auffällig ist, dass alle Metastasen (UT-SCC 12B, UT-SCC 60B und UT-SCC 74B) eine deutlich höhere Cisplatinresistenz aufweisen als die dazugehörigen Primärtumore (UT-SCC 12A, UT-SCC 60A und UT-SCC 74A). Ebenfalls wird aus dieser Tabelle deutlich, dass erhebliche Unterschiede auch zwischen den einzelnen Primärtumoren zu verzeichnen waren, wie der direkte Vergleich zwischen BHY und PCI-I offenbart (Abbildung 9, siehe oben).

3.1.3 Wachstumsverhalten unter Paclitaxelbehandlung

In Analogie zu den vorher beschriebenen in-vitro-Chemotherapieversuchen wurde das gleiche Procedere auch mit dem Zytostatikum Paclitaxel durchgeführt. Die eingesetzten vier Chemotherapeutikakonzentrationen (1, 10, 20, 50 μM) sowie die drei Inkubationszeiträume (48, 96, 144 Stunden) entsprechen denen der unter Kapitel 3.1.2. aufgeführten Cisplatinbehandlung.

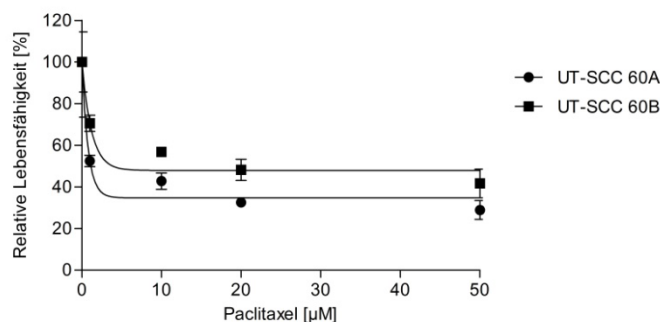


Abbildung 10: Konzentrations-Effekt-Kurven nach 48-stündiger Paclitaxelbehandlung am Beispiel der Zelllinien UT-SCC 60A/B

Aufgeführt sind dosisabhängige Konzentrations-Effekt-Kurven des Primärtumor-Lymphknoten-Metastasen-Paares UT-SCC 60A/B nach einem Inkubationszeitraum von 48 Stunden, welche das unterschiedliche Resistenzverhalten zwischen Primärtumor und dazugehöriger Metastase unter Paclitaxelbehandlung bildlich darstellen sollen.

Zelllinie	48h		96h		144h	
	IC ₅₀ -Wert [μM]	IC ₉₀ -Wert [μM]	IC ₅₀ -Wert [μM]	IC ₉₀ -Wert [μM]	IC ₅₀ -Wert [μM]	IC ₉₀ -Wert [μM]
BHY	6,7	73,0	0,8	51,6	0,3	5,7
PCI-I	0,5	43,2	0,5	27,2	0,3	1,1
UT-SCC 12A	11,3	67,3	4,1	62,1	0,5	15,9
UT-SCC 12B	11,0	64,9	3,3	17,9	0,5	1,7
UT-SCC 60A	2,8	79,8	0,2	2,0	0,1	0,5
UT-SCC 60B	25,9	-	2,3	59,4	0,2	2,8
UT-SCC 74A	0,4	61,7	0,4	11,8	0,1	8,1
UT-SCC 74B	2,8	41,4	1,2	31,1	0,8	9,9

Tabelle 23: IC₅₀- und IC₉₀-Werte von acht HNSCC-Zelllinien unter Paclitaxelbehandlung

Zur besseren Vergleichbarkeit in Bezug auf die Paclitaxelresistenz sind die IC₅₀- sowie IC₉₀-Werte dargestellt und lassen Unterschiede, wie z. B. unterhalb der Primärtumor-Metastasen-Paare UT-SCC 12A/B und UT-SCC 60A/B, offensichtlich werden.

Bei Betrachtung der Tabelle 23 wird deutlich, dass die Metastasen UT-SCC 60B und UT-SCC 74B ein deutlich höheres Resistenzverhalten gegenüber Paclitaxel präsentieren als die dazugehörigen Primärtumore. Bei dem Zelllinien-Paar UT-SCC 12A/B hingegen zeigte sich der Primärtumor resistenter gegenüber dem Zytostatikum als die entsprechende Metastase. Auch bei den beiden Primärtumor-Zelllinien BHY und PCI-I konnte ein deutlicher Unterschied der Resistenz gegenüber Paclitaxel nachgewiesen werden, wie bei der Cisplatinbehandlung zuvor beobachtbar.

3.1.4 Vergleich der verwendeten Zytostatika anhand von IC-Werten

Ein direkter Vergleich der IC-Werte lässt ersichtlich werden, dass die höchsten IC-Werte bei dem Zytostatikum 5-Fluorouracil nachgewiesen werden konnten. Andererseits sind die niedrigsten IC-Werte, abgesehen von wenigen IC₉₀-Werten nach 48- und 96-stündiger Inkubationszeit unter Cisplatintherapie, unter Paclitaxel zu beobachten gewesen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die meisten HNSCC-Zelllinien am sensibelsten auf den Mitosehemmstoff Paclitaxel ansprechen. Des Weiteren ist beim Vergleich der Zytostatikaresistenz der untersuchten HNSCC-Zelllinien auffällig, dass gegenüber 5-Fluorouracil und Paclitaxel die Zelllinie UT-SCC 12A am resistentesten war, wohingegen bei der Cisplatinbehandlung die höchste Resistenz der Primärtumorzelllinie BHY zuzuweisen war.

3.2 Einfluss von Zytostatika auf die Zytokinsekretion von HNSCC-Zelllinien

Um Aussagen über Zytokinsekretionsveränderungen unter einer in-vitro-Chemotherapie treffen zu können, wurde eine definierte Anzahl von Zellen der zuvor erwähnten acht HNSCC-Tumor-Zelllinien (BHY, PCI-I, UT-SCC 12A/B, UT-SCC 60A/B, UT-SCC 74A/B) für 48, 96 und 144 Stunden inkubiert, um anschließend die Zytokine in den Überständen mittels Bio-Plex-System™ und Flex-Set-System™ zu messen, wie in Kapitel 2.2.4.1 und 2.2.4.2 (Seite 40) beschrieben. Als Ausgangskonzentrationen dienten Zellproben in Zytostatika-freiem Medium, bei welchen die gleichen Inkubationszeiträume wie bei den Zytostatika-behandelten Proben eingesetzt wurden. Um Zytokinsekretionsveränderungen durch mikrobielle Verkeimungen ausschließen zu können, wurden, neben einer gründlichen mikroskopischen Prüfung vor der Probenentnahme, stichpunktartig Überstände zur mikrobiellen Untersuchung entnommen und an das Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, versendet. Für keine der eingesendeten Proben konnte ein Keimnachweis erbracht werden, sodass die Schlussfolgerung gezogen wird, dass die Zytokinsekretionsveränderungen sowohl auf die Inkubationszeit als auch auf die eingesetzten Zytostatika zurückzuführen sind. Ebenfalls konnte ein positiver Zytokinnachweis durch das Inkubationsmedium sowie die Zytostatikazusätze durch negativ ausgefallene Kontrollmessungen ausgeschlossen werden. Folgende Zytokine wurden ausgewählt und in den Überständen untersucht: G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13 und TNF- α .

	Zytokin								
	GM-CSF	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	IL-12	IL-13	TNF- α
Bio-Plex-System™									
Nachweisbarkeit	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Flex-Set-System™	G-CSF	GM-CSF	IL-1 β	IL-6	IL-8				
Nachweisbarkeit	+	+	+	+	+				

Tabelle 24: Nachweisbarkeit von Zytokinen in den untersuchten HNSCC-Zelllinienüberständen

In den eingefrorenen Überstandsproben ($n = 320$) der untersuchten Zelllinien BHY, PCI-I, UT-SCC 12 A/B, UT-SCC 60 A/B und UT-SCC 74 A/B konnten die mit einem Kreuz (+: ≥ 5 pg/ml/ 10^6 Zellen) versehenen Zytokine nachgewiesen werden. Die mit einem Strich (-) gekennzeichneten Zytokine lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Das Zytokin GM-CSF wurde mit beiden Methoden, d. h. sowohl mit dem Bio-Plex-System™ als auch dem Flex-Sets-System™ analysiert.

Wie in Tabelle 24 aufgeführt, konnte nur ein Teil der Zytokine durch die gemessene Fluoreszenzintensität detektiert und anhand der erstellten Standardkurve in eine Konzentrationseinheit (pg/ml) umgerechnet werden. Mittels eines im Verhältnis von Zellzahl zu Zytostatikakonzentration sowie Verdünnungsmedium identisch angesetztem MTT-Zytotoxizitäts-Assay wurde zu jeder Inkubationszeit sowie bei jedem Zytostatikum die Zahl der vitalen Zellen bestimmt und die Zytokinkonzentration auf 10^6 Zellen berechnet. Da die Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 sowie IL-13 in keiner der untersuchten Proben ($n = 320$) nachgewiesen werden konnten, werden sie im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht mehr erwähnt und es wird sich auf die Zytokine G-CSF, GM-CSF, IL1- β , IL-6, IL-8 sowie TNF- α konzentriert. Auch wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit aus Gründen der Übersichtlichkeit nur der 144-stündige Inkubationszeitraum behandelt, da sowohl die Zytokinkonzentrationsveränderungen als auch die zytotoxischen Effekte der Chemotherapeutika nach einer Inkubationszeit von 144 Stunden die aussagekräftigsten Werte boten.

3.2.1 Zytokinsekretion ohne Zytostatikabehandlung

Nach Inkubation in einem Wachstumsmedium (DMEM) sezernierten die untersuchten HNSCC-Tumorzelllinien die in Tabelle 24 aufgeführten Zytokine. Die gemessenen Zytokinkonzentrationen sind nun folgend Konzentrationsbereichen zugeordnet und tabellarisch dargestellt worden (Tabelle 25, Seite 53).

Zelllinien	Zytokine						
	Bio-Plex-System™ (Bio-Rad-Laboratories)		Flex-Set-System™ (BD Biosciences)				
	GM-CSF	TNF-α	G-CSF	GM-CSF	IL-1β	IL-6	IL-8
BHY	++	-	+++	++	++	+++	++++
PCI-I	-	+	-	-	-	+	+++
UT-SCC 12A	+++	-	+	+++	++	++	++++
UT-SCC 12B	++++	-	+++	+++	+++	++++	++++
UT-SCC 60A	++	+	+++	+++	++	++++	++++
UT-SCC 60B	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++
UT-SCC 74A	+++	-	++++	+++	+++	++++	+++++
UT-SCC 74B	-	++	+	++	+	+++	++++

Tabelle 25: Zytokinsekretion von permanenten HNSCC-Zelllinien nach 144 stündiger Inkubation im Wachstumsmedium (DMEM)

Mittels des Bio-Plex-Systems™ konnten die Zytokine GM-CSF und TNF-α nachgewiesen werden, sowie mittels des Flex-Set-Systems™ die Zytokine G-CSF, GM-CSF, IL-1β, IL-6 und IL-8. Folgende Konzentrationsbereiche in pg/ml/10⁶ Zellen wurden gewählt: -: < 5; +: 5 - 10; ++: 10 - 100; +++: 100 - 1000; ++++: 1000 - 10000; +++++: 10000 - 100000.

Wie aus Tabelle 25 hervorgeht, ist die Sekretion der hier untersuchten Zytokine von den ausgewählten acht HNSCC-Zelllinien sehr heterogen, sowohl die Art als auch die absolute Höhe der Zytokinkonzentration betreffend. Auch fanden sich geringfügige Differenzen aufgrund der unterschiedlichen Nachweismethodik bei dem doppelt bestimmten GM-CSF. Die Zytokine GM-CSF und IL-1β werden von allen Zelllinien außer von PCI-I und UT-SCC 74B gebildet. Mittels der Flex-Set-System™-Nachweismethode, anders als mit der Bio-Plex-System™-Methode, konnte jedoch eine GM-CSF-Konzentration bei UT-SCC 74B nachgewiesen werden. Das Zytokin G-CSF wurde in sehr heterogenen Konzentrationslevel von allen Zelllinien, mit Ausnahme von PCI-I, sezerniert. Die Variationsbreite erstreckte sich dabei von 2,6 pg/ml/10⁶ Zellen (UT-SCC 74B) bis zu 1857,9 pg/ml/10⁶ Zellen (UT-SCC 74A). Die Zytokine IL-6 und IL-8 wurden in den Proben aller Zelllinien gefunden, TNF-α hingegen nur bei PCI-I, UT-SCC 60A/B sowie bei UT-SCC 74B. Auffällig bei dem Zytokin TNF-α ist, dass die Konzentration von UT-SCC 60B (7300,4 pg/ml/10⁶ Zellen) deutlich höher ausfiel als die der restlichen drei Zelllinien (PCI-I: 2,4 pg/ml/10⁶ Zellen; UT-SCC 60A: 7,2 pg/ml/10⁶ Zellen; UT-SCC 74B: 29,0 pg/ml/10⁶ Zellen).

3.2.2 Zytokinsekretion unter 5-Fluorouracilbehandlung

Ausgehend von den Zytokinkonzentrationen ohne Zytostatikabehandlung wurden die identischen Konzentrationen sowie Zeiträume, wie in Kapitel 3.1.1 (Seite 47f) beschrieben, gewählt und anhand der zuvor beschriebenen acht HNSCC-Zelllinien untersucht. Exemplarisch dargestellt sind die Zytokinsekretionsveränderungen anhand der Zelllinie UT-SCC 60A und beim Primärtumor-Metastasen-Vergleich in Kombination mit UT-SCC 60B.

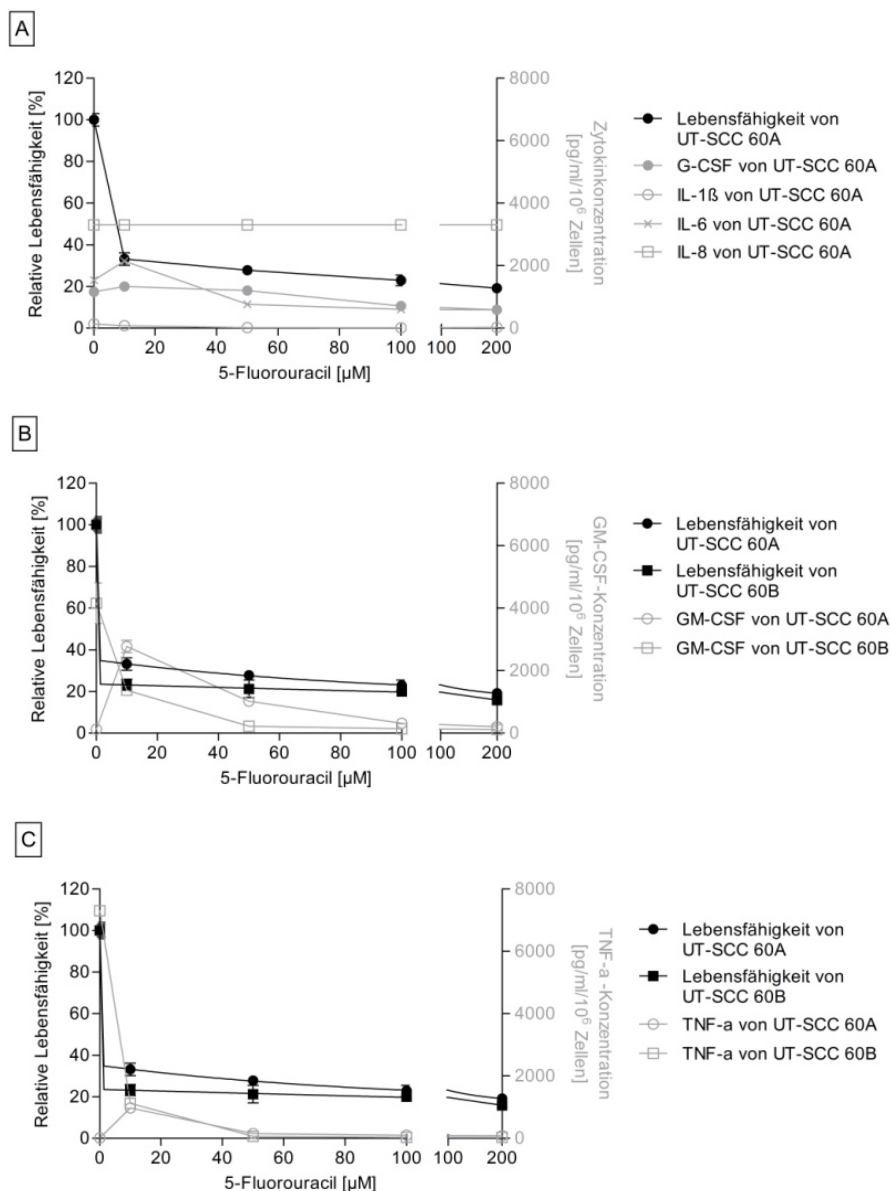


Abbildung 11: Zytokinsekretion unter 5-Fluorouracilbehandlung

Die Diagramme zeigen dosisabhängige Konzentrationsverlaufskurven der Zytokine G-CSF, IL-1β, IL-6, IL-8 in der Teilabbildung A, GM-CSF in Teilabbildung B sowie TNF-α in Teilabbildung C. Als Beispiel diente die HNSCC-Zelllinie UT-SCC 60A in Teilabbildung A sowie in Teilabbildung B und C in Kombination mit UT-SCC 60B. An der Primärachse ist die relative Lebensfähigkeit in Prozent aufgetragen (schwarz), an der Sekundärachse die jeweilige Zytokin-Konzentration in pg/ml/10⁶ Zellen (grau). Zur Symbolverknüpfung der relativen Lebensfähigkeit wurde eine Ein-Phasen exponentielle Funktion errechnet und in der Graphik eingefügt, wie zuvor in Kapitel 3.1. (ab Seite 47). In allen drei Teilabbildungen wurde zur besseren Darstellung der entscheidenden subletalen 5-Fluorouracil-Konzentration (10 μM) eine Segmentierung der X-Achse vorgenommen. Bis auf die GM-CSF-Werte (MW ± SD, n = 2 - 3) handelt es sich bei allen dargestellten Zytokinwerten um Einmalmessungen. In Teilabbildung A sind diejenigen Zytokine gezeigt, die bei allen Zelllinien unter in-vitro-Chemotherapie das gleiche Verlaufsmuster aufweisen. In Teilabbildung B und C ist der Primärtumor vergleichend mit der Metastase abgebildet, da sich bei den Zytokinen GM-CSF (B) und TNF-α (C) das Zytokinsekretionsverhalten nach 5-Fluorouracilbehandlung zwischen Primärtumor und Metastase unterschieden hat.

Abbildung 11 mit Teilabbildung A präsentiert diejenigen Zytokine, deren Konzentrationsveränderungen bei allen Zelllinien, d. h. sowohl bei den Primärtumoren als auch bei den Lymphknoten-Metastasen, gleichartig verliefen: unter zunehmenden 5-Fluorouracilkonzentrationen kam es zum Absinken der IL-1 β -Konzentration. Bei G-CSF und IL-6 hingegen zeigte sich ein Konzentrationsanstieg unter subletalen 5-Fluorouracilkonzentrationen (besonders 10 μ M). Das Zytokin IL-8 lag trotz der Einwirkung von 5-Fluorouracil dauerhaft in so hohen Konzentrationen vor, dass messtechnisch die normalen Standardkurven nicht ausreichend waren und die Konzentrationen Software-gestützt ermittelt wurden. Die errechneten Zytokinwerte zeigten keine Veränderungen durch das einwirkende Zytostatikum (Abbildung 11, Teilabbildung A). Da ein Unterschied zwischen Primärtumor und entsprechender Lymphknoten-Metastase bei den Zytokinkonzentrationsveränderungen von GM-CSF und TNF- α vorlag, sind diese beiden Zytokine separat in Teilabbildung B (GM-CSF) und Teilabbildung C (TNF- α) gezeigt. Während subletale 5-Fluorouracilkonzentrationen bei den Primärtumor-Zelllinien (im Beispiel UT-SCC 60A) einen Sekretionsanstieg von GM-CSF und TNF- α bewirkten, reagierte die Lymphknoten-Metastasen-Zelllinie (im Beispiel UT-SCC 60B) mit einem Sekretionsabfall auf steigende Zytostatikakonzentrationen. Dieser Effekt des Zytokins GM-CSF war ebenfalls bei der Zelllinie UT-SCC 12A/B nachweisbar, jedoch nicht bei UT-SCC 74A/B, wo auch bei der Metastase ein Konzentrationsanstieg zu verzeichnen war (Daten nicht gezeigt). Da nur bei dem Primärtumor-Metastasen-Paar UT-SCC 60A/B beide Partner TNF- α bildeten, konnte dieser Effekt nicht direkt durch ein zweites Zelllinienpaar bestätigt werden. Interessanterweise präsentierte die Primärtumor-Zelllinie PCI-I auf ansteigende 5-Fluorouracilkonzentrationen ebenfalls einen Zytokinanstieg von TNF- α und auch die Metastase UT-SCC 74B einen Konzentrationsabfall, womit eine indirekte Bestätigung für diesen unterschiedlichen Primärtumor-Metastasen-Effekt gefunden werden konnte (Abbildung 12).

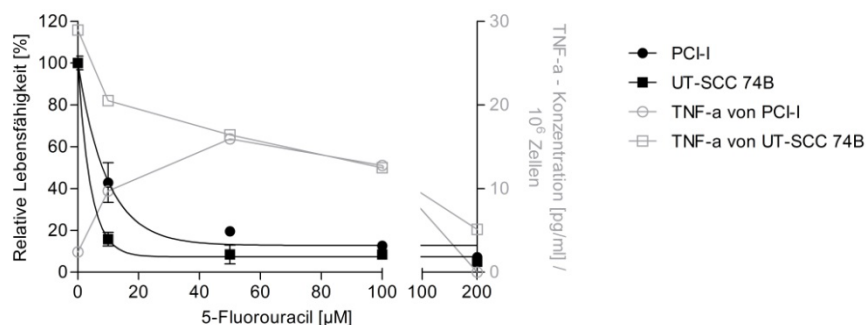


Abbildung 12: Zytokinsekretion des Zytokins TNF- α der HNSCC-Zelllinien PCI-I und UT-SCC 74B unter 5-Fluorouracilbehandlung

Der Aufbau der Graphik entspricht der Beschreibung von Abbildung 11 (Seite 54). Dargestellt ist eine dosisabhängige Konzentrationsverlaufskurve des Zytokins TNF- α von dem Primärtumor PCI-I und der Metastase UT-SCC 74B. Wie zuvor beim Zelllinien-Paar UT-SCC 60A/B (Abbildung 11, Teilabbildung C, Seite 54), zeigte der Primärtumor als Reaktion auf ansteigende 5-Fluorouracilkonzentrationen eine Konzentrationszunahme von TNF- α , während bei der Metastase ein Konzentrationsabfall von TNF- α nachzuweisen war. Zu beachten ist die Skalierung von TNF- α mit Einmalmessungen an der Sekundärachse, welche den niedrigen Konzentrationswerten von TNF- α angepasst werden musste.

3.2.3 Zytokinsekretion unter Cisplatinbehandlung

In dieser Versuchsdurchführung fanden die gleichen Zelllinien, Inkubationszeiträume sowie Cisplatinkonzentrationen Verwendung, wie in Kapitel 3.1.2 (Seite 49f) beschrieben. Exemplarisch wurde, wie zuvor bei der 5-Fluorouracilbehandlung, die HNSCC-Primärtumor-Zelllinie UT-SCC 60A ausgewählt und deren Zytokinsekretionsveränderungen unter Cisplatinbehandlung in Abbildung 13 dargestellt. Bei unterschiedlichem Verhalten zwischen Primärtumor und Metastase wurde ebenfalls eine kombinierte Darstellung mit UT-SCC 60B gewählt.

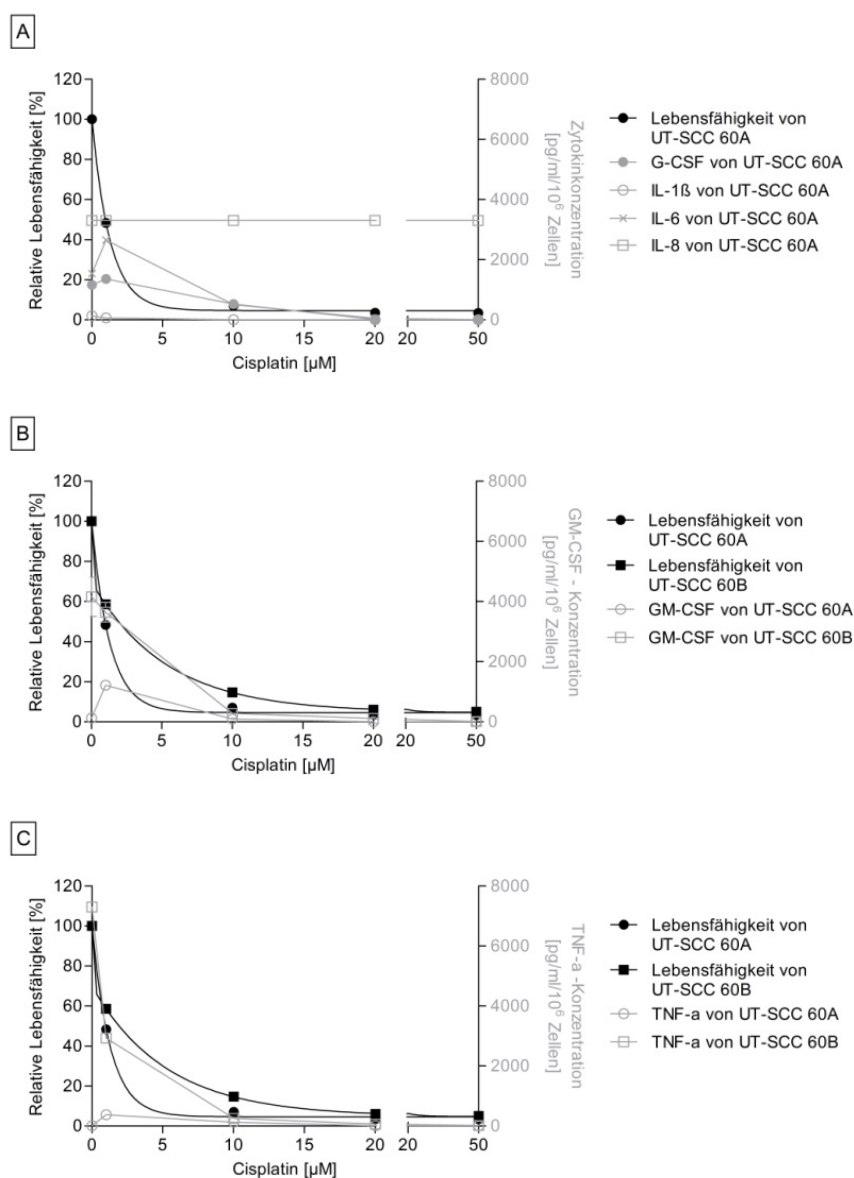


Abbildung 13: Zytokinsekretion unter Cisplatinbehandlung

Bezüglich der graphischen Darstellung siehe Text zu Abbildung 11 (Seite 54). Teilabbildung A zeigt dosisabhängige Konzentrationsverlaufskurven der Zytokine G-CSF, IL-1 β , IL-6 und IL-8 mit Einmalmessungen am Beispiel der Zelllinie UT-SCC 60A. Alle anderen untersuchten Zelllinien zeigten, wenn sie das jeweilige Zytokin sezernierten, gleichartige Verläufe dieser vier Zytokine. In Teilabbildung B und C sind die Zytokine GM-CSF (Doppelmessung) und TNF- α (Einmalmessung) separat im direkten Vergleich zwischen Primärtumor (UT-SCC 60A) und dazugehöriger Metastase (UT-SCC 60B) dargestellt, da ein unterschiedlicher Konzentrationsverlauf bei diesen beiden Zytokinen zu beobachten war.

Unter Cisplatinbehandlung reagierten alle untersuchten HNSCC-Zelllinien auf ansteigende Zytostatikakonzentrationen mit einem Abfall des Zytokins IL-1 β sowie, besonders bei subletalen Cisplatinkonzentrationen nachweisbar, mit einem Anstieg von G-CSF und IL-6. Diese Beobachtung zeigte sich in ähnlicher Art und Weise auch unter der Therapie von 5-Fluorouracil. Ebenfalls wurde, wie schon in Kapitel 3.2.2 unter 5-Fluorouracilbehandlung (Seite 53ff), aufgrund sehr hoher IL-8-Spiegel unter Cisplatinbehandlung die Zytokinkonzentrationen Software-gestützt errechnet, welche keine Abhängigkeit von den einwirkenden Zytostatikakonzentrationen erkennen ließen (Abbildung 13, Teilabbildung A). In Hinblick auf das Zytokin GM-CSF war zwischen Primärtumor und Metastase der Zelllinien UT-SCC 60A/B (Abbildung 13, Teilabbildung B) sowie UT-SCC 12A/B (Daten nicht gezeigt) ein unterschiedlicher Zytokinkonzentrationsverlauf unter Cisplatinbehandlung festzustellen: geringe Konzentrationen von Cisplatin (im Besonderen 1 μ M) bewirkten bei beiden Primärtumoren UT-SCC 60A (Abbildung 13, Teilabbildung B) und UT-SCC 12A (Daten nicht gezeigt) einen Sekretionsanstieg von GM-CSF, während die beiden dazugehörigen Metastasen-Zelllinien UT-SCC 60B (Abbildung 13, Teilabbildung B) und UT-SCC 12B (Daten nicht gezeigt) mit einem Zytokinkonzentrationsabfall reagierten. Dieses Verhalten konnte mit der dritten untersuchten Primärtumor-Metastasen-Zelllinie (UT-SCC 74A/B) nicht bestätigt werden, da sich sowohl beim Primärtumor als auch bei der Metastase ein Sekretionsanstieg der GM-CSF-Konzentration zeigte (Daten nicht gezeigt). Ein andersartiges Zytokinsekretionsverhalten zwischen Primärtumor und Lymphknoten-Metastase sind auch bei dem Zytokin TNF- α zu beobachten gewesen, wo subletale Cisplatinkonzentrationen bei dem Primärtumor einen Anstieg von TNF- α sowie bei der dazugehörigen Metastase einen Konzentrationsabfall bewirkten (Abbildung 13, Teilabbildung C). Wie schon zuvor unter 5-Fluorouracilbehandlung konnte eine indirekte Bestätigung dieser Beobachtung durch die Zelllinien PCI-I und UT-SCC 74B erbracht werden, da auch bei dem Primärtumor PCI-I ein Konzentrationsanstieg unter subletalen Cisplatinkonzentrationen nachzuweisen war, während die Metastase UT-SCC 74B einen dosisabhängigen Konzentrationsabfall von TNF- α erkennen ließ (Abbildung 14, Seite 58).

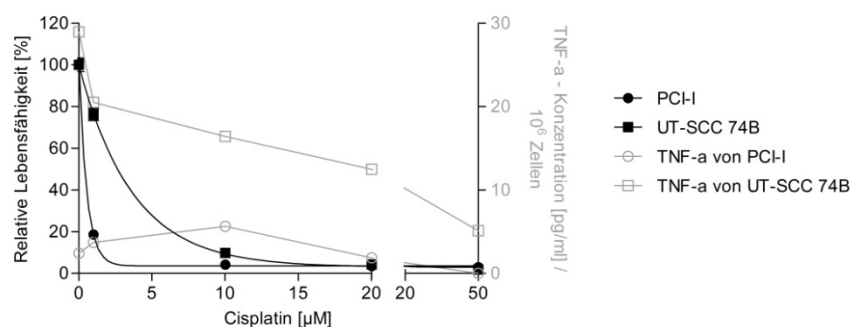


Abbildung 14: Zytokinsekretion des Zytokins TNF- α der HNSCC-Zelllinien PCI-I und UT-SCC 74B unter Cisplatinbehandlung

Erklärungen zur graphischen Darstellung sind im Text von Abbildung 11 (Seite 54) zu finden. Bei allen Zytokin Konzentrationsangaben handelt es sich in dieser Graphik um Einmalmessungen. Die dosisabhängige Konzentrationsverlaufskurve von TNF- α bestätigt die Beobachtung des Primärtumor-Metastasen-Paar UT-SCC 60A/B (Abbildung 13, Teilabbildung C, Seite 56): geringe Cisplatinkonzentrationen führten bei Primärtumor-Zelllinien (UT-SCC 60A und PCI-I) zu einem Sekretionsanstieg von TNF- α , bei Metastasen-Zelllinien (UT-SCC 60B und UT-SCC 74B) hingegen zeigte sich unter Cisplatinbehandlung ein Konzentrationsabfall dieses Zytokins. Aufgrund der niedrigeren Konzentration von TNF- α der beiden Zelllinien musste die Skalierung der Sekundärachse angepasst werden.

3.2.4 Zytokinsekretion unter Paclitaxelbehandlung

Als drittes Zytostatikum fand der Mitosehemmstoff Paclitaxel Verwendung, welcher in vier unterschiedlichen Konzentrationen (1, 10, 20, 50 μ M) sowie mit drei Inkubationszeiträumen (48, 96, 144 Stunden) an den HNSCC-Zelllinien BHY, PCI-I, UT-SCC 12A/B, UT-SCC 60A/B und UT-SCC 74A/B untersucht wurde. Abbildung 15 (Seite 59) verdeutlicht anhand der Primärtumor-Zelllinie UT-SCC 60A (Teilabbildung A) sowie in Kombination mit der Metastasen-Zelllinie UT-SCC 60B (Teilabbildung B und C) die Zytokinsekretionsveränderungen unter Paclitaxeltherapie.

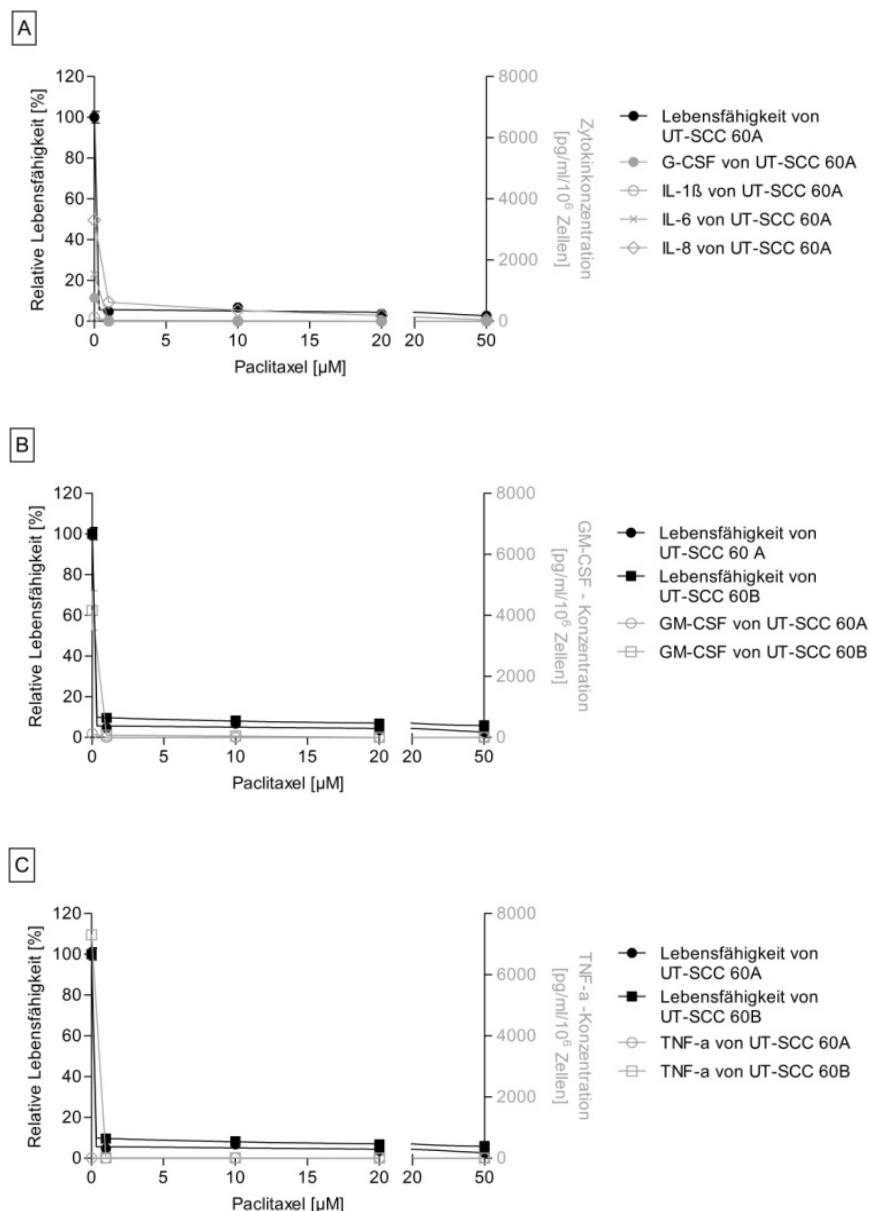


Abbildung 15: Zytokinsekretion unter Paclitaxelbehandlung

Der graphische Aufbau ist identisch zur Abbildung 11 (Seite 54). Dargestellt ist in Teilabbildung A der Konzentrationsverlauf der Zytokine G-CSF, IL-1 β , IL-6 und IL-8 mit Einmalmessungen sowie in Teilabbildung B und C der direkte Vergleich zwischen Primärtumor und Metastase der Zytokine GM-CSF (Doppelmessungen) und TNF- α (Einmalmessungen). Unabhängig von der Art des Zytokins und der Zelllinie war unter Paclitaxelbehandlung stets ein deutlicher Abfall der Zytokin-Konzentration zu beobachten.

Zum direkten Vergleich wurde dieselbe Darstellungsweise der Zytokine wie bei den Zytostatika 5-Fluorouracil und Cisplatin gewählt, obwohl sich die Zytokinsekretion unter Paclitaxeltherapie bei allen Zelllinien sowie allen Zytokinen gleichartig verhielt: schon unter sehr geringen Paclitaxelkonzentrationen (1 μ M) war nicht nur eine erhebliche Reduktion der Zellzahl zwischen 36,9 % (UT-SCC 12A) und 3,9 % (UT-SCC 74B) nach 144 Stunden zu beobachten, sondern auch ein starker Abfall aller gemessenen Zytokine bei allen Zelllinien. Sogar abfallende IL-8-Konzentrationen waren unter Paclitaxelbehandlung messbar (Abbildung 15, Teilabbildung A).

3.3 Potentielle Tumorstammzellmarker

Wie in Kapitel 1.5 (ab Seite 10) beschrieben, ist es bisher bei einigen Tumorentitäten gelungen Tumorzellen mit stammzellspezifischen Eigenschaften nachzuweisen. Auch in HNSCC konnte anhand der Oberflächenproteine CD44 und CD133 gezeigt werden, dass markertragende Subpopulationen mit Eigenschaften einer Stammzelle existent sind [100, 165]. Zunehmendes Interesse als potentielle Tumorstammzellmarker haben in den letzten Jahren intrazelluläre Funktionsproteine, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, gewonnen.

Auch im Rahmen dieser Arbeit sind HNSCC-Zellen sowohl von permanenten Zelllinien aus auch von soliden Gewebeproben auf potentielle Tumorstammzellmarker untersucht worden. Dafür wurden die Marker in potentielle Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur, des Wnt-Signalwegs sowie des embryonalen Ursprungs kategorisiert. Als Nachweismethoden fanden die Durchflusszytometrie, die Immunhistologie sowie der *Human Pluripotent Stem Cell Array* (Proteom Profiler™ Array) Verwendung.

3.3.1 Potentielle Tumorstammzellmarker in HNSCC-Zelllinien

3.3.1.1 Potentielle Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur

Um Tumorzellen auf potentielle Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur zu untersuchen, wurden acht permanente HNSCC-Tumorzelllinien in Kultur gebracht und als Analyseverfahren die Durchflusszytometrie gewählt. Bei der Herstellung einer Einzelzellsuspension, der Färbung sowie der durchflusszytometrischen Untersuchung wurde, wie in Kapitel 2.2.5 (Seite 41) beschrieben, vorgegangen. Anhand des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulichtes (SSC) wurde eine zentral eingestellte Population definiert und in weitere Diagramme übertragen. Als Negativ-Kontrolle diente die Isotypenkontrolle, wobei die Grenze entweder bei 2 % positiver Zellen oder bei einer abgrenzbaren Population in der Größenordnung 0 – 5 % positiver Zellen gesetzt wurde. Durch anschließendes Setzen von *Gates* konnten Populationen eingegrenzt und berechnet werden.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass Stammzellproteine (CD44 und Oct-4) in mononukleären Zellen des peripheren Blutes nachgewiesen werden konnten [288, 289]. Mit Hilfe des Lineage-Antikörper-Mix wurde im Vorfeld eine leukozytäre Verunreinigung der permanenten Zelllinien ebenso ausgeschlossen wie eine Avitalität der untersuchten Zellen mittels Annexin/PI-Färbungen (Daten nicht gezeigt).

Folgende Zelllinien wurden mittels des beschriebenen Verfahrens auf potentielle Tumorstammzellmarker untersucht und sind in Abbildung 16 dargestellt: PCI-I, BHY, UT-SCC 12A/B, UT-SCC 60A/B, UT-SCC 74A/B.

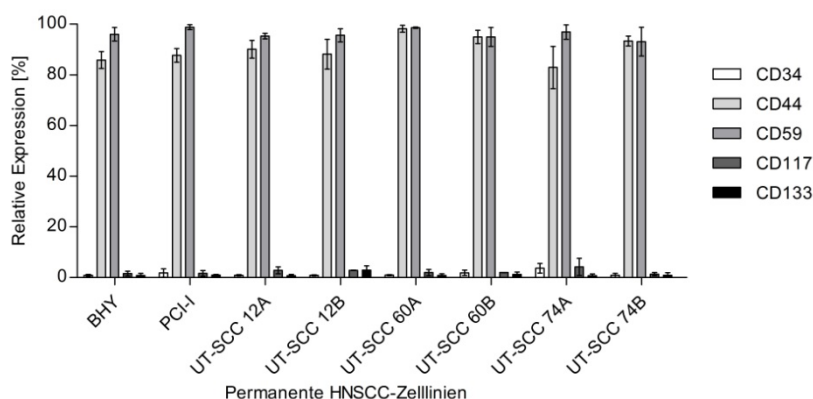


Abbildung 16: FACS-Analyse zur Charakterisierung von potentiellen Tumorstammzellmarkern der CD-Nomenklatur in permanenten HNSCC-Zelllinien

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die adhärennten Tumorzellen mit Trypsin gelöst und eine Einzelzellsuspension erstellt. Diese wurde mit den entsprechenden Ziel-Antikörpern Anti-Human CD34 (PE), Anti-Human CD44 (PE), Anti-Human CD59 (FITC), Anti-Human CD117 (PE), Anti-Human CD133 (APC) sowie den Isotypenkontroll-Antikörpern Anti-Human IgG1 (PE), Anti-Human IgG2a (FITC), Anti-Human IgG1 (APC) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Zum Ausschluss von leukozytären Zellen fand der Lineage-Antikörper-Mix (Anti-Human-CD3, -CD14, -CD16, -CD19, -CD20, -CD56) Verwendung (Daten nicht gezeigt). Ferner sind regelmäßige Annexin (FITC)/PI (PE) - Färbungen der FACS-Proben in den Versuchsdurchläufen zur Bestätigung der Zellvitalität mitgeführt worden (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm (MW $\pm$ SD; n = 2 – 3) dargestellt und verdeutlichen den prozentualen Anteil der CD34⁺/lin⁻, CD44⁺/lin⁻, CD59⁺/lin⁻, CD117⁺/lin⁻ und CD133⁺/lin⁻ Zellpopulation in den Zelllinien BHY, PCI-I, UT-SCC 12A/B, UT-SCC 60A/B sowie UT-SCC 74A/B. Das Expressionsprofil der einzelnen potentiellen Tumorstammzellmarker in den Zelllinien lässt ein homogenes Verteilungsmuster erkennen, mit einem geringen prozentualen Anteil von CD34, CD117 und CD133 sowie einem stark positiven Expressionslevel von CD44 und CD59.

Marker	Werteanzahl (N)	Minimaler Wert [%]	Maximaler Wert [%]	Mittelwert [%]	Standardabweichung
CD34	8	0,9	3,7	1,5	1,0
CD44	8	82,9	98,2	90,1	5,0
CD59	8	93,1	98,8	96,2	1,9
CD117	8	1,4	4,2	2,3	1,0
CD133	8	0,7	2,9	1,1	0,7

Tabelle 26: Expressionsprofil potentieller Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur in permanenten HNSCC-Zelllinien

Da kein Expressionsunterschied zwischen den Primärtumor- und Lymphknoten-Metastasen-Zelllinien erkannt werden konnte, ist nun folgend die summierten Expressionsprofile aller acht untersuchten potentiellen Tumorstammzellmarker gezeigt. Die tabellarische Darstellung bestätigt das im Balkendiagramm zuvor erkennbare homogene Verteilungsmuster der Tumorstammzellmarker unter den untersuchten Zelllinien.

Aus Abbildung 16 sowie Tabelle 26 ist ersichtlich, dass das Expressionsprofil der untersuchten potentiellen Tumorstammzellmarker an den oben aufgeführten HNSCC-Zelllinien sehr gleichmäßig verteilt ist. Während die Oberflächenproteine CD34, CD117 und CD133 auf nur sehr

wenigen Zellen (0,7 % - 4,2 %) exprimiert werden, ist der größte Anteil der untersuchten Zelllinien für die Marker CD44 und CD59 als positiv erkannt worden.

Es konnten hinsichtlich der ausgewählten Marker keine Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien beobachtet werden, auch nicht zwischen den Primärtumoren (BHY, PCI-I, UT-SCC 12A, UT-SCC 60A, UT-SCC 74A) und den Metastasen (UT-SCC 12B, UT-SCC 60B, UT-SCC 74B).

3.3.1.2 Potentielle Tumorstammzellmarker des Wnt-Signalwegs

In Analogie zu den Markern der CD-Nomenklatur wurden die acht permanenten HNSCC-Zelllinien auf zwei potentielle Tumorstammzellmarker des Wnt-Signalwegs untersucht. Da eine Überexpression von Frizzled- (FZD) 3 und Frizzled-7 in vielen Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte [192, 198, 199], wurden diese beiden Wnt-Rezeptoren ausgewählt und das Expressionsprofil mittels der Durchflusszytometrie anhand der HNSCC-Zelllinien analysiert.

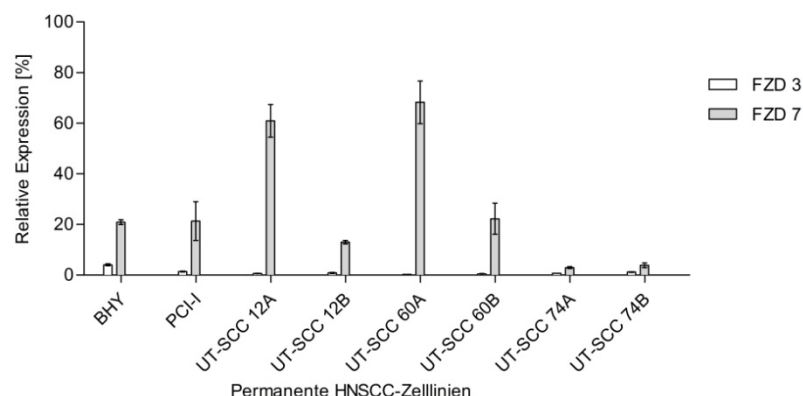


Abbildung 17: FACS-Analyse zur Charakterisierung von potentiellen Tumorstammzellmarkern des Wnt-Signalwegs in permanenten HNSCC-Zelllinien

Methodisch wurde aus den Zelllinien eine Einzelzellsuspension erstellt, diese gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (siehe auch Text zu Abbildung 16, Seite 61). Eingesetzt wurden die Ziel-Antikörper Anti-Human FZD3 (APC) und Anti-Human FZD7 (PE) sowie die Isotypenkontroll-Antikörper Anti-Human IgG2a (APC) und Anti-Human IgG2a (PE). Graphisch dargestellt im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung ($n = 2 - 4$) ist der prozentuale Anteil der Zellen, welche die Oberflächenproteine FZD 3 und 7 exprimieren. Da in Voruntersuchungen mittels Lineage-Antikörper-Mix (Anti-Human-CD3, -CD14, -CD16, -CD19, -CD20, -CD56) eine leukozytäre Verunreinigung der permanenten Zelllinien ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt), sind die nachweisbaren Zellen als FZD 3⁺/lin⁻ und als FZD 7⁺/lin⁻ zu bezeichnen. Zum Vitalitätsnachweis wurden FACS-Proben in den Untersuchungsreihen mit Annexin (FITC)/PI (PE) - Färbungen mitgeführt (Daten nicht gezeigt). Bei allen untersuchten Zelllinien ließen sich sowohl FZD3 als auch FZD7 nachweisen, wobei das Expressionsprofil von FZD7 zwischen den einzelnen Zelllinien stark variierte. Eine besonders hohe prozentuale Expression konnte für die Primärtumor-Zelllinien UT-SCC 12A und UT-SCC 60A gezeigt werden.

Marker	Werteanzahl (N)	Minimaler Wert [%]	Maximaler Wert [%]	Mittelwert [%]	Standard- abweichung
FZD 3	8	0,3	4,3	1,2	1,2
FZD 7	8	3,0	74,2	26,7	24,7

Tabelle 27: Expressionsprofil potentieller Tumorstammzellmarker des Wnt-Signalwegs in permanenten HNSCC-Zelllinien

Die tabellarisch summierte Darstellung verdeutlicht das zuvor erwähnte heterogene Expressionsmuster der beiden potentiellen Tumorstammzellmarker. Während das Oberflächenprotein FZD3 nur auf einem geringen Prozentsatz der Tumorzellen gefunden wurde, konnte eine Expression des FZD7-Proteins von bis zu 74,2 % (UT-SCC 60A) nachgewiesen werden.

Abbildung 17 sowie Tabelle 27 verdeutlichen das Expressionsprofil von FZD3 und FZD7 anhand von HNSCC-Zelllinien. Sowohl aus der graphischen als auch aus der tabellarischen Darstellung ist ersichtlich, dass das Frizzled-7-Protein, prozentual gesehen, bei jeder Tumorzelllinie deutlich höher exprimiert wird als das Frizzled-3-Protein. Außerdem ist anhand der Standardabweichung zu erkennen, dass das prozentuale Expressionslevel zwischen den einzelnen Zelllinien bei dem Frizzled-7-Protein sehr viel stärker variiert als bei dem Frizzled-3-Protein. Bei den beiden Primärtumor-Metastasen-Zelllinien-Paaren UT-SCC 12A/B und UT-SCC 60A/B ist zudem erkennbar, dass das Frizzled-7-Protein auf den Zellen der Primärtumorzelllinien (UT-SCC 12A: 61,0 %, UT-SCC 60A: 68,3 % (beides Mittelwerte)) sehr viel häufiger nachweisbar war als bei den dazugehörigen Metastasen (UT-SCC 12B: 13,0 %, UT-SCC 60B: 22,3 % (beides Mittelwerte)). Diese Betrachtung lässt sich aber anhand des dritten Primärtumor-Metastasen-Zelllinien-Paares UT-SCC 74A/B (UT-SCC 74A: 2,95 %, UT-SCC 74B: 3,85 % (beides Mittelwerte)) nicht bestätigen.

3.3.1.3 Potentielle Tumorstammzellmarker embryonalen Ursprungs

Anders als bei der Messung der potentiellen Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur und des Wnt-Signalwegs, bei welchen als Methode ausschließlich die Durchflusszytometrie Verwendung fand, wurde zur Analyse der potentiellen Tumorstammzellmarker embryonalen Ursprungs der *Human Pluripotent Stem Cell Array* (Proteom Profiler™ Array; R & D Systems) gewählt, welcher als eine Art *Screening-Methode* zur Detektion von Stammzellproteinen embryonalen Ursprungs diente. Methodisch wurde wie in Kapitel 2.2.7 (Seite 44ff) beschrieben vorgegangen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden acht (E-Cadherin, GATA-4, Goosecoid, Nanog, Oct-4, Snail, Sox2, Sox17) der insgesamt fünfzehn embryonalen Stammzellmarker ausgewählt und sich auf die Zelllinien PCI-I, UT-SCC 12A/B sowie UT-SCC 60A/B konzentriert, wie nun folgend in Abbildung 18 und Tabelle 28 (Seite 64) veranschaulicht. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass auch für die sieben weiteren der 15 untersuchten embryonalen Stammzellmarker (AFP, HCG, HNF3-β/FoxA2, Otx2, PDX-1/IPF1, TP63/TP73L und VEGF) ein positiver Nachweis bei allen fünf untersuchten permanenten HNSCC-Zelllinien (PCI-I, UT-SCC 12A/B und UT-SCC 60 A/B) erbracht werden konnte.

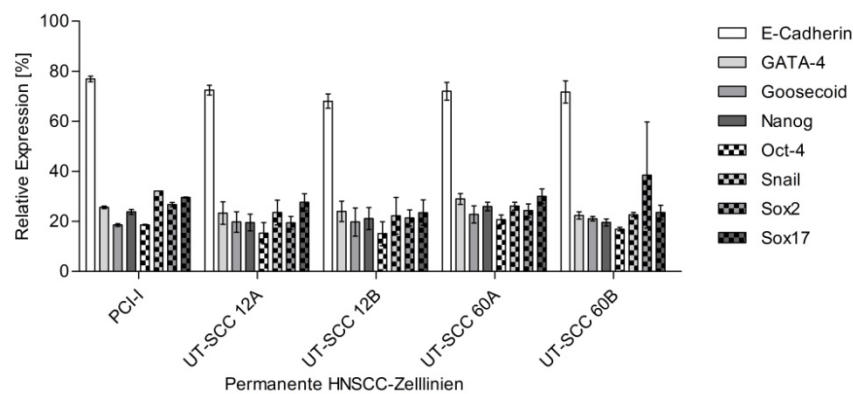


Abbildung 18: Human Pluripotent Stem Cell Array zur Identifizierung von potentiellen Tumorstammzellmarkern embryonalen Ursprungs in permanenten HNSCC-Zelllinien

Zur Durchführung des *Human Pluripotent Stem Cell Arrays* war es zuerst notwendig aus den Zellen der permanenten HNSCC-Zelllinien Proteine zu präparieren und diese auf die gespotteten Primär- und Kontrollantikörper der Nitrozellulosemembran zu geben. Nach weiteren Färbe- und Waschschritten sowie dem Trocknen der Nitrozellulosemembran wurde diese hochauflösend eingescannt und mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet. Es erfolgte die prozentuale Berechnung der Pixelintensität in Relation zur Positivkontrolle (siehe auch Kapitel 2.2.7, Seite 44ff). Im Balkendiagramm (MW $\pm$ SD; n = 2 - 4) dargestellt sind die prozentualen Expressionslevel der acht analysierten Stammzellmarker. Alle analysierten Stammzellproteine konnten bei jeder Zelllinie detektiert werden, wobei das Expressionsprofil zwischen den einzelnen Zelllinien nur geringe Unterschiede aufwies. Auch das Expressionsmuster der Stammzellfaktoren ließ, mit Ausnahme von E-Cadherin, eine weitgehende Homogenität erkennen.

Marker	Werteanzahl (N)	Minimaler Wert [%]	Maximaler Wert [%]	Mittelwert [%]	Standardabweichung
E-Cadherin	5	68,0	76,9	72,2	3,2
GATA-4	5	22,4	29,0	24,9	2,6
Goosecoid	5	18,6	22,8	20,4	1,6
Nanog	5	19,5	25,9	22,0	2,8
Oct-4	5	15,1	20,7	17,3	2,4
Snail	5	22,2	32,1	25,3	4,1
Sox2	5	19,4	38,5	26,1	7,5
Sox17	5	23,5	30,1	26,9	3,1

Tabelle 28: Expressionsprofil potentieller Tumorstammzellmarker embryonalen Ursprungs in permanenten HNSCC-Zelllinien

Auch die tabellarische Darstellung des Proteome Profiler Arrays verdeutlicht die weitgehende Homogenität der Stammzellmarkerexpression. Lediglich die Expression von E-Cadherin fiel mit 72,2 % im Durchschnitt deutlich höher aus.

Abbildung 18 in Kombination mit Tabelle 28 veranschaulicht das Expressionsprofil der acht ausgewählten embryonalen Stammzellmarker, welches nur eine geringe Variation zwischen den untersuchten Zelllinien erkennen ließ. Oct-4 zeigte das niedrigste Expressionslevel von allen untersuchten embryonalen Stammzellmarkern, wohingegen E-Cadherin mit durchschnittlich 72,2 % die stärkste Expression aufwies. Die anderen Stammzellproteine, inklusive GATA-4, Goosecoid, Nanog, Snail, Sox2 sowie Sox17, waren im Durchschnitt relativ homogen in einer Größenordnung von 20,4 - 26,9 % nachweisbar. Da für Oct-4 eine ganz entscheidende Rolle in der Vermittlung von Pluripotenz, Selbsterneuerung und auch der Karzinogenese nachgewiesen werden konnte [237-239], wurden zur weiteren Analyse dieses Transkriptionsfaktors ergänzende

Nachweismethoden, namentlich die Immunhistologie und die Durchflusszytometrie, durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden nun nachfolgend vorgestellt.

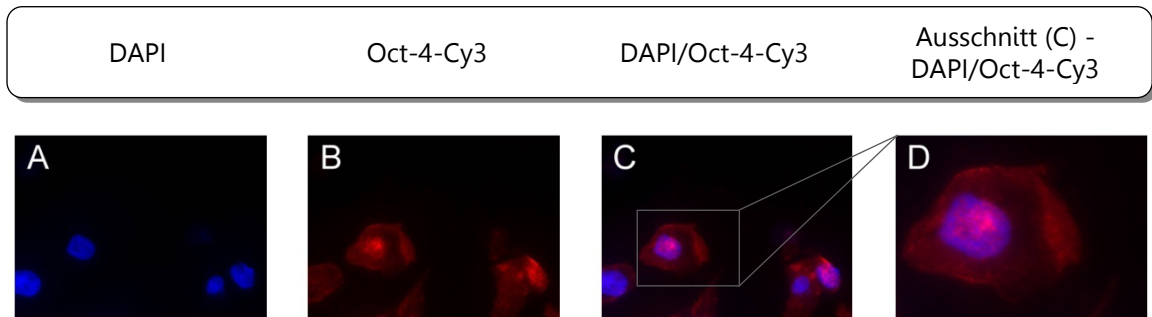


Abbildung 19: Immunhistologischer Nachweis von Oct-4 am Beispiel der Zelllinie UT-SCC 60B

Die HNSCC-Zelllinien wurden nach 48-stündiger Inkubation in einem Medium mit Hilfe einer Cytospinzentrifuge auf Objektträger fixiert und anschließend immunhistochemisch gefärbt. Für die Färbung wurde ein unselektiver Anti-Human-Oct-4-Antikörper (rabbit) in Kombination mit dem Sekundärantikörper Anti-rabbit-Cy3 verwendet. Zur Zellkernfärbung wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI sowie zur Permeabilisierung Triton X-100 eingesetzt. Erkennbar sind vier Zellkerne (A), von denen zwei Kerne (B und C) besonders intensiv das rot fluoreszierende Carbocyanin 3 (Cy3) anreichern und somit als typische nukleäre Färbung von Oct-4 angesehen werden können (D).

Wie in Abbildung 19 beispielhaft dargestellt, konnte in den permanenten HNSCC-Zelllinien nicht nur der Transkriptionsfaktor Oct-4 nachgewiesen, sondern auch eine nukleäre Lokalisation ausgemacht werden. Die intrazelluläre Lagebestimmung von Oct-4 war zur Differenzierung zwischen den Isoformen Oct-4A und Oct-4B von entscheidender Bedeutung, da nur der Isoform Oct-4A stammzellspezifische Eigenschaften, wie die Vermittlung von Selbsterneuerung und Pluripotenz, zugewiesen werden und nur diese im Nukleolus lokalisiert ist [241, 242]. Der Isoform Oct-4B hingegen, welche im Zytoplasma der Zelle vorzufinden ist, werden Funktionen wie der Schutz vor Apoptose und allgemeine Zellprotektion zugeschrieben. Wichtig an dieser Stelle ist zu erwähnen, dass nur nukleäre und keine zytoplasmatischen Lokalisationen bei permanenten HNSCC-Zelllinien ausgemacht werden konnten. Es wurde somit mit einer gewissen Vorsicht geschlussfolgert, dass nur die Oct-4A-Isoform in den untersuchten HNSCC-Zelllinien exprimiert wurde. Diese Feststellung erschien notwendig, da zur weiteren Quantifizierung dieses Transkriptionsfaktors in der FACS-Analyse nur direkt-gelabelte Antikörper verwendet werden konnten und ein direkt-gelabelter, selektiver Oct-4A-Antikörper nicht vertrieben wurde. Färbungen mit Sekundärantikörpern zeigten eine hohe Rate an unspezifischen Bindungen und konnten somit nicht eingesetzt werden. Erwähnenswert ist weiterhin, dass ein selektiver Oct-4A-Antikörper bei der Immunhistologie Verwendung fand und hiermit der Nachweis von Oct-4A im Nukleolus von permanenten HNSCC-Zelllinien gelang. Die bildliche Darstellung erfolgt aufgrund der Doppelfärbung mit Nanog in Kapitel 3.3.1.4 (Abbildung 23, Teilabbildung B, Seite 70). Die Beobachtung wurde zur Bestätigung der nukleären Lokalisation der Oct-4A-Isoform herangezogen.

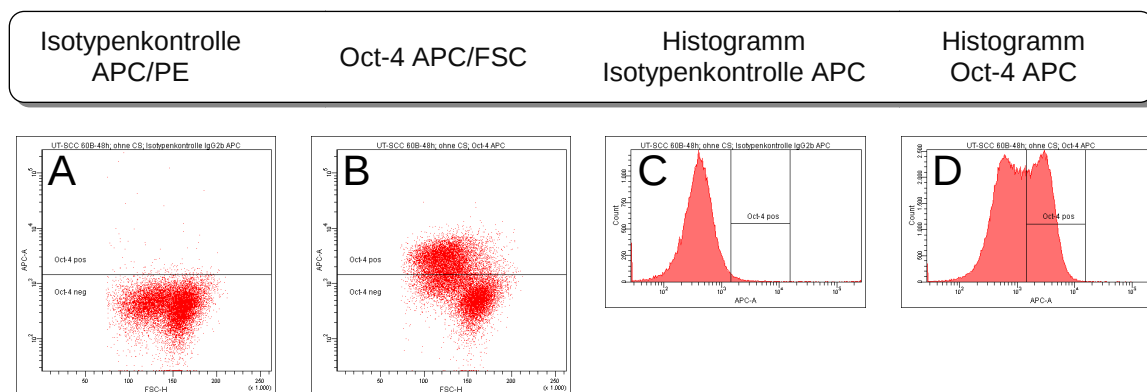


Abbildung 20: FACS-Identifizierung von Oct-4 am Beispiel der Zelllinie UT-SCC 60B

Die untersuchten HNSCC-Zelllinien wurden 48 Stunden im Medium inkubiert und anschließend eine Einzelzellsuspension erstellt, welche mit dem allgemeinen Anti-Human-Oct-4-Antikörper gefärbt wurde. Ebenfalls angewendet wurde ein Permeabilisierungspuffer mit Saponin. Am Beispiel der Zelllinie UT-SCC 60B kann im APC/FSC Dot Plot der Isotypenkontrolle eine bei 2 % positive Zellen eingefügte Positiv/Negativ-Grenze nachvollzogen werden (A). Im Oct-4 APC/FSC Dot Plot ist eine Oct-4⁺-Population auszumachen (B), welche in dieser Messung einem prozentualen Anteil von 36,1 % entsprach. Die genaue Bestimmung der Population erfolgte mittels eines Gates (nicht gezeigt). Ergänzend zur Dot Plot-Darstellung sind die entsprechenden Histogramme gezeigt: das Histogramm der Isotypenkontrolle mit APC (C) sowie das Histogramm mit Oct-4 APC, in dem ein zweiter Peak die Oct-4⁺-Population visualisiert (D).

Mittels der FACS-Analyse konnten Oct-4⁺-Zellen nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden. Eine erkennbare Population oberhalb der 2 % - Grenze in Abbildung 20 Teilabbildung B sowie in Teilabbildung D verdeutlichen das gewonnene Messergebnis von 36,1 % Oct-4⁺-Zellen. Nachfolgend sind die Ergebnisse der FACS-Analysen der bekannten acht permanenten HNSCC-Zelllinien aufgeführt.

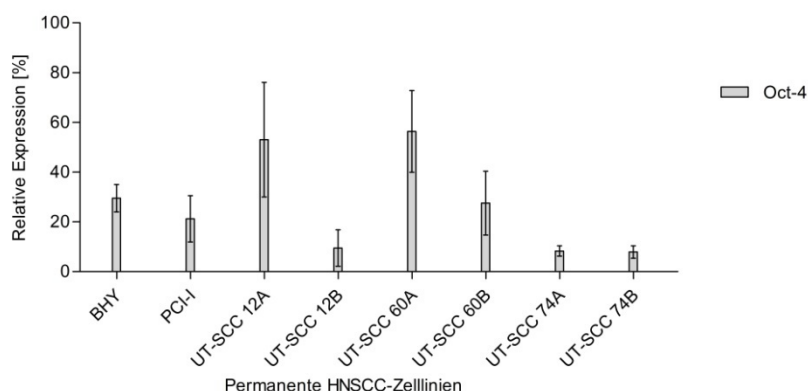


Abbildung 21: FACS-Analyse der Oct-4-Expression in permanenten HNSCC-Zelllinien

Bezüglich der Methode siehe Text zu Abbildung 20. Graphisch dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung ($n = 6 - 11$) ist das Expressionsprofil von Oct-4 anhand von acht permanenten HNSCC-Zelllinien. Das Balkendiagramm verdeutlicht eine ausgeprägte Heterogenität des Expressionslevels von Oct-4. Des Weiteren ist bei den beiden Primärtumor-Metastasen-Paaren UT-SCC 12A/B und UT-SCC 60A/B eine deutlich höhere Oct-4 Expression der Primärtumore im direkten Vergleich zu den dazugehörigen Metastasen auffällig.

Marker	Werteanzahl (N)	Minimaler Wert [%]	Maximaler Wert [%]	Mittelwert [%]	Standard- abweichung
Oct-4	8	3,6	86,6	22,9	19,3

Tabelle 29: Expressionsprofil des potentiellen Tumorstammzellmarkers Oct-4 in permanenten HNSCC-Zelllinien

Mit Hilfe der tabellarisch summierten Darstellung soll die zuvor in Abbildung 21 erwähnte deutliche Heterogenität des Expressionsprofils von Oct-4 anhand der 8 untersuchten permanenten HNSCC-Zelllinien mit einer Variationsbreite von bis zu 83 % hervorgehoben werden. Der maximale prozentuale Expressionswert von 86,6 % einer Primärtumor-Zelllinie (UT-SCC 12A) und die minimale Expressionsrate von 3,6 % einer Lymphknoten-Metastasen-Zelllinie (UT-SCC 12B) verdeutlichen ferner den erheblichen Unterschied zwischen einer Primärtumor- und der dazugehörigen Metastase-Zelllinie.

Die FACS-Analyse von Oct-4 bei HNSCC-Zelllinien, dargestellt in Abbildung 21 sowie Tabelle 29, zeigt eine ausgeprägte Heterogenität des Expressionsprofils dieses Stammzellmarkers. Bei Betrachtung der Oct-4-Expression der Zelllinien-Paare UT-SCC 12A/B und UT-SCC 60A/B wird deutlich, dass die prozentuale Oct-4-Expression der Primärtumore (UT-SCC 12A und UT-SCC 60A) bedeutend höher ausfällt als die der dazugehörigen Lymphknoten-Metastasen (UT-SCC 12B und UT-SCC 60B). Diese Beobachtung lässt sich durch das dritte untersuchte Primärtumor-Metastasen-Paar UT-SCC 74A/B nicht bestätigen (UT-SCC 74A, MW: 8,3 %, SD: 2,1; UT-SCC 74B, MW: 7,9 %, SD: 2,5). Eine ähnliche Beobachtung konnte interessanterweise zuvor schon bei dem potentiellen Tumorstammzellmarker FZD7 gemacht werden und lässt somit die Hypothese der Coexpression dieser beiden Stammzellmarker aufkommen, die unter anderem im folgenden Kapitel behandelt wird.

3.3.1.4 Coexpression potentieller Tumorstammzellmarker mit Oct-4

Um die Coexpression zwischen verschiedenen potentiellen Tumorstammzellmarkern und dem embryonalen Stammzellmarker Oct-4 zu untersuchen, wurde eine FACS-Analyse von einfach gefärbten Tumorzellen sowie eine Doppelfärbung zusammen mit Oct-4 durchgeführt. Als Antikörper bei diesem Versuchsaufbau wurden Anti-Human CD34 (PE), Anti-Human CD44 (PE), Anti-Human CD59 (FITC), Anti-Human CD117 (PE), Anti-Human CD133 (APC), Anti-Human FZD 3 (APC), Anti-Human FZD 7 (PE) sowie die Oct-4 Antikörper Anti-Human Oct-4 (APC oder PerCP) verwendet. CD34, CD44, CD59, CD117 sowie FZD7 wurden mit dem Anti-Human-Oct-4 (APC) Antikörper kombiniert und bei CD133 sowie FZD3 musste wegen gleicher Fluorochrome auf den Antikörper Anti-Human-Oct-4 (PerCP) ausgewichen werden. Als Isotypenkontroll-Antikörper wurden Anti-Human IgG1 (PE), Anti-Human IgG2a (FITC), Anti-Human IgG1 (APC), Anti-Human IgG2b (APC), Anti-Human IgG2b (PerCP) sowie Anti-Human IgG2a (PE) eingesetzt. Die zu messende Ziel-Zellzahl betrug 1 Million. Zur statistischen Auswertung wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s), ein nicht-parametrisches Maß für Korrelationen, mit folgender Formel berechnet:

$$r_s = \frac{\sum_{i=1}^n (R(x_i) - \bar{R}(x))(R(y_i) - \bar{R}(y))}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (R(x) - \bar{R}(x))^2 \sum_{i=1}^n (R(y) - \bar{R}(y))^2}}$$

mit: $R(x_i)$ = Rangwert x_i
 $\bar{R}_x$ = Mittelwert_x

Markerkombination	Werteanzahl	Spearman [r_s]	p-Wert
Oct-4/CD34	8	+0,3576	0,3894
Oct-4/CD44	8	+0,8810	0,0072
Oct-4/CD59	8	+0,8571	0,0107
Oct-4/CD117	8	+0,6826	0,0694
Oct-4/CD133	8	+0,6622	0,0831
Oct-4/FZD3	8	+0,3735	0,3599
Oct-4/FZD7	8	+0,9762	0,0004

Tabelle 30: Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman [r_s] von Oct-4 mit anderen potentiellen Tumorstammzellmarkern bei permanenten HNSCC-Zelllinien

Mit Hilfe einer FACS-Analyse der potentiellen Tumorstammzellmarker CD34, CD44, CD59, CD117, CD133, FZD3 und FZD7 aller acht untersuchten HNSCC-Zelllinien, jeweils als Einzelfärbung sowie in Kombination mit Oct-4, wurde aus den prozentualen Expressionswerten der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt. Da kein signifikanter Unterschied zwischen Primärtumor und Metastase in der Bestimmung des Rangkorrelationskoeffizienten festzustellen war, sind alle Zelllinien summiert ermittelt worden. Die Berechnung auf der Grundlage der zuvor aufgeführten Formel wurde mit dem Softwareprogramm GraphPad Prism® durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient kann dabei Werte zwischen $r_s = -1$ und $r_s = +1$ annehmen, wobei Werte nahe 0 signalisieren, dass kein statistischer Zusammenhang zwischen den zwei Markern existiert. Werte von $r_s = +1$ bzw. $r_s = -1$ zeigen an, dass ein positiver bzw. ein negativer Zusammenhang zwischen den gewählten Markern besteht. Für die potentiellen Tumorstammzellmarker CD34, CD117, CD133 und FZD3 konnte keine signifikante Korrelation ($p > 0,05$) nachgewiesen werden. Für CD44 und CD59 hingegen konnte eine signifikante Korrelation ($p \leq 0,05$) berechnet werden. Die höchste Korrelation ($r_s = +0,9762$; $p = 0,0004$) mit Oct-4 konnte jedoch für den potentiellen Stammzellmarker FZD7 nachgewiesen werden. Das Signifikanzniveau kann bei diesem Marker als „hoch signifikant“ ($p \leq 0,01$) bezeichnet werden.

Die Ergebnisse des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman zusammen mit dem Wahrscheinlichkeitswert aus Tabelle 30 stellen den statistischen Zusammenhang einer Coexpression zwischen einem potentiellen Tumorstammzellmarker und Oct-4 dar. Während für CD34, CD117, CD133 sowie FZD3 keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden konnte, zeigten CD44 und CD59 einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Stammzellmarker Oct-4. Es muss jedoch an dieser Stelle auf das hohe Expressionsprofil dieser beiden Marker hingewiesen werden (CD44: 90,1 %; CD59: 96,2 %; beides Mittelwerte; siehe auch Kapitel 3.3.1.1, Seite 60f). Die höchste Korrelation mit Oct-4 hingegen wurde für den potentiellen Tumorstammzellmarker FZD7 ermittelt ($p = 0,0004$). Alle errechneten Korrelationswerte konnten in Bezug auf die Coexpression mittels einer Doppelfärbung in der FACS-Analyse kontrolliert werden. Zur Visualisierung der signifikanten Korrelation sind nun folgend Dot Plot Darstellungen der FACS-Analyse als Doppelfärbungen von Oct-4 mit FZD7, CD44 und CD59 gezeigt.

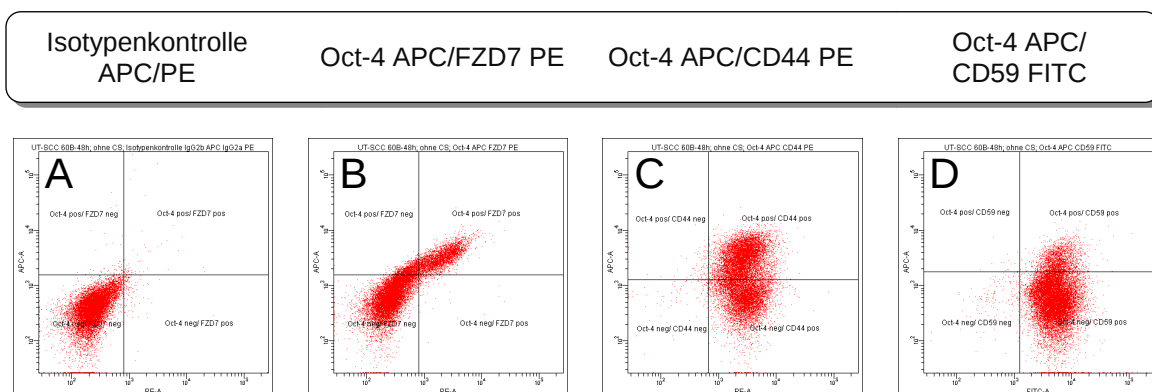


Abbildung 22: Doppelfärbung von Oct-4 mit FZD7, CD44 und CD59 in der FACS-Analyse am Beispiel der Zelllinie UT-SCC 60B

Zu Färbezwecken fanden die Antikörper Anti-Human CD44 (PE), Anti-Human CD59 (FITC), Anti-Human FZD 7 (PE), Anti-Human Oct-4 (APC) sowie Anti-Human IgG2b (APC) und Anti-Human IgG2a (PE) bei der Isotypenkontrolle der Oct-4 (APC)/FZD7 (PE) - Doppelfärbung Verwendung. Teilabbildung A zeigt in einer Dot Plot Darstellung die Isotypenkontrolle für die Doppelfärbung Oct-4 (APC)/FZD7 (PE), die Positiv/Negativ-Grenze wurde bei ca. 2 % positiver Zellen gesetzt. Das folgende Dot Plot, Oct-4 (APC) mit FZD7 (PE) in Teilabbildung B veranschaulicht, dass der Großteil aller Zellen entweder als Oct-4⁺/FZD7⁺ oder Oct-4⁻/FZD7⁻ erkannt werden konnte. Dass so gut wie alle untersuchten Zellen CD44 exprimierten und ein Teil der CD44-positiven Zellen auch positiv für Oct-4 identifiziert werden konnten (53,7 %), ist in der dritten Teilabbildung (C) als Dot Plot mit Oct-4 (APC) und CD44 (PE) gezeigt. Ähnlich stellt es sich bei dem Oberflächenprotein CD59 dar, wo ebenfalls der größte Teil der untersuchten Zellen positiv für diesen Marker gemessen wurde. Der Anteil doppelt positiver Zellen fiel bei der CD59/Oct-4-Doppelfärbung etwas geringer aus (13,0 %), wie im Dot Plot der Teilabbildung D gezeigt.

Im bisherigen Verlauf sind hauptsächlich Coexpressionen von potentiellen Tumorstammzellmarkern mit Oct-4 mit Hilfe einer FACS-Analyse untersucht worden. Ein weiterer Stammzellmarker, Nanog, wurde ebenfalls auf eine Coexpression mit Oct-4 analysiert. Da kein direkt gelabelter Anti-Human Nanog Antikörper verfügbar war und Sekundärantikörper eine hohe unspezifische Bindungsaktivität zu Tumorzellen in der Durchflusszytometrie aufwiesen, wurde als Nachweismethode die Immunhistologie gewählt und eine Doppelfärbung mit Oct-4A und Nanog durchgeführt.

Ebenfalls erfolgte bisher lediglich die immunhistologische Darstellung von Oct-4 mittels des allgemeinen und unspezifischen Oct-4-Antikörpers. Durch die Lokalisationsbestimmung ist auf die Isoform indirekt geschlossen worden (Kapitel 3.3.1.3, Seite 63ff). Da aber ein spezifischer Oct-4A-Antikörper für die Immunhistologie vertrieben wurde, erfolgte zudem ein Nachweis dieser Isoform anhand von permanenten HNSCC-Zelllinien (Abbildung 23, Seite 70).

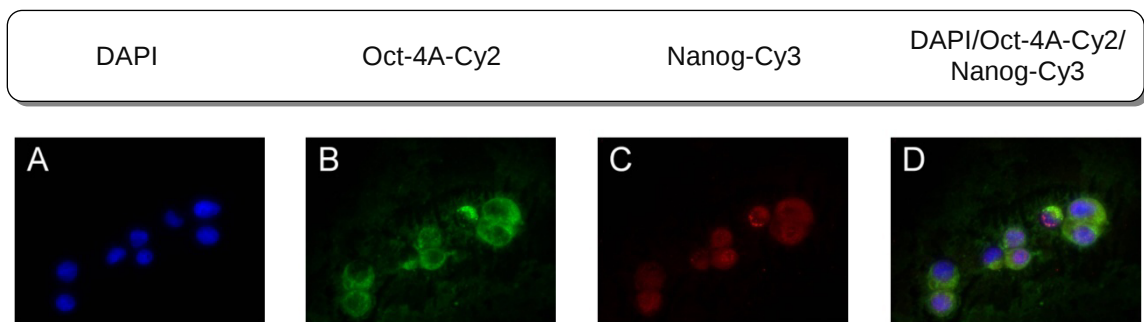


Abbildung 23: Immunhistologischer Nachweis einer Coexpression von Oct-4 und Nanog am Beispiel der Zelllinie UT-SCC 12B

Nach 48-stündiger Inkubation wurden die mittels Zentrifuge erstellten Cytospins mit den Antikörpern Anti-Human Oct-4A (mouse) in Kombination mit dem Sekundärantikörper Anti-mouse-Cy2 sowie Anti-Human Nanog (mouse) in Kombination mit Anti-mouse-Cy3 gefärbt. Die Zellkernfärbung wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI durchgeführt. Zu erkennen sind acht Zellkerne (A), von denen ein Zellkern intensiv das grün fluoreszierende Carbocyanin 2 (Cy2) anreichert (B) und somit als Oct-4A positiv erkannt werden konnte. Im gleichen Zellkern ist ebenfalls das deutlich fluoreszierende Cy3 zu erkennen (C), womit diese Zelle auch als Nanog positiv bezeichnet wurde. Ebenfalls kann die für Oct-4A und Nanog typisch nukleäre Färbung dieser Oct-4A/Nanog doppelt positiven Zelle erkannt werden (D).

Mit Hilfe der Immunhistologie konnte der Nachweis von Oct-4A und Nanog in permanenten HNSCC-Zelllinien sowie eine Coexpression dieser beiden Marker erbracht werden, wie in Abbildung 23 dargestellt ist. Ebenfalls kann anhand der gleichzeitigen Zellkernfärbung mittels DAPI eine nukleäre Lokalisation für die beiden embryonalen Transkriptionsfaktoren ausgemacht werden (Abbildung 23, Teilabbildung D).

Hinsichtlich der Coexpression kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse zusammengefasst werden, dass keine signifikante Coexpression zwischen CD34, CD117, CD133 und FZD3 mit Oct-4 anhand von permanenten HNSCC-Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Bei den beiden potentiellen Tumorstammzellmarkern CD44 und CD59 konnte hingegen eine statistisch signifikante Coexpression ermittelt werden. Die Aussagekraft dieser Berechnung ist jedoch vor dem Hintergrund des sehr ausgeprägten Expressionslevels dieser Marker in der Einfachfärbung kritisch zu diskutieren (siehe auch Kapitel 4.3, ab Seite 90).

Des Weiteren konnte eine statistisch hoch signifikante Coexpression von Oct-4 mit dem Wnt-Rezeptorprotein FZD7 errechnet ($p = 0,0004$) und in einer Doppelfärbung mittels Dot Plot durchflusszytometrisch dargestellt werden.

Immunhistologisch konnte zudem eine Coexpression von Oct-4A mit dem Transkriptionsfaktor Nanog bei HNSCC-Zelllinien bestätigt werden.

3.3.2 Potentielle Tumorstammzellmarker in Tumorgewebeproben

Nach den umfassenden Untersuchungen über ausgewählte potentielle Tumorstammzellmarker an acht permanenten HNSCC-Zelllinien, wie im Kapitel 3.3.1. (ab Seite 60) beschrieben, sollten jene Marker nun ebenfalls anhand von Tumorgewebeproben analysiert werden. Die benötigten Tumorgewebeproben wurden im Rahmen operativer Resektionen entnommen und bearbeitet, nach präoperativer Aufklärung und Zustimmung des Patienten. Der eine Teil der Proben wurde umgehend eingefroren, nativ oder in Stickstoff, um daraus Proteine für den Proteome Profiler™ Array oder Gewebeschnitte für die Immunhistologie zu gewinnen. Aus dem anderen Teil der Proben wurde eine Einzelzellsuspension zur durchflusszytometrischen Analyse erstellt.

Da in der Literatur eine Beschreibung von potentiellen Tumorstammzellen, wie z. B. CD44 und Oct-4B in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) vorliegt [288-290], war zunächst ein Ausschluss dieser Zellen notwendig. In der Immunhistologie wurde deshalb ein selektiver Oct-4A-Antikörper verwendet. Der Ausschluss in der FACS-Analyse gestaltete sich schwieriger, hier wird eine Kombinationsfärbung mit dem Lineage-Antikörper-Mix (Anti-Human-CD3, -CD14, -CD16, -CD19, -CD20, -CD56), wie in Kapitel 3.3.1. (ab Seite 60) aufgeführt, für zwingend eingestuft und ist deshalb erfolgt [80]. Ein Einsatz einzelner Primär- und Sekundärantikörpern war aufgrund vieler unspezifischer Bindungen der Sekundärantikörper nicht möglich. Des Weiteren kann eine Vitalität der mittels FACS-Analyse gezeigten Ergebnisse aufgrund von durchgeführten Annexin/PI-Färbungen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass aufgrund einer sehr großen Nachfrage an Gewebeproben die untersuchte Anzahl von soliden Tumoren (n = 5) sehr gering ausgefallen ist, was die Aussagekraft dieser Analysen deutlich einschränkt.

3.3.2.1 Potentielle Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur

Um solide Tumorproben auf potentielle Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur zu untersuchen, wurde eine FACS-Analyse der Oberflächenproteine CD34, CD44, CD59, CD117 und CD133 durchgeführt. Insgesamt wurden fünf HNSCC-Primärtumorgewebeproben auf diese Weise behandelt und durchflusszytometrisch untersucht. Neben den Tumorgewebeproben wurde auch gesundes Nasenmuschelgewebe auf die zuvor erwähnten potentiellen Tumorstammzellmarker analysiert. Beim Nasenmuschelgewebe war es, anders als bei den soliden Tumoren, aufgrund des ausgeprägten und häufigen Nachweises mikrobieller Erreger im Untersuchungsgut notwendig, vor der FACS-Analyse eine 48-stündige Kultur mit antibiotischen und antimykotischen Zusätzen anzusetzen. Die unterschiedliche Methodik schränkt die Aussagekraft über den tatsächlichen Stammzellgehalt in den Nasenmuschelgewebeproben sowie eine direkte Vergleichbarkeit beider Gewebeproben ein.

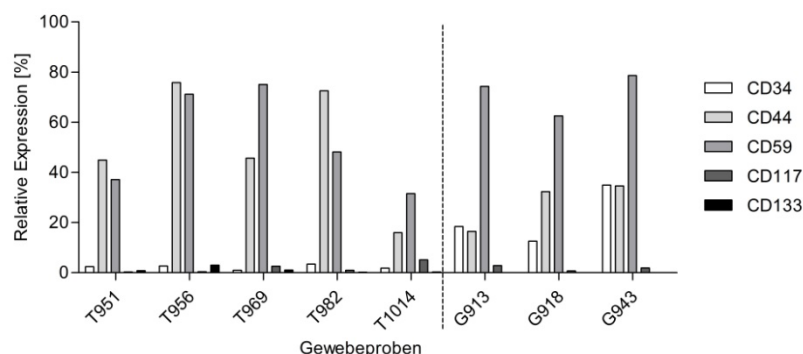


Abbildung 24: FACS-Analyse zur Charakterisierung von potentiellen Tumorstammzellmarkern der CD-Nomenklatur in HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe

Nach manueller Zerkleinerung sowie der Behandlung mit den Enzymen Collagenase Typ II, Dispase und Hyaluronidase Typ Is erfolgte eine Färbung mit den Antikörpern Anti-Human CD34 (PE), Anti-Human CD44 (PE), Anti-Human CD59 (FITC), Anti-Human CD117 (PE), Anti-Human CD133 (APC), Anti-Human IgG1 (PE), Anti-Human IgG1 (FITC), Anti-Human IgG2a (FITC), Anti-Human IgG1 (APC) sowie anschließend die durchflusszytometrische Messung. Bei allen Analysen handelte es sich um Einmalmessungen. Dargestellt sind insgesamt fünf HNSCC-Primärtumor- (T) sowie drei gesunde Nasenmuschelgewebeprobe (G) mit dem Expressionsprofil von CD34, CD44, CD59 und CD117. Der Marker CD133 konnte nur für die Tumorgewebeprobe ausgewertet und angegeben werden, da bei den Nasenmuschelgeweben eine Verunreinigung des Antikörpers nicht ausgeschlossen werden konnte. Wegen häufiger mikrobieller Verunreinigung des Nasenmuschelgewebes musste vor der FACS-Analyse eine 48-stündige Kultur der Einzelzellsuspension mit 4 - 6 % Penicillin, Streptomycin sowie Amphotericin B angelegt werden. Da für Kulturmedien sowie deren Zusätze ein Einfluss auf Stammzellen nicht ausgeschlossen werden kann, sollte ein direkter Vergleich zwischen Tumor- und Nasenmuschelgewebeprobe nur mit Zurückhaltung erfolgen. Wegen der Identifikation von potentiellen Tumorstammzellmarkern in gesunden Gewebeprobe ist trotzdem auf eine Darstellung an dieser Stelle nicht verzichtet worden. Zu erkennen ist im Balkendiagramm, dass die Marker CD44 und CD59 von den fünf untersuchten Proteinen am stärksten exprimiert werden, jedoch mit deutlicher Variation zwischen den einzelnen Gewebeprobe. Die potentiellen Stammzellmarker CD34, CD117 und CD133 werden ebenfalls von soliden Tumoren exprimiert, jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß als CD44 und CD59.

Gewebe- probe	Marker	Werteanzahl (N)	Minimaler Wert [%]	Maximaler Wert [%]	Mittelwert [%]	Standard- abweichung
Tumor	CD34	5	1,0	3,4	2,3	0,9
	CD44	5	16,0	75,8	51,0	24,3
	CD59	5	31,5	75,1	52,6	19,7
	CD117	5	0,3	5,1	1,9	2,0
	CD133	5	0,2	3,0	1,1	1,1
Nasen- muschel	CD34	3	12,6	34,9	22,0	11,6
	CD44	3	16,5	34,6	27,8	9,9
	CD59	3	62,5	78,6	71,8	8,3
	CD117	3	0,7	2,8	1,8	1,1

Tabelle 31: Expressionsprofil potentieller Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur in HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe

Tabellarisch summiert dargestellt sind die mittels FACS-Analyse ermittelten prozentualen Anteile der potentiellen Tumorstammzellmarker von fünf Tumor- sowie drei Nasenmuschelgewebeprobe. Das hohe Expressionsprofil von CD44 und CD59 sowie deren starke Variation bei soliden Tumorzellen werden anhand der Mittelwerte mit Standardabweichung deutlich. Auch ist eine geringe Expression von CD34, CD117 und CD133 zu erkennen. Auffällig bei dem gesunden Nasenmuschelgewebe ist die hohe Expression des Markers CD34.

Abbildung 24 und Tabelle 31 verdeutlichen die Verteilung der potentiellen Tumorstammzellmarker in fünf untersuchten HNSCC-Primärtumor- sowie in drei gesunden Nasenmuschelgewebeprobe. Das Expressionsmuster dieser soliden Tumore wies einen hohen prozentualen Anteil von CD44⁺- und CD59⁺-Zellen auf, wie die tabellarisch summierte Darstellung erkennen lässt. Die Oberflächenproteine CD34, CD117 sowie CD133 hingegen wurden nur von wenigen soliden Tumorzellen mit deutlicher Variation exprimiert (0,2 - 5,1 %). Zusätzlich zu den fünf Tumorgewebeprobe sind drei gesunde Nasenmuschelgewebe auf potentielle Tumorstammzellen untersucht worden. Um zu demonstrieren, dass die untersuchten potentiellen Tumorstammzellmarker, bis auf den nicht ausgewerteten Marker CD133, auch in gesundem Gewebe gefunden werden konnten, erfolgte trotz unterschiedlicher Methodik eine kombinierte Darstellung in Abbildung 24 und Tabelle 31.

3.3.2.2 Potentielle Tumorstammzellmarker des Wnt-Signalwegs

Neben den potentiellen Tumorstammzellmarkern der CD-Nomenklatur wurden dieselben soliden Gewebe mittels einer FACS-Analyse auch auf zwei Marker des Wnt-Signalweges untersucht. Als Ziel-Proteine wurden erneut die beiden Frizzled-Rezeptoren 3 und 7 (FZD3 und FZD7) gewählt und das relative Expressionsniveau anhand der zuvor erwähnten fünf Tumor- sowie drei Nasenmuschelgewebeprobe bestimmt.

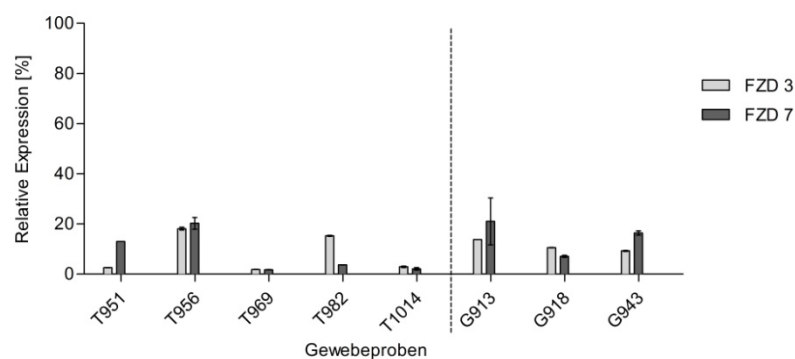


Abbildung 25: FACS-Analyse zur Charakterisierung von potentiellen Tumorstammzellmarkern des Wnt-Signalwegs in HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe

Zur Färbung wurden die Antikörper Anti-Human FZD3 (APC) und Anti-Human FZD7 (PE) sowie die Isotypenkontrollen Anti-Human IgG2a (APC) und Anti-Human IgG2a (PE) verwendet. Im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung ($n = 2 - 4$) ist das Expressionsmuster der beiden Frizzled-Proteine dargestellt. Eingelegt im Balkendiagramm ist eine Trennlinie zwischen den Tumor- (T) und gesunden Nasenmuschelgewebeprobe (G), da aufgrund unterschiedlicher Methodik kein direkter Vergleich zwischen beiden Gewebearten gezogen werden sollte.

Die Graphik zeigt ein sehr niedriges sowie heterogenes Expressionslevel beider Proteine bei den Tumorgewebeprobe mit einem sehr niedrigen Expressionsniveau von T969 und T1014 sowie einem deutlich höheren Expressionslevel von T956. Die Tumore T951 und T982 hingegen präsentierten eine verstärkte Expression von FZD7 bzw. FZD3.

Gewebe- probe	Marker	Werteanzahl (N)	Minimaler Wert [%]	Maximaler Wert [%]	Mittelwert [%]	Standard- abweichung
Tumor	FZD3	5	1,85	18,1	8,1	7,9
	FZD7	5	1,75	20,3	8,1	8,2
Nasen- muschel	FZD3	3	12,6	34,9	22,0	11,6
	FZD7	3	16,5	34,6	27,8	9,9

Tabelle 32: Expressionsprofil potentieller Tumorstammzellmarker des Wnt-Signalwegs an soliden HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe

Die tabellarische Darstellung veranschaulicht das sehr heterogene Expressionsprofil der beiden Frizzled - Proteine 3 und 7 auf soliden Tumorgeweben. Auch auf den Zellen des Nasenmuschelgewebes konnten beide Marker nachgewiesen werden. Ein direkter Vergleich zwischen beiden Geweben sollte aufgrund unterschiedlicher Methodik nicht erfolgen.

Bei Betrachtung von Abbildung 25 wird deutlich, dass das Expressionslevel von FZD3 und FZD7 sehr heterogen in Bezug auf die einzelnen Gewebeprobe ausfiel. Bei den beiden Tumorgewebeprobe T969 und T1014 konnten fast identische prozentuale Zellzahlen auf sehr niedrigem Niveau für die beiden Oberflächenproteine des Wnt-Signalwegs bestimmt werden (1,7 - 3,1 %). T956 wies hingegen im direkten Vergleich das höchste Expressionsprofil von FZD3 und FZD7 auf (18,1 bzw. 20,3 %). Während T951 den Marker FZD7 stärker als FZD3 exprimierte, verhielt sich dies bei T982 umgekehrt. Auch in den drei Nasenmuschelgewebeprobe konnten die beiden Frizzled-Rezeptoren mit einem heterogenen Expressionsmuster gemessen werden. Ein direkter Vergleich kann, wie zuvor erwähnt, zwischen beiden Gewebearten nicht gezogen werden. Dies wäre jedoch hinsichtlich der Charakterisierung als potentieller Tumormarker notwendig gewesen, um eine Abgrenzung zu Gewebestammzellen vornehmen zu können.

3.3.2.3 Potentielle Tumorstammzellmarker embryonalen Ursprungs

Analog zu den potentiellen Tumorstammzellmarkern embryonalen Ursprungs bei HNSCC-Zelllinien wurden solide Tumor- sowie Nasenmuschelgewebeprobe mittels des *Human Pluripotent Stem Cell Array* (Proteom Profiler™ Array; R & D Systems) untersucht. An dieser Stelle soll eine kleine Auswahl von acht (E-Cadherin; GATA-4; Goosecoid; Nanog; Oct-4; Snail; Sox2; Sox17) der insgesamt fünfzehn untersuchten Proteine der Übersichtlichkeit dienlich sein, wobei zu erwähnen ist, dass alle sieben anderen Proteine (AFP, HCG, HNF3-β/FoxA2, Otx2, PDX-1/IPF1, TP63/TP73L und VEGF) ebenfalls nachgewiesen werden konnten. Als zu analysierendes Gewebe fanden insgesamt sechs HNSCC-Primärtumor- und vier gesunde Nasenmuschelgewebeprobe Verwendung und sind nun folgend in Abbildung 26 sowie Tabelle 33 dargestellt.

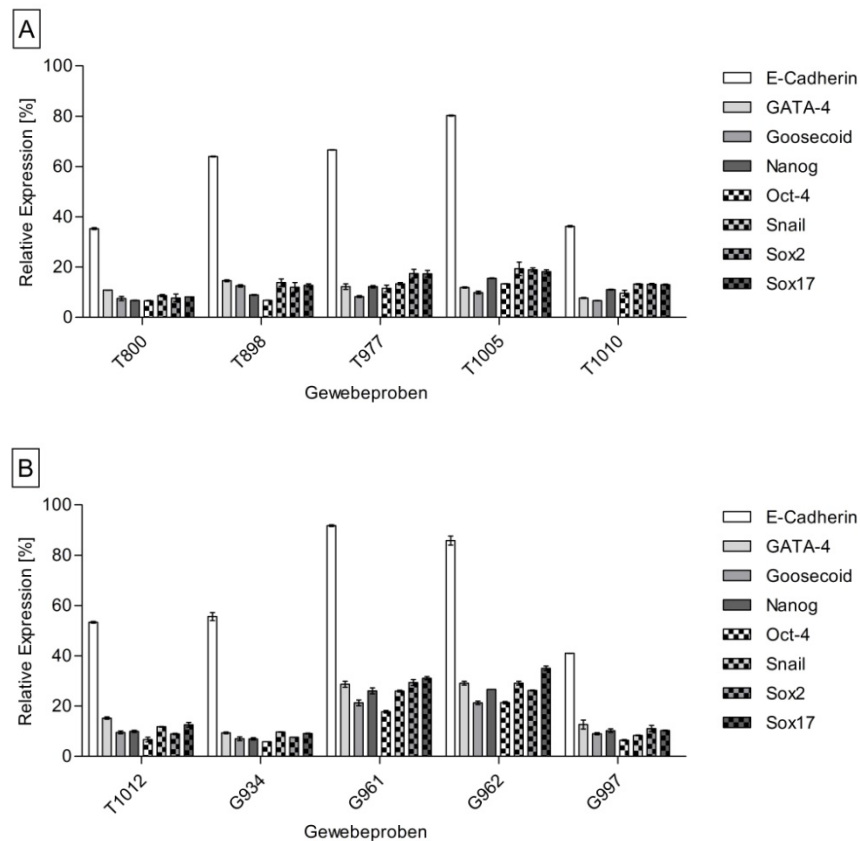


Abbildung 26: Proteome Profiler™ Array zur Identifizierung von potentiellen Tumorstammzellmarkern embryonalen Ursprungs in HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe

Nach dem Auftauen der zuvor lysierten Gewebeprobe sowie der Proteinquantifizierung nach Bradford wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran gegeben, auf der sich gespottete Primär- und Kontrollantikörper befanden. Bevor die Auswertung, wie in Kapitel 2.2.7 ab Seite 44 beschrieben, erfolgen konnte, folgten noch mehrere Waschschrte und Färbungen mit Sekundärantikörpern. Da bei dieser Methode die Gewebearten direkt, d. h. ohne längere Kulturzeit, verarbeitet und damit gleichartig behandelt werden konnten, ist eine Vergleichbarkeit zwischen den beiden Gewebetypen Tumor und Nasenmuschel an dieser Stelle möglich. Dargestellt ist das prozentuale Expressionsprofil der acht ausgewählten embryonalen Stammzellmarker von sechs Tumorgewebeprobe (T800, T898, T977, T1005, T1010 sowie T1012 in Teilabbildung A und B) sowie vier Nasenmuschelgewebeprobe (G934, G961, G962 und 997 in Teilabbildung B). Ersichtlich aus dem Balkendiagramm (MW $\pm$ SD; n = 2 - 4) ist ein homogenes Expressionsmuster der Stammzellmarker in den Gewebeprobe. Lediglich E-Cadherin war mit Expressionsraten von 35 - 80 % deutlich höher nachweisbar. Bei vergleichender Betrachtung der vier Nasenmuschelgewebe ist auffällig, dass G961 und G962, bezogen auf alle untersuchten Stammzellmarker, ein deutlich höheres Expressionsprofil aufwiesen. Die anderen beiden Nasenmuschelproben, G934 und G997, zeigten hingegen ein relativ vergleichbares Expressionsmuster zu den Tumorgewebeprobe.

Gewebe- probe	Marker	Werteanzahl (N)	Minimaler Wert [%]	Maximaler Wert [%]	Mittelwert [%]	Standard- abweichung
Tumor	GATA-4	6	7,7	15,2	12,1	2,7
	Goosecoid	6	6,6	12,6	9,1	2,1
	E-Cadherin	6	35,3	80,3	56,0	17,9
	Nanog	6	6,7	15,6	10,7	3,0
	Oct-4	6	6,6	13,4	9,1	2,9
	Snail	6	8,7	19,3	13,4	3,5
	Sox2	6	7,7	18,9	13,0	4,5
Nasen- muschel	Sox17	6	8,2	18,1	13,7	3,6
	GATA-4	4	9,4	29,1	19,9	10,4
	Goosecoid	4	6,9	21,3	14,6	7,7
	E-Cadherin	4	41,0	91,8	68,5	24,2
	Nanog	4	6,9	26,6	17,5	10,3
	Oct-4	4	5,8	21,3	12,8	7,9
	Snail	4	8,4	29,1	18,3	10,8
	Sox2	4	7,5	29,3	18,5	10,8
	Sox17	4	9,1	35,0	21,4	13,6

Tabelle 33: Expressionsprofil potentieller Tumorstammzellmarker embryonalen Ursprungs von HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeproben

Die tabellarisch summierte Darstellung lässt das homogene Expressionsbild der embryonalen Stammzellproteine in den Tumorgewebeproben sowie ein heterogenes Expressionsmuster mit höheren Standardabweichungen in den Nasenmuschelgeweben erkennen. Diese Beobachtung lässt sich durch die beiden Gewebeproben G961 und G962 erklären, bei welchen alle Stammzellmarker deutlich höher nachweisbar waren als bei G934 und G997 (siehe Abbildung 26 mit Teilabbildung B).

Wie anhand von Abbildung 26 und Tabelle 33 ersichtlich wird, zeigte die Analyse der Stammzellmarker in den sechs Tumorgewebeproben ein weitgehend homogenes Expressionsmuster. Wie schon bei den HNSCC-Zelllinien ist E-Cadherin derjenige Marker, welcher bei soliden Tumorzellen mit durchschnittlich 56 % deutlich stärker exprimiert wurde als die anderen sieben Marker, die in einem Expressionsbereich von 9,1 – 19,3 % nachgewiesen werden konnten. Auch bei den gesunden Nasenmuschelgeweben konnten alle Stammzellproteine erkannt werden, wobei ein deutlich stärkeres Expressionslevel aller Stammzellproteine in den beiden Geweben G961 und G962 auffällig war. Dieses hat zur Folge, dass in der Summation aller gesunden Gewebe jeder Stammzellfaktor durchschnittlich höher exprimiert wurde als im neoplastischen Gewebe, wie Tabelle 33 abbildet.

Wie zuvor in Kapitel 3.3.1.3 (ab Seite 63), sind im Verlauf dieser Dissertationsarbeit aufgrund der Relevanz des Transkriptionsfaktors Oct-4 weiterführende Analysen mittels Immunhistologie und Durchflusszytometrie durchgeführt worden. Zuerst sollen an dieser Stelle die Ergebnisse der immunhistologischen Färbung vorgestellt werden.

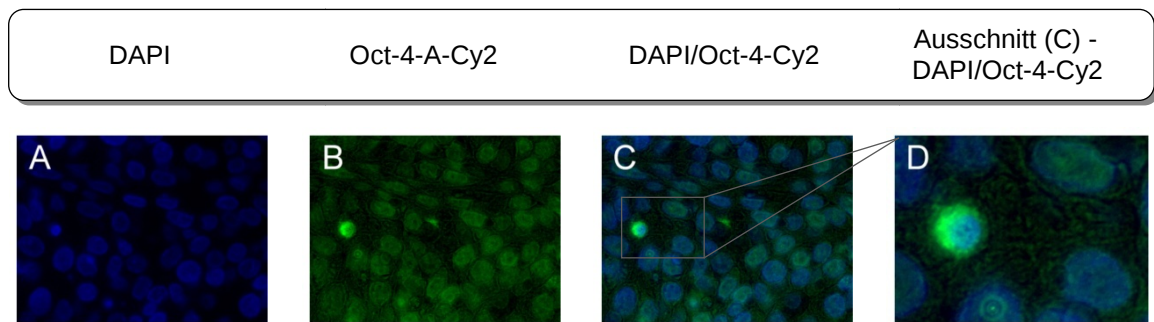


Abbildung 27: Immunhistologischer Nachweis von Oct-4 A am Beispiel des Tumors T601

Nach Schockfrierung des soliden Tumors in flüssigem Stickstoff wurde ein Gewebeschnitt erstellt und immunhistochemisch gefärbt. Verwendet wurde für die Färbung der Antikörper Anti-Human-Oct-4A (mouse) in Kombination mit dem Sekundärantikörper Anti-mouse-Cy2. Die Zellkernfärbung wurde mit DAPI und die Permeabilisierung mit Triton X-100 durchgeführt. Visualisiert sind viele mittels DAPI blau fluoreszierende Zellkerne (A), von denen ein Zellkern besonders stark das grün fluoreszierende Cy2 anreicht (B und C). Anhand dieser hell fluoreszierenden Zelle ist die nukleäre Lokalisation des Oct-4A-Antigens gut erkennbar (D).

Da auch in der Immunhistochemie ein Nachweis von Oct-4A in soliden Tumoren gelang (Abbildung 27), wurde zur Quantifizierung des Stammzellfaktors eine FACS-Analyse von insgesamt fünf Gewebeproben durchgeführt. Aufgrund der zuvor beschriebenen Problematik mit Nachweis von Oct-4B in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Kapitel 3.3.2, Seite 71) erfolgte eine Doppelfärbung mit dem allgemeinen Oct-4 Antikörper in Kombination mit dem Lineage-Antikörper-Mix (Anti-Human-CD3, -CD14, -CD16, -CD19, -CD20, -CD56).

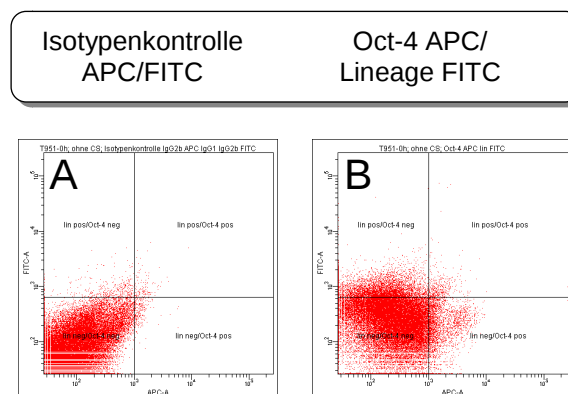


Abbildung 28: FACS-Analyse zur Identifizierung von Oct-4 am Beispiel des soliden HNSCC-Tumors T951

Das solide Tumorgewebe wurde zuerst manuell zerkleinert und anschließend enzymatisch mittels Dissektions- und Dispersionsmedium behandelt. Anschließend erfolgte eine Färbung der gewonnenen Einzelzellsuspension mit den Antikörpern Anti-Human Oct-4 (APC) sowie Anti-Human-CD3, -CD14, -CD16, -CD19, -CD20, -CD56 (FITC) im Lineage-Antikörper-Mix (lin) sowie die durchflusszytometrische Untersuchung. Ebenfalls wurde eine Permeabilisierung mit Saponin durchgeführt. Als Beispiel ist der Tumor 951 gewählt worden. Zu erkennen ist in Teilabbildung A die Isotypenkontrolle mit der 2 %-Grenze positiver Zellen im APC/FITC Dot Plot sowie in Teilabbildung B eine kleine Population im lin⁻/Oct-4⁺-Fenster des FITC/APC Dot Plots. Durch Setzen eines Gates konnte die Größe der Population bestimmt werden, welche in dieser Graphik einem prozentualen Anteil von 1,3 % entsprach. Wegen der geringen Populationsgröße sowie der eng benachbarten Lage zur lin⁻/Oct-4⁻-Hauptzellzahl war die lin⁻/Oct-4⁺-Subpopulation im Histogramm nicht erkennbar. Auf eine Darstellung wurde aus diesem Grunde verzichtet.

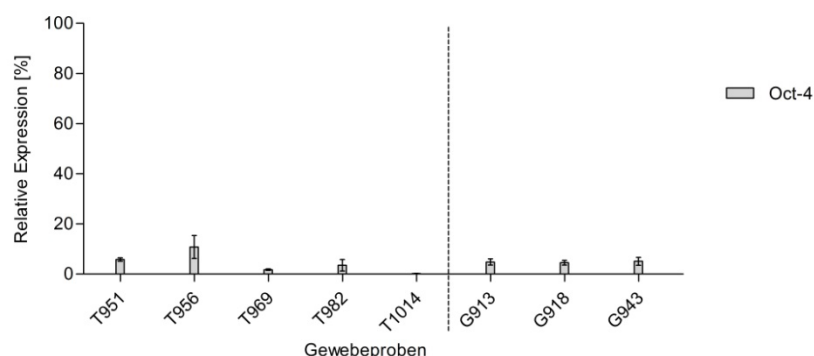


Abbildung 29: FACS-Analyse der Oct-4-Expression in HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe

Bezüglich der Methode siehe Text zu Abbildung 28 (Seite 77). Im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung ($n = 8 - 12$) ist die prozentuale Expression des Stammzellmarkers Oct-4 (Subpopulation $\text{lin}^-/\text{Oct-4}^+$) gezeigt. Zu erkennen ist ein heterogenes Expressionsprofil von Oct-4 in soliden Tumorzellen. Bei den Nasenmuschelgewebeprobe, welche erst nach 48-stündiger Kultivierung durchflusszytometrisch analysiert werden konnten, wurde eine eher gleichmäßige Oct-4-Expression nachgewiesen. Da von kultivierungsbedingten Zellveränderungen ausgegangen werden muss, sollte kein direkter Vergleich zwischen beiden Gewebearten vorgenommen werden, wie die eingefügte Trennlinie signalisiert.

Gewebe- probe	Marker	Werteanzahl (N)	Minimaler Wert [%]	Maximaler Wert [%]	Mittelwert [%]	Standard- abweichung
Tumor	Oct-4	5	0,2	10,8	4,4	4,1
Nasen- muschel	Oct-4	3	4,5	5,1	4,8	0,3

Tabelle 34: Expressionsprofil des potentiellen Tumorstammzellmarkers Oct-4 in HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe

Tabellarisch summiert dargestellt sind die prozentualen Expressionsergebnisse der FACS-Analyse von den fünf Tumor- und drei Nasenmuschelgewebeprobe. Zu erkennen ist bei den Tumorgewebeprobe ein heterogenes Expressionsprofil der $\text{lin}^-/\text{Oct-4}^+$ -Zellen. Auch in den drei Nasenmuschelgewebe konnte Oct-4, jedoch mit einem eher homogenen Expressionsmuster, nachgewiesen werden. Aufgrund unterschiedlicher Methodik sollte kein direkter Vergleich zwischen beiden Gewebearten gezogen werden (siehe auch Text zu Abbildung 24, Seite 72).

Wie in Abbildung 28 gezeigt, ist es in der FACS-Analyse gelungen eine $\text{Lineage}^-/\text{Oct-4}^+$ -Population ausfindig machen zu können und das Expressionsmuster anhand von fünf Gewebeprobe zu untersuchen. Die Expression von Oct-4 ist dabei einer deutlichen Variation zwischen den fünf Tumorprobe unterworfen mit einer Variationsbreite von 10,6 % und einem durchschnittlichen Expressionslevel von 4,4 %. Auch in gesundem Nasenmuschelgewebe konnte nach 48-stündiger Kultivierung der Nachweis einer $\text{Lineage}^-/\text{Oct-4}^+$ -Population erbracht werden, welche hingegen ein eher homogenes Expressionsprofil innerhalb der drei Gewebeprobe erkennen ließ.

3.3.2.4 Coexpression potentieller Tumorstammzellmarker mit Oct-4

Bei HNSCC-Zelllinien war es möglich, mittels einer FACS-Analyse eine Korrelation zwischen den zuvor erwähnten potentiellen Tumorstammzellmarkern und Oct-4 herzustellen. Diese statistisch signifikante ($p < 0,05$) positive Korrelation, welche auf eine Coexpression dieser Marker schlussfolgern ließ, konnte für die Marker CD44, CD59 sowie FZD7 mittels des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman errechnet und graphisch in einem Dot Plot einer Mehrfachfärbung bestätigt werden. Zu untersuchen galt es nun, ob sich diese positive Korrelation zwischen den drei Markern und Oct-4 anhand von soliden Tumorgewebeproben bestätigen lässt. Dafür wurde methodisch, wie in Kapitel 3.3.1.4 (Seite 67) beschrieben, vorgegangen und die dort aufgeführten Antikörper mit dem Lineage-Antikörper-Mix (Anti-Human-CD3, -CD14, -CD16, -CD19, -CD20, -CD56 (FITC) kombiniert. Ebenfalls wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet, wie nun folgend dargestellt.

Markerkombination	Werteanzahl	Spearman [r_s]	p-Wert
Oct-4/CD34	5	+0,5643	0,3500
Oct-4/CD44	5	+0,8000	0,1333
Oct-4/CD59	5	+0,9000	0,0833
Oct-4/CD117	5	+0,5774	0,3500
Oct-4/CD133	5	+0,5441	0,3500
Oct-4/FZD3	5	+0,5643	0,3500
Oct-4/FZD7	5	+0,8208	0,1333

Tabelle 35: Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman [r_s] von Oct-4 mit anderen potentiellen Tumorstammzellmarkern bei soliden Tumorgewebeproben

Als Grundlage der Berechnungen diente eine FACS-Analyse der potentiellen Tumorstammzellmarker CD34, CD44, CD59, CD117, CD133, FZD3 und FZD7 aller fünf untersuchten HNSCC-Tumorgewebeproben, jeweils als Doppelfärbung mit dem Lineage-Antikörper-Mix sowie als Dreierfachfärbung mit Oct-4. Durchgeführt wurde die Berechnung mit dem Softwareprogramm GraphPad Prism®. Zur allgemeinen Interpretation des Korrelationskoeffizienten siehe Text zu Tabelle 30 (Seite 68).

Anders als bei den permanenten HNSCC-Zelllinien konnte bei Tumorgewebeproben keine signifikante Korrelation zwischen einem potentiellen Tumorstammzellmarker und Oct-4 ermittelt werden. Die höchsten Korrelationswerte wurden für die Marker CD59 ($r_s = +0,9$), FZD7 ($r_s = +0,8208$) und CD44 ($r_s = +0,8$) errechnet, während für die Marker CD34, CD117, CD133 sowie FZD3 nur relativ geringe Korrelationswerte ($r_s < 0,6$) bestimmt wurden. Zusätzlich zu den errechneten Korrelationswerten sind in der FACS-Analyse Dot Plots von Mehrfachfärbungen erstellt worden, um diese Korrelationswerte auch graphisch darstellen zu können.

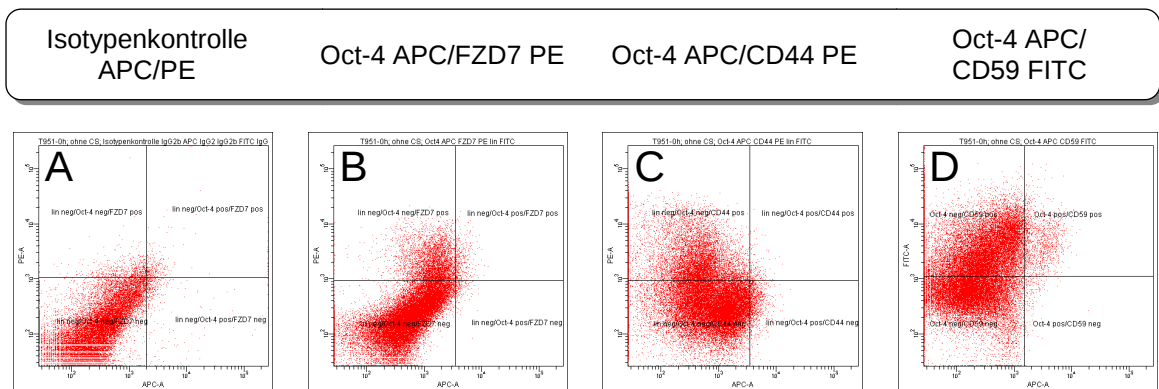


Abbildung 30: Doppelfärbung von Oct-4 mit FZD7, CD44 und CD59 in der FACS-Analyse am Beispiel des soliden HNSCC-Tumors T951

Angewendet wurde die zuvor beschriebene FACS-Methodik (siehe Text zu Abbildung 28, Seite 77) und eingesetzt die Antikörper Anti-Human CD34 (PE), Anti-Human CD44 (PE), Anti-Human CD59 (FITC), Anti-Human CD117 (PE), Anti-Human CD133 (APC), Anti-Human FZD3 (APC), Anti-Human FZD 7 (PE), Anti-Human Oct-4 (APC), Lineage-Antikörper-Mix (Anti-Human-CD3, -CD14, -CD16, -CD19, -CD20, -CD56 (FITC)) sowie bei der Isotypenkontrolle der Oct-4 (APC)/FZD7 (PE)-Doppelfärbung Anti-Human IgG2b (APC) und Anti-Human IgG2a (PE). Als Grundlage für die gezeigten Bilder (Teilabbildung A bis C) diente eine vorherige Selektion auf Lineage negative Zellen (Darstellungen nicht gezeigt). In Teilabbildung A ist die Isotypenkontrolle für die Doppelfärbung Oct-4 (APC)/FZD7 (PE) dargestellt und in Teilabbildung B die dazugehörige Messung mit Oct-4 und FZD7. Zu erkennen ist in Teilabbildung B eine kleine lin⁻/Oct-4⁻/FZD7⁺-Population, welche sich in der Berechnung der nicht signifikanten Korrelation niederschlägt. Auch anhand von Teilabbildung C, wo die meisten Zellen sich lin⁻/Oct-4⁻/CD44⁻ darstellen und nur ein geringer Teil der Zellen lin⁻/Oct-4⁻/CD44⁺ gemessen werden konnte (26,9 %), lässt den Grund für die nicht signifikante Berechnung graphisch erkennen. Wegen gleicher Fluorochrome konnte bei der Untersuchung auf den potentiellen Tumorstammzellmarker CD59 keine Kombination mit dem Lineage-Mix erfolgen. Es wurde aber zuvor im FSC/SSC-Dot Plot die Lineage positive Population lokalisiert, ausgewählt und in der eigentlichen Messung diese Population nicht mit berücksichtigt. In Teilabbildung D ist eine Doppelfärbung mit Oct-4 und CD59 dargestellt, wo neben einer großen Oct-4⁻/CD59⁺ und einer Oct-4⁻/CD59⁻-Population auch eine kleine Oct-4⁺/CD59⁺-Population zu erkennen ist.

Wie in Abbildung 30 gezeigt, konnten die zuvor mittels Rangkorrelationskoeffizientenbildung nach Spearman ermittelten statistischen Coexpressionsergebnisse ermittelt werden. Für keinen potentiellen Tumorstammzellmarker zeigte sich mittels Dot Plot-Darstellung eine nachweisbare signifikante Coexpression mit dem embryonalen Stammzellmarker Oct-4. In Bezug auf den Stammzellmarker FZD7 ist eine kleine lin⁻/Oct-4⁻/FZD7⁺-Population auffällig, die sich in vier der fünf untersuchten Tumorgewebeproben nachweisen ließ. In der FACS-Analyse konnte ein durchschnittliches Expressionslevel dieser lin⁻/Oct-4⁻/FZD7⁺-Zellen von 6,2 % mit einer Standardabweichung von 2,5 ermittelt werden. Eine weitere Zuordnung dieser Population anhand der vorliegenden Daten ist jedoch nicht möglich. Bei permanenten HNSCC-Zelllinien gelang es zudem immunhistochemisch eine Coexpression von Oct-4A mit dem embryonalen Stammzellmarker Nanog nachzuweisen. Die gleiche Vorgehensweise erfolgte ebenfalls an solidem Tumorgewebe, jedoch konnte kein positiver Nachweis erbracht werden, sodass eine Coexpression von Oct-4 und Nanog in HNSCC-Gewebeproben in dieser Arbeit nicht bestätigt werden kann. Aufgrund der Berechnungen und FACS-Analysen an Tumorgewebeproben kann hinsichtlich der Coexpression eines potentiellen Tumorstammzellmarkers (CD34, CD44, CD59, CD117, CD133, FZD3 und FZD7) mit Oct-4 zusammengefasst werden, dass sich für keinen der hier untersuchten Marker eine signifikante Coexpression bestätigen ließ.

3.3.2.5 Charakterisierung der Tumorgewebeproben

Um potentielle Tumorstammzellmarker *in vivo* zu untersuchen, wurden insgesamt zwölf Gewebeproben von Patienten mit histologisch gesichertem HNSCC im Rahmen von operativen Tumorresektionen entnommen und untersucht. Bei zehn der zwölf untersuchten Tumorsektionen handelte es sich um ein Primärkarzinom sowie in zwei Fällen um eine Rezidivkrankung. Die Rezidive entstanden in einem Fall nach vorheriger Tumorresektion mit adjuvanter Radiotherapie von 69,9 Gy (T601) und im anderen Fall nach alleiniger operativer Entfernung (T956).

Von der Lokalisation der entnommenen Tumorsektionen zeigte sich folgende Verteilung: Zungengrund (25 %), Oropharynx (25 %), Hypopharynx (16,6 %), Tonsillenbereich (8,3 %), Uvulabereich (8,3 %), Nasopharynx (8,3 %) und Larynx (8,3 %). In der Stichprobe gab es bezüglich der Geschlechtsverteilung eine männliche Dominanz ($m : w = 9 : 3$). Das Durchschnittsalter betrug 63 Jahre (SD: 10,6).

Bei den meisten Patienten (83,4 %) lag zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine fortgeschrittene Tumorerkrankung mit teilweise vorliegender Lymphknoten-Metastasierung vor (UICC III - IV) und nur bei zwei Patienten (16,6 %) konnte eine Zuordnung in die prognostisch günstigeren Tumorstadien (UICC I - II) erfolgen. In allen Fällen ließ sich histologisch ein Plattenepithelkarzinom nachweisen. Von der histologischen Differenzierung zeigte sich folgende Verteilung: G1 (8,3 %), G2 (50 %), G3 (41,7 %) und G4 (0 %). Vier der zwölf analysierten Tumore wurden vor der Tumorresektion einer vorangeführten Therapie unterzogen. Bei zwei dieser vier Tumore handelte es sich um Rezidive, deren Erstkarzinom in einem Fall lediglich operativ reseziert wurde. In dem anderen Fall schloss sich eine adjuvante Radiotherapie der operativen Maßnahme an. Außerdem waren zwei Gewebeproben von Patienten mit neoadjuvanten Therapieschemata, einerseits als alleinige Chemotherapie und andererseits als kombinierte Radiochemotherapie.

3.3.2.6 Einfluss von Differenzierungsgrad und Tumorstadium auf die Expression potentieller Tumorstammzellmarker

Um zu überprüfen, ob das Tumorstadium oder der Differenzierungsgrad des untersuchten Gewebes einen Einfluss auf das Expressionsmuster potentieller Tumorstammzellmarker besitzt, wurden die Daten der FACS-Analysen sowie des Proteome Profiler Array statistisch ausgewertet. Die mittels Durchflusszytometrie untersuchten fünf Tumorgewebeproben (T951, T956, T969, T982 sowie T1014) wurden auf insgesamt sieben potentielle Tumorstammzellmarker untersucht, wovon fünf der CD-Nomenklatur und zwei dem Wnt-Signalweg zugeordnet wurden. Ebenfalls erfolgte eine durchflusszytometrische Messung des embryonalen Stammzellmarkers Oct-4. Eine

statistische Berechnung konnte aufgrund von Einmalmessungen der CD-Marker jedoch nur bei den Wnt-Proteinen FZD3 und FZD7 sowie bei Oct-4 vorgenommen werden.

Histopathologisch wurden vier der fünf mittels Durchflusszytometrie untersuchten Gewebeproben dem Differenzierungsgrad 2 (G2) sowie eine Gewebeprobe dem Differenzierungsgrad 1 (G1) zugeordnet. Während bei den Wnt-Signalwegs-Proteinen FZD3 und FZD7 kein signifikanter Unterschied berechnet werden konnte (Mann-Whitney-Test; $p > 0,05$), zeigte sich hinsichtlich der Oct-4-Expression zwischen den G1- und den G2-Geweben ein hoch signifikanter Unterschied dahingehend, dass auf dem gut differenzierten Gewebe eine niedrigere Oct-4-Expression nachzuweisen war als auf dem mäßig differenzierten Gewebe (Mann-Whitney-Test; $p = 0,0003$). Ein Vergleich zwischen Tumorstadium und Stammzellmarkerexpression konnte nicht erfolgen, da es sich bei allen Tumorgewebeproben, die mittels FACS-Analyse untersucht wurden, klinisch um eine fortgeschrittene Tumorerkrankung mit nachweisbaren Lymphknoten-Metastasen (UICC III - IV) handelte. Auch der durchflusszytometrisch untersuchte Rezidivtumor (T956) wurde mit den anderen vier Geweben hinsichtlich der Stammzellmarkerexpression von FZD3, FZD7 und Oct-4 verglichen. Anders als bei den Erstkarzinomen konnte bei dem Tumorezidiv eine signifikant höhere Expression von FZD3, FZD7 und Oct-4 beobachtet werden (Mann-Whitney-Test; FZD3: $p = 0,004$, FZD7: $p = 0,045$, Oct-4: $p = 0,001$). Da jedoch eine sehr geringe Anzahl von Gewebeproben in diese Berechnung einging, ist die Aussagekraft dieses Testes als gering zu bewerten.

Von den sechs mittels Proteome Profiler Array untersuchten Geweben (T800, T898, T977, T1005, T1010 und T1012) gehörten histopathologisch zwei Gewebe dem Differenzierungsgrad 2 (G2) und vier Gewebe dem Differenzierungsgrad 3 (G3) an. Nach klinischem Tumorstadium eingeteilt stammten zwei Gewebeproben von Patienten mit dem prognostisch günstigeren UICC Stadium I - II sowie vier Proben von Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung (UICC III - VI). Ebenfalls sind zwei Patienten mit einer neoadjuvanten Chemotherapie behandelt worden. In dieser Gruppe lag keine Gewebeprobe eines Rezidivtumors vor. Hinsichtlich der Expression potentieller embryonaler Stammzellmarker konnte bei diesen sechs Gewebeproben kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-Test; $p > 0,05$), sowohl zwischen den beiden Differenzierungsgraden (G2/G3) als auch zwischen den beiden klinischen Tumorstadien (UICC I - II/UICC III - IV) und der vorausgegangenen Therapie gefunden werden.

3.4 Einfluss von Zytostatika auf die Expression potentieller Tumorstammzellmarker

Aufgrund der Annahme, dass Tumorstammzellen sich durch eine erhöhte Resistenz gegenüber zytotoxischen Einflüssen auszeichnen, hat das Verfahren der „Anreicherung“ („enrichment“) durch Chemo- oder Strahlentherapie in die Tumorstammzellforschung Einzug erhalten. Dabei werden Tumorzellen einer Chemo-/Radiatiotherapie unterzogen, um eine Selektion von resistenten Tumorstammzellen zu erzielen, welche im Anschluss genauer analysiert werden sollten. Um den Einfluss von Zytostatika auf die Expression potentieller Tumorstammzellmarker und damit der Anreicherung zu untersuchen, wurden sechs permanente HNSCC-Zelllinien (BHY, PCI-I, UT-SCC 60A/B und UT-SCC 12 A/B) einer in-vitro-Chemotherapie unterzogen. Die gleiche Vorgehensweise wurde ebenfalls bei soliden Tumorgewebeproben angewandt, jedoch war die Anzahl vitaler Zellen nach der in-vitro-Chemotherapie so gering, dass keine FACS-Analyse mehr möglich war. Ein Nachweis von potentiellen Tumorstammzellproteinen nach in-vitro-Chemotherapie gelang nur mittels Durchflusszytometrie, wohingegen sich beim *Human Pluripotent Stem Cell Array* (Proteom Profiler™ Array; R & D Systems) aus bisher unbekannten Gründen kein positives Ergebnis erzielen ließ. An dieser Stelle sei angemerkt, dass zum Zweck der Übersichtlichkeit nur die Ergebnisse der HNSCC-Zelllinie PCI-I beschrieben werden, jedoch ein ähnlicher Effekt bei den fünf anderen untersuchten Zelllinien (BHY, UT-SCC 12A/B, UT-SCC 60A/B) zu beobachten gewesen ist. Als Zytostatika wurden die bereits erwähnten Wirkstoffe 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel eingesetzt. Um das Wachstumsverhalten der eingesetzten Zelllinien unter der Chemotherapie zu untersuchen, war zuvor die Bestimmung von Zytotoxizitätsstufen erforderlich.

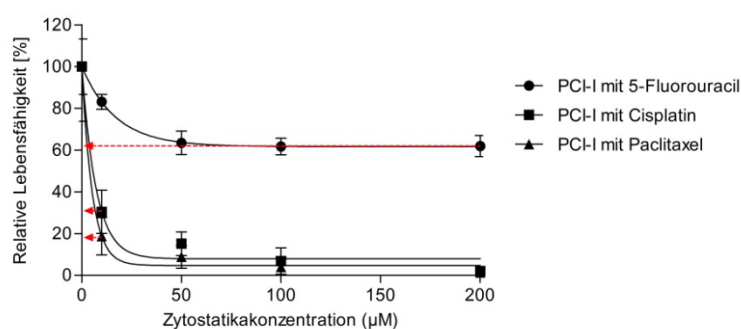


Abbildung 31: Konzentrations-Effekt-Kurven der HNSCC-Zelllinie PCI-I nach einer 48-stündigen in-vitro-Chemotherapie mit 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel

Methodisch wurde wie folgt vorgegangen: 5000 Zellen der Zelllinie PCI-I wurden in jede Kavität einer 96-Well-Platte gegeben und mit 10, 50, 100, 200 µM 5-Fluorouracil-, Cisplatin- sowie Paclitaxelbehandlung 48 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurde mittels eines MTT-Zytotoxizitäts-Assay der relative Anteil der vitalen Zellen ($MW \pm SD$; $n = 3 - 6$) bestimmt. Dargestellt sind dosisabhängige Konzentrations-Effekt-Kurven der HNSCC-Zelllinie PCI-I nach 5-Fluorouracil-, Cisplatin- sowie Paclitaxelbehandlung. Als Verlaufskurven wurde mit Hilfe des Softwareprogramms GraphPad Prism® aus den erhaltenen Messergebnissen eine Ein-Phasen exponentielle Funktion berechnet und im Diagramm eingefügt. Die Graphik wurde als Grundlage zur Bestimmung von drei unterschiedlichen Toxizitätsstufen genutzt: 200 µM 5-Fluorouracil, 10 µM Cisplatin und 10 µM Paclitaxel (rot gestrichelte Pfeile).

Zur Bestimmung des Zytotoxizitätseffekts wurde, wie in Abbildung 31 dargestellt, ein MTT-Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt, Konzentrations-Effekt-Kurven erstellt und die folgenden drei verschiedenen Zytotoxizitätsstufen unter Angabe der prozentualen Lebensfähigkeit gewählt: 200 μM 5-Fluorouracil (MW: 62,0 %; SD: 5,0), 10 μM Cisplatin (MW: 30,4 %; SD: 10,4) und 10 μM Paclitaxel (MW: 18,7 %; SD: 8,9).

Methodisch wurde, wie in Kapitel 3.3.1.4 (ab Seite 67) aufgeführt, vorgegangen. Auch fanden die dort aufgelisteten Antikörper in dieser Versuchsdurchführung Verwendung. Nun folgend sind die Ergebnisse des Anreicherungsverfahrens mit Zunahme des Expressionslevels von Oct-4 (Abbildung 32 und 33) sowie von Oct-4 und FZD7 (Tabelle 36) dargestellt.

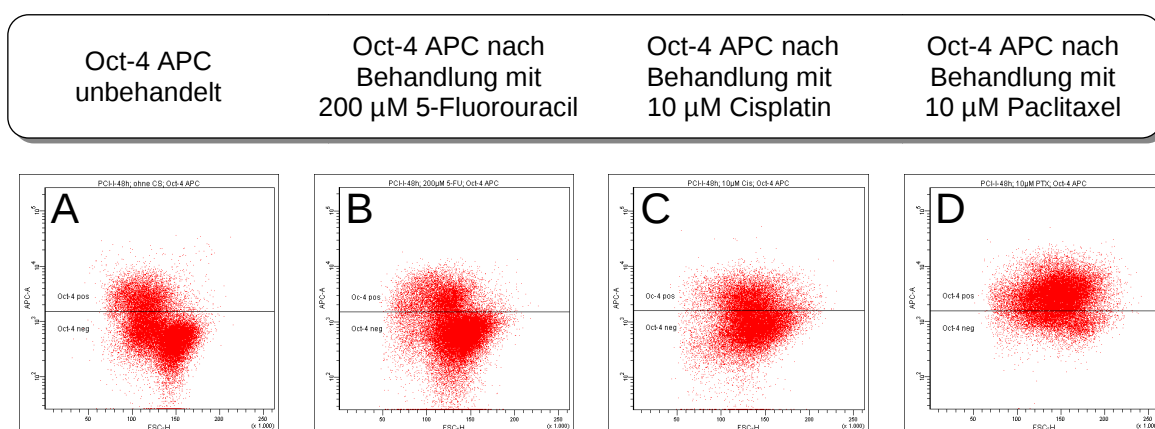


Abbildung 32: FACS-Analyse von Oct-4 vor sowie nach in-vitro-Chemotherapie mit 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel am Beispiel der HNSCC-Zelllinie PCI-I

Die Zelllinie PCI-I wurden entweder mit DMEM (Teilabbildung A), 200 μM 5-Fluorouracil (Teilabbildung B), 10 μM Cisplatin (Teilabbildung C) oder 10 μM Paclitaxel (Teilabbildung D) 48 Stunden inkubiert, die adhären Zellen mit Trypsin gelöst und mit dem Antikörper Anti-Human Oct-4 (APC) gefärbt. Als Isotypenkontrolle wurde der Antikörper Anti-Human IgG2b (APC) verwendet und die Ziel-Zellzahl auf 1 Million gesetzt. Mittels der Isotypenkontrolle wurde die Positiv/Negativ-Grenze bei 2 % positiver Zellen eingestellt (Dot Plot nicht gezeigt) und mittels Gates die Population über dieser Grenze bestimmt. Zur genaueren Quantifizierung wurde die Zellzahl in mehreren Versuchsdurchgängen ($n = 6 - 11$) gemessen und graphisch als Balkendiagramm (Abbildung 33) sowie tabellarisch (Tabelle 36, Seite 85) dargestellt.

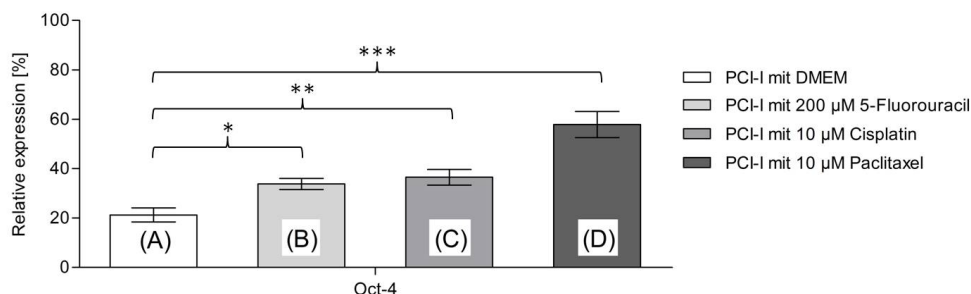


Abbildung 33: Prozentuale Oct-4-Expressionprofile vor sowie nach in-vitro-Chemotherapie mit 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel am Beispiel der HNSCC-Zelllinie PCI-I

Dargestellt ist die prozentuale Expression des Stammzellmarkers Oct-4 der HNSCC-Zelllinie PCI-I nach 48-stündiger Inkubation mit DMEM (A), 200 μM 5-Fluorouracil (B), 10 μM Cisplatin (C) sowie 10 μM Paclitaxel (D). Erkennbar in dieser Graphik ist die prozentuale Zunahme von Oct-4 positiven Zellen. Alle drei Zunahmen des Oct-4-Expressionslevels waren statistisch signifikant: *: $p = 0,0057$; **: $p = 0,0044$; ***: $p = 0,0011$.

		Werte- anzahl (N)	Mittelwert [%]	Standard- abweichung	Vergleich mit DMEM p-Wert
Oct-4	DMEM	11	21,24	9,32	
	5-FU	6	33,82	5,50	0,0057
	CIS	8	36,50	8,97	0,0044
	PTX	6	57,85	13,00	0,0011
FZD7	DMEM	6	21,33	7,68	
	5-FU	4	27,50	7,33	0,3429
	CIS	4	33,15	7,32	0,1143
	PTX	4	47,35	5,51	0,0286
Oct-4/ FZD7	DMEM	6	19,45	3,29	
	5-FU	4	21,20	1,04	0,8839
	CIS	4	28,50	6,93	0,0284
	PTX	4	40,05	1,01	0,0284

Tabelle 36: Veränderungen des Expressionsprofils der Stammzellmarker Oct-4 und FZD7 unter in-vitro-Chemotherapie am Beispiel der Zelllinie PCI-I

Als Grundlage der Berechnungen diente eine FACS-Analyse der potentiellen Tumorstammzellmarker FZD7 und Oct-4 der HNSCC-Zelllinie PCI-I nach 48-stündiger Inkubation mit DMEM, 200 μ M 5-Fluorouracil (5-FU), 10 μ M Cisplatin (CIS) sowie 10 μ M Paclitaxel (PTX). Zur Berechnung der Signifikanz ist das Softwareprogramm GraphPad Prism® verwendet worden (Mann-Whitney-Test). Statistisch signifikante Werte ($p < 0,05$) sind durch eine fett-gedruckte Schriftart hervorgehoben. Aufgrund der in Kapitel 3.3.1.4 (ab Seite 67) bestätigten Coexpression der Marker Oct-4 und FZD7 in HNSCC-Zelllinien ist an dieser Stelle auch die prozentuale Zunahme von Oct-4⁺/FZD7⁺-Zellen gezeigt. Zu erkennen ist, dass unter 10 μ M Paclitaxel sowohl die Oct-4- als auch die FZD7-Zunahme signifikant war, ebenso wie die Zunahme Oct-4⁺/FZD7⁺-Zellen. Unter 10 μ M Cisplatin war nur eine signifikante Zunahme der Oct-4⁺- und Oct-4⁺/FZD7⁺-Population nachzuweisen, während 200 μ M 5-Fluorouracil lediglich zu einem signifikanten Anstieg von Oct-4⁺-Zellen führte.

Sowohl vor als auch nach der durchgeführten in-vitro-Chemotherapie konnten alle untersuchten potentiellen Tumorstammzellmarker, inklusive CD34, CD44, CD59, CD117, CD133, FZD3, FZD7 und Oct-4, nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde mittels Annexin/PI-Färbung die Vitalität der gemessenen Populationen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Für die Marker CD34, CD44, CD59, CD117, CD133 und FZD3 konnte keine signifikante Veränderung des Expressionsmusters durch die Zytostatikabehandlung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei Oct-4 und FZD7 hingegen gelang es, eine signifikante prozentuale Zunahme zu zeigen, wie am Beispiel von Oct-4 in Abbildung 32 und 33 sowie zusammenfassend in Tabelle 36 hervorgehoben ist.

Die Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse in Tabelle 36 lässt bei der Zelllinie PCI-I eine statistisch signifikante Expressionszunahme ($p < 0,05$) von Oct-4 bei allen drei eingesetzten Zytostatika erkennen. Ebenfalls war eine prozentuale Zunahme von FZD7⁺-Zellen beobachtbar, allerdings war diese nur unter der Paclitaxelbehandlung statistisch signifikant. Weiterhin konnte, nach der FACS-analytisch nachgewiesenen Coexpression von Oct-4 und FZD7, eine signifikante Expressionszunahme für Oct-4⁺/FZD7⁺-Zellen unter Cisplatin- sowie Paclitaxelbehandlung nachgewiesen werden, wobei auch eine nicht-signifikante Zunahme unter 5-Fluorouraciltherapie zu beobachten gewesen ist.

4 Diskussion

4.1 Einfluss von Zytostatika auf das Wachstumsverhalten von HNSCC-Zelllinien

Zur Bestimmung des Wachstumsverhalten von permanenten HNSCC-Zelllinien unter dem Einfluss einer in-vitro-Chemotherapie sind im Rahmen dieser Arbeit die IC_{50} - und IC_{90} -Werte der drei Zytostatika 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel ermittelt worden. Als Inkubationszeiträume wurden 48, 96 und 144 Stunden gewählt und Verwendung fanden die HNSCC-Zelllinien BHY, PCI-I, UT-SCC 12A/B, UT-SCC 60A/B sowie UT-SCC 74A/B. Die Zellzahl wurde mit Hilfe des MTT-Zytotoxizitäts-Assays quantifiziert. Bei der Nachweismethode sowie der Verwendung von IC-Werten handelt es sich um etablierte und vielfach angewandte Verfahren zur Bestimmung und Vergleichbarkeit der Zytotoxizität von Stoffen [284, 291]. Die Auswahl der Zytostatika erfolgte nach klinischer Relevanz: für alle drei verwendeten Zytostatika liegen randomisierte, kontrollierte klinische Studien zur Wirksamkeit bei fortgeschrittenen HNSCC-Erkrankungen vor [22, 24, 29]. Die eingesetzten Zytostatika-Konzentrationen von Cisplatin und Paclitaxel (1, 10, 20 und 50 μM) sind im Rahmen von in-vitro-Chemotherapien bei HNSCC-Zelllinien hinreichend untersucht, während die Konzentration von 5-Fluorouracil (10, 50, 100, 200 μM) grenzwertig niedrig dosiert wurde [287]. Daher wären, gerade im Hinblick auf die nicht erreichten IC_{90} -Werte in Tabelle 21 (Seite 48), Konzentrationen von bis zu 500 μM erforderlich gewesen.

Durch die große Anzahl von permanenten HNSCC-Zelllinien in Kombination mit unterschiedlichen Inkubationszeiträumen von zytostatischen Wirkstoffen, welche in der experimentellen Forschung zum Einsatz kommen, gestaltet sich ein direkter Vergleich von IC-Werten identischer Zelllinien schwierig. Zusammenfassend kann jedoch festgestellt werden, dass die errechneten und in Tabelle 21, 22 und 23 (Seite 48ff) angegebenen IC-Werte in der Größenordnung liegen, welche in der Literatur für HNSCC-Zelllinien beschrieben sind [292-294].

4.2 Einfluss von Zytostatika auf die Zytokinsekretion von HNSCC-Zelllinien

HNSCC-Zellen sezernieren eine Reihe von Zytokinen, welche entscheidenden Einfluss auf das Tumormikromilieu nehmen [69]. Eine Bedeutung bei HNSCC wird den Zytokinen IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, VEGF, PGE₂ und bFGF zugeschrieben [41, 59]. Verschiedenste modulierende Einflüsse dieser Zytokine, sowohl auf das Mikromilieu als auch auf den Tumor selbst, sind bekannt und zusammenfassend in Tabelle 3 (Seite 8) dargestellt.

Zytokine können funktionell nach ihrer vorwiegenden Immunantwort, zellulär oder humoral, in T-Helfer (TH) 1 bzw. TH₂ eingeteilt werden. Bei Patienten mit HNSCC-Tumoren ist eine partielle Verschiebung des TH₁/TH₂-Gleichgewichtes zugunsten der TH₂-Zytokine nachgewiesen, insbesondere bei fortgeschrittenen Tumorstadien.

Der TH₂-Phänotyp ist gekennzeichnet durch ein erhöhtes Level der TH₂-Zytokine, wie IL-4, IL-6 und IL-8, sowie eine erniedrigte Expression der TH₁-Zytokine, wie IFN- γ . Da auch TH₁-Zytokine, wie IL-2 und GM-CSF, bei HNSCC-Patienten verstärkt nachweisbar sind, handelt es sich jedoch nur um eine unvollständige TH₁/TH₂-Verschiebung [71]. Wie neuere Studien zeigen konnten, führt eine kombinierte Radiochemotherapie zu weiteren Zytokinveränderungen im Serum von HNSCC-Patienten: Silver et al. konnten vier Wochen nach einer Radiochemotherapie mit Paclitaxel und Carboplatin eine erhöhte Expression von IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 nachweisen, während Meirovitz et al. zwei Wochen nach einer Radiochemotherapie mit Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil und Docetaxel nur erhöhte Zytokinlevel von IL-6 und IL-8 sowie einen Konzentrationsabfall von TNF- α beobachtet haben. Zytokinveränderungen von IL-1 und IL-10 konnten Meirovitz et al. unter der von ihnen gewählten Therapie nicht feststellen [81, 82]. Individuelle Zytokinlevel von HNSCC-Patienten, spezifische Halbwertszeiten, Stoffwechselbedingungen sowie Zytokin-bindende Proteine werden dabei als wichtige Einflussfaktoren auf die Expressionsraten angesehen [69, 295]. Über lokale Auswirkungen einer Radiochemotherapie sind in der Literatur keine Studien zu finden, lediglich Poth et al. beschrieben eine verstärkte IL-6 Expression von HNSCC-Zellen unter Cisplatinbehandlung [84].

Eine Zielsetzung dieser Arbeit war es somit, das Expressionsprofil von 14 TH₁- und TH₂-Zytokinen unter einer in-vitro-Chemotherapie sowie Auswirkungen auf die TH₁/TH₂-Verschiebung anhand von acht permanenten HNSCC-Zelllinien zu untersuchen.

Folgende Zytokine konnten im Rahmen dieser Arbeit in den Überständen von HNSCC-Zelllinien gemessen werden: G-CSF, GM-CSF, IL1- β , IL-6, IL-8 sowie TNF- α . Im Vergleich zu vielen anderen Studien gelang kein Nachweis der Zytokine IL-4 und IL-10. Eine Erklärung hierfür liefert die Nachweisgrenze, welche messtechnisch bei 5 pg/ml/10⁶-Zellen gesetzt wurde. Die in der Literatur publizierten Konzentrationen von IL-4 und IL-10 bei permanenten HNSCC-Zelllinien lagen unterhalb der Nachweisgrenze von 5 pg/ml [59].

Die Zytokinsekretionsveränderungen der acht HNSCC-Zelllinien zeigten unter einer Chemotherapie mit 5-Fluorouracil und Cisplatin starke Ähnlichkeiten: beide Zytostatika führten bei allen untersuchten Zelllinien zu gleichartigen Veränderungen der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und G-CSF.

In Bezug auf die Sekretion von IL-1 β war ein Konzentrationsabfall dieses Zytokins gemessen worden. Eine Konzentrationszunahme von IL-1 β , wie von Silver et al. im Serum von HNSCC unter Radiochemotherapie beschrieben [82], kann anhand der vorliegenden Daten nicht bestätigt werden. Durch eine Sekretionsverminderung unter in-vitro-Chemotherapie ist von einer Inhibierung von IL-1 β -vermittelten Funktionen, wie Tumorprogression, Resistenz gegenüber NK-Zellen, Metastasierung sowie Regulation des Transkriptionsfaktors Snail [41], auszugehen. Wie Battle et al. und Takkunen et al. zeigen konnten, ist Snail wiederum zur Suppression von E-Cadherin und zur Initiierung einer kompletten epithelialen-mesenchymalen Transition fähig [207, 221]. Aufgrund der Konzentrationsabnahme von IL-1 β unter 5-Fluorouracil- und Cisplatinbehandlung sind ferner eine Hemmung der epithelialen-mesenchymalen Transition sowie eine verstärkte Expression von E-Cadherin mit konsekutiver Inhibition der Metastasierung anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse zu mutmaßen.

Weiterhin ließ sich im Rahmen dieser Dissertationsarbeit eine Sekretionszunahme von IL-6 unter subletalen Dosierungen von 5-Fluorouracil und Cisplatin nachweisen, vergleichbar mit den Ergebnissen von Silver et al. sowie Meirovitz et al. unter kombinierter Radiochemotherapie [81, 82]. IL-6 gilt als multifunktionaler Regulator der Immunantwort [58]. Eine vermehrte Expression von IL-6 hat somit fördernde Auswirkungen auf dessen Funktionen bei HNSCC, einschließlich Zellproliferation, Kanzerogenese, Hemmung der Apoptose und Tumordinvasion [60, 61]. Des Weiteren spiegelt die Konzentrationszunahme von IL-6 als TH₂-Zytokin unter Zytostatikatherapie eine weitere Verschiebung des TH₁/TH₂-Gleichgewichtes wider.

Ein weiteres wichtiges Zytokin, welches von HNSCC sezerniert und im Rahmen dieser Arbeit gemessen werden konnte, ist IL-8. IL-8 zeigte unter den eingesetzten Konzentrationen von 5-Fluorouracil und Cisplatin keine Expressionsveränderungen. Da bei den vorliegenden Untersuchungen die Konzentrationswerte aufgrund einer nicht ausreichenden Standardkurve Software-gestützt ermittelt wurden, sind erneute Messungen mit einer weniger verdünnten Standardkonzentration von IL-8 zur Messung der wahren Zytokinkonzentrationen ratsam. Zur funktionellen Bedeutung von IL-8 ist bekannt, dass es die Angiogenese sowie die Proliferation von HNSCC fördert und im Serum von HNSCC-Patienten unter einer kombinierten Radiochemotherapie verstärkt nachweisbar war [47, 81, 82].

Ebenfalls reagierten alle Zelllinien mit einem Konzentrationsanstieg von G-CSF auf subletale Konzentrationen von 5-FU und Cisplatin. Eine erhöhte Konzentration von G-CSF hat einen fördernden Einfluss auf dessen Funktionen bei HNSCC, inklusive Proliferation, Migration, Angiogenese und Rekrutierung von Entzündungszellen [46]. Aktuelle Untersuchungen an anderen Tumorentitäten konnten für G-CSF eine Beschleunigung des Zellzyklus von ruhenden

hämatopoetischen Stammzellen sowie Tumorstammzellen zeigen. G-CSF wird somit als Therapeutikum diskutiert, um Tumorstammzellen im Ruhezustand (*dormancy*) wieder für Mitosetoxine, wozu die Strahlentherapie und die meisten Chemotherapeutika gehören, zu sensibilisieren [296, 297].

Bei dem G-CSF verwandten Wachstumsfaktor GM-CSF konnte bei den Versuchen zu dieser Arbeit eine interessante Beobachtung gemacht werden: diejenigen Primärtumor-Zelllinien, welche dieses Zytokin sezernierten, reagierten auf niedrige Konzentrationen von 5-Fluorouracil und Cisplatin mit einer vermehrten Sekretion von GM-CSF, während bei den Metastasen-Zelllinien ein konzentrationsabhängiger Abfall zu beobachten war. Die Primärtumore sind somit in der Lage durch die erhöhte GM-CSF-Konzentration Funktionen, wie Immunsuppression, Proliferation, Migration und Angiogenese, verstärkt auszuüben, wohingegen die GM-CSF-vermittelten Funktionen bei Metastasen durch eine subletale Chemotherapie eingeschränkt werden. Des Weiteren wird durch tumorgebildetes GM-CSF die Mobilisation von CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark in die periphere Blutbahn gefördert [49, 122]. Beim Mammakarzinom konnte beobachtet werden, dass unter neoadjuvanter systemischer Chemotherapie der Anteil von CD34⁺-Zellen im peripheren Blut zunimmt [298]. Da der Großteil an Probanden (70,1 %) in dieser Studie ein lokal begrenztes Tumorstadium aufwies, wäre eine vermehrte GM-CSF-Sekretion, wie in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt, für die CD34⁺-Zunahme denkbar. Eine direkte Untersuchung zwischen verstärktem, tumorgebildeten GM-CSF unter Chemotherapie und einer Zunahme der CD34⁺-Mobilisation aus dem Knochenmark ist nicht bekannt. Die CD34⁺-Progenitorzelle kann durch Differenzierung in eine Endothelzelle die Angiogenese fördern oder als dendritische Zelle Einfluss auf die Immunmodulation nehmen [77-79]. Eine Differenzierung dieser tumorinfiltrierenden Knochenmarks-Stammzelle in eine Tumorstammzelle wird ebenfalls diskutiert [80].

Unter der Paclitaxelbehandlung war bei allen HNSCC-Zelllinien, sowohl bei Primärtumor- als auch Metastasen-Zelllinien, ein starker und konzentrationsabhängiger Abfall aller Zytokine zu beobachten. Ergänzend ist festzustellen, dass Paclitaxel, im direkten Vergleich mit den anderen beiden untersuchten Chemotherapeutika, in den meisten Fällen die geringsten IC₅₀- und IC₉₀-Werte und damit die höchste konzentrationsabhängige Zytotoxizität aufwies. Da alle Zytokinkonzentrationswerte auf eine Zellzahl von 10⁶ berechnet wurden, kann das Ausmaß der Zytotoxizität nicht als alleinige Erklärungsgrundlage der unterschiedlichen Sekretionsprofile herangezogen werden. Weitere molekulare Untersuchungen müssen folgen, um die unterschiedlichen Beobachtungen in diesem Versuchsaufbau vollständig begründen zu können. Zudem wären größere Spannweiten sowie eine höhere Anzahl eingesetzter Zytostatikakonzentrationen erforderlich gewesen, um Unterschiede zwischen den einzelnen Chemotherapeutika genauer beschreiben zu können.

4.3 Potentielle Tumorstammzellmarker in HNSCC sowie der Einfluss von Zytostatika auf die Expression potentieller Tumorstammzellmarker von HNSCC-Zelllinien

Die Tumorstammzellhypothese besagt, dass das Wachstum von Tumoren aufrecht erhalten wird durch eine Subpopulation von selbsterneuernden Tumorstammzellen, vergleichbar mit dem Wachstum normaler proliferativer Gewebe. Der Großteil der Tumorzellen besteht hingegen aus schnell proliferierenden, postmitotischen sowie entdifferenzierten Zellen [103]. Drei Hauptcharakteristika werden zur Definition einer Tumorstammzelle herangezogen: Differenzierungsfähigkeit, Selbsterneuerung und homöostatische Kontrolle [299]. Weitere typische Eigenschaften von Tumorstammzellen sind die Immortalität, die Lage in einer sogenannten Tumorstammzellnische, eine unterschiedlich ausgeprägte Teilungsrates, die Resistenz gegenüber zytotoxischen Einflüssen sowie ein Kontrollverlust der Proliferation [103-105]. Anhand dieser aufgeführten Charakteristika wird deutlich, dass eine Identifikation dieser malignen und Tumor-aufrechterhaltenden Stammzellen zum Verständnis der Tumorbilogie notwendig ist. Erst nach Identifikation von spezifischen Markern dieser Stammzellen wird eine gezielte Entwicklung von therapeutischen Strategien jenseits traditioneller antiproliferativer Wirkstoffe für möglich gehalten [103, 299].

Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, sowohl permanente HNSCC-Zelllinien als auch solide HNSCC-Tumorgewebeproben auf unterschiedliche potentielle Tumorstammzellmarker zu untersuchen. Als Nachweismethode wurde für die Marker der CD-Nomenklatur, des Wnt-Signalweges und von Oct-4 die Durchflusszytometrie sowie als Screening-Methode zur Detektion potentieller Tumorstammzellmarker embryonalen Ursprungs der Proteome Profiler™ Array angewandt. Da sowohl durchflusszytometrisch als auch mit Hilfe des *Human Pluripotent Stem Cell Arrays* der Nachweis des embryonalen Stammzellmarkers Oct-4 gelang, ist mittels Rangkorrelationskoeffizientenbildung nach erfolgter FACS-Analyse eine Coexpression von Oct-4 mit CD34, CD44, CD59, CD117, CD133, FZD3 und FZD7 untersucht worden. Weiterhin wurde mit Hilfe des Verfahrens der *Anreicherung* versucht, die stammzellspezifische Eigenschaft der *erhöhten Resistenz* in Verbindung mit einem der potentiellen Tumorstammzellmarker zu bringen.

Aus der Gruppe der CD-Nomenklatur sind die fünf potentiellen Tumorstammzellmarker CD34, CD44, CD59, CD117 sowie CD133 ausgewählt worden, da jeder dieser Marker bei verschiedenen Tumorentitäten in Zusammenhang mit stammzellspezifischen Eigenschaften, wie Selbsterneuerung, Pluripotenz oder erhöhter Resistenz gegenüber zytotoxischen Einflüssen, gebracht werden konnte.

Von dem Glykoprotein CD34, welches als Stammzellmarker bei der akuten myeloischen Leukämie bestätigt wurde, ist bekannt, dass es auch zu einem geringen Prozentsatz auf HNSCC-Zellen exprimiert wird [91, 300]. Korrespondierend hierzu gelang im Rahmen dieser Arbeit der

Nachweis von CD34⁺-Zellen bei einer Subpopulation von unter 5,0 % der gesamten Tumorzellen, sowohl bei HNSCC-Zelllinien als auch bei soliden Tumoren. In weiteren Untersuchungen konnte bei HNSCC-Zelllinien und Primärtumoren jedoch keine signifikante Korrelation mit dem pluripotenten Stammzellfaktor Oct-4 bestätigt werden. Ebenso konnte durch Anreicherungsversuche mittels in-vitro-Chemotherapie keine Veränderung der Expression von CD34 beobachtet werden. Von CD34⁺-Progenitorzellen ist bekannt, dass sie von HNSCC-gebildetem GM-CSF chemotaktisch angelockt werden, durch Differenzierung in dendritische Zellen immunmodulierenden Einfluss nehmen und durch Differenzierung in Endothelzellen die Angiogenese beeinflussen können [79, 122, 123]. Weiterhin wird eine Differenzierung dieser CD34⁺-Progenitorzellen in Tumorstammzellen diskutiert [80]. Die vorliegenden Untersuchungen dieser Arbeit konnten keine neuen Erkenntnisse in Bezug auf die Bedeutung von CD34 als potentiellen Tumorstammzellmarker aufzeigen. Bis auf die Beobachtung, dass CD34 in stammzelltypischer Subpopulationsgröße in HNSCC vorgefunden wurde, liegen bisher keine bestätigenden Untersuchungen über tumorstammzellspezifische Eigenschaften von CD34⁺-Zellen in HNSCC vor. Weitere Untersuchungen müssen sich anschließen, um die Bedeutung von CD34 als potentiellen Tumorstammzellmarker exakter definieren zu können und weitere Differenzierungsvorgänge der CD34⁺-Progenitorzellen zu offenbaren.

Als weiterer potentieller Tumorstammzellmarker bei HNSCC wurde in den letzten Jahren zunehmend CD44 (CD44s) diskutiert, da unter anderem Prince et al. der Nachweis von stammzellspezifischen Eigenschaften, wie Selbsterneuerung und Pluripotenz, bei CD44⁺-Zellen gelang [100]. Außerdem konnten nicht nur verschiedene immunologische Ausweichstrategien CD44⁺-Zellen zugeschrieben werden, sondern auch ein erhöhtes Resistenzverhalten gegenüber Zytostatika [139, 301]. In Bezug auf die Expression des potentiellen Tumorstammzellmarkers CD44 (CD44s) existieren in der Literatur divergierende Angaben bei Primärtumoren und permanenten Zelllinien, unabhängig vom Malignitätsgrad und Tumorstadium: auf der einen Seite liegen Berichte über CD44-Subpopulationen mit Expressionsraten von unter 10 % vor, auf der anderen Seite sind Daten mit einem Expressionsniveau von >75 % publiziert worden [100, 135, 139]. Pries et al. beschrieben eine heterogene Expression von CD44 bei soliden Tumoren sowie eine konstitutive Expression bei HNSCC-Zelllinien [132]. Diese Beobachtung, d. h. ein sehr hohes Expressionsprofil bei HNSCC-Zelllinien (MW: 90,1 %, SD: 5,0) sowie eine stark heterogene Expression bei soliden Gewebeproben (MW: 51,0 %, SD: 24,3), kann durch die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Das hohe Expressionsprofil von CD44⁺-Zellen unbehandelter HNSCC-Zelllinien hatte auch eine signifikante Coexpression mit Oct-4 mittels Rangkorrelationskoeffizienten zur Folge, wobei die Aussagefähigkeit bei einer durchschnittlichen Expression von ca. 90 % bei HNSCC-Zelllinien als gering einzustufen ist. Die Beobachtung von Su et al., dass CD44⁺-Zellen im direkten Vergleich mit CD44⁻-Zellen eine höhere Oct-4-Expression aufweisen, konnte aufgrund der oben geschilderten Problematik im Rahmen dieser Dissertationsarbeit nicht bestätigt werden [141]. Des Weiteren konnte aufgrund

der hohen Expression keine signifikante Veränderung des potentiellen Tumorstammzellmarkers unter in-vitro-Chemotherapie beobachtet werden. Obwohl sich in der Literatur diejenigen Daten mehren, die CD44⁺-Zellen tumorstammzellspezifische Eigenschaften zuweisen, kann diese Beobachtung anhand der gewonnenen Untersuchungsergebnisse im Rahmen dieser Dissertationsarbeit nicht bestätigt werden. Das hohe Expressionsprofil sowohl bei Zelllinien als auch bei soliden Tumoren spricht hingegen sogar gegen eine Typisierung als potentieller Stammzellmarker. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse decken sich damit mit den aktuellen Beschreibungen von Oh et al. aus dem Jahr 2013, welche durch Nachweis von Chemo-resistenz und Selbsterneuerung in CD44s⁺-Zellen die Zuordnung dieses Oberflächenproteins als potentiellen Tumorstammzellmarker anzweifeln [143]. Da sich die meisten Untersuchungen auf das allgemeine Oberflächenprotein CD44s beziehen, scheinen umfangreichere Untersuchungen der Isoformen des CD44-Membran-Rezeptorkomplexes vielversprechend zu sein.

Als dritter potentieller Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur wurde im Rahmen dieser Arbeit CD59 an HNSCC-Zellen untersucht. Eine Überexpression sowie ein sehr hohes Expressionslevel dieses Komplementrestriktionsfaktors ist in HNSCC beschrieben, vergleichbar mit den Untersuchungen in dieser Arbeit von durchschnittlich 96,2 % CD59⁺-Zellen in HNSCC-Zelllinien und 52,6 % in Primärtumoren [147]. Dieses hohe Expressionsniveau bei HNSCC-Zelllinien begründet weiterhin die signifikante Coexpression mit Oct-4, jedoch mit niedriger Aussagefähigkeit, sowie nicht nachweisbarer Expressionsveränderung unter in-vitro-Chemotherapie, in Analogie zu CD44. Trotz des bestätigten erhöhten immunologischen Resistenzverhaltens von CD59⁺-Zellen lassen die vorliegenden Untersuchungsergebnisse keine stammzelltypischen Charakteristika erkennen. Weiterhin spricht das zuvor angesprochene hohe Expressionslevel vom Prinzip her gegen eine Charakterisierung dieses Oberflächenproteins als Tumorstammzellmarker.

Der vierte potentielle Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur, welcher im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Durchflusszytometrie an HNSCC analysiert wurde, ist CD117, auch als c-Kit bekannt. Bezogen auf die Expressionsrate dieses Tyrosinkinase-Rezeptors variiert die in der Literatur angegebene Anzahl von CD117⁺-Zellen in soliden HNSCC-Gewebeproben in Abhängigkeit von der Lokalisation des Malignoms, dem EBV-Status, dem Tumorstadium und dem Alter bei Erstdiagnose zwischen fehlender und konstanter Expression [154]. Bei permanenten HNSCC-Zelllinien sind Expressionsraten des Markers CD117 zwischen 3 und 5 % beschrieben [163]. Die Ergebnisse des Expressionsprofils von CD117 in dieser Arbeit sind mit durchschnittlich 2,3 % bei Zelllinien und 1,9 % bei Primärtumoren im unteren Bereich einzuordnen und lassen keine der zuvor erwähnten Abhängigkeiten erkennen, soweit überhaupt aufgrund der niedrigen Gesamtprobenanzahl eine Aussage diesbezüglich getroffen werden kann. Obwohl das Expressionsniveau von CD117 auf tumorstammzellcharakteristischer Subpopulationsgröße liegt, konnte in weiteren Versuchen weder eine signifikante Coexpression mit Oct-4 ermittelt noch eine Zunahme mit Hilfe der in-vitro-Chemotherapie als

Anreicherungsverfahren von CD117⁺-Zellen nachgewiesen werden. Die vorliegenden Untersuchungen können somit keine weitere tumorstammzellspezifische Eigenschaft dieses Tyrosinkinase-Rezeptors erkennen lassen.

Eine ähnliche Konstellation, wie bei CD117, ist bei dem fünften potentiellen Tumorstammzellmarker, CD133, zu beobachten. Dieses Glykoprotein, welches in Studien mit einem Expressionslevel von 3,15 % ($\pm$ 0,83) auf HNSCC-Zelllinien und < 6 % auf soliden HNSCC nachweisbar war [163, 164], konnte auch in den vorliegenden Untersuchungen in stammzelltypischer Subpopulationsgröße gemessen werden (1,1 % bei HNSCC-Zelllinien und 1,1 % bei Primärtumoren). Entgegen aktuellen Publikationen konnte jedoch keine signifikante Coexpression mit dem embryonalen Stammzellmarker Oct-4 gezeigt werden [163]. Eine Expressionsveränderung nach Anreicherung mittels in-vitro-Chemotherapie konnte ebenfalls nicht bestätigt werden, wie aktuell von Yang et al. beschrieben [165]. Eine Herstellung von immunhistologischen Doppelfärbungen mit dem Oct-4A- und CD133-Antikörper sowie eine Sortierung von CD133⁺- und CD133⁻-Zellen mit anschließender Resistenztestung mittels in-vitro-Chemotherapie sind an dieser Stelle als notwendig einzustufen, um explizite Aussagen über die Relevanz von CD133 als Tumorstammzellmarker treffen zu können. Zusammenfassend ist festzustellen, dass, entgegen vielen aktuellen Studien, CD133⁺-Zellen anhand der erbrachten Ergebnisse keine stammzellspezifischen Eigenschaften zugeschrieben werden können.

Neben den klassischen Tumorstammzellmarkern der CD-Nomenklatur ist die Expression von zwei Glykoprotein-Rezeptoren des Wnt-Signalwegs bei HNSCC-Zelllinien und soliden HNSCC-Gewebeproben untersucht worden. Die Gene des Wnt-Signalweges inklusive der dazugehörigen Frizzled-Rezeptoren spielen eine Rolle in der Zell-Morphogenese sowie Differenzierung. Sie sind fähig, mittels der Regulation sowohl onkogener Schlüsselgene als auch embryonaler Transkriptionsfaktoren Einfluss auf stammzellspezifische Eigenschaften, wie der Pluripotenz, Selbsterneuerung sowie Differenzierung, zu nehmen [175-178]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine aberrante Aktivierung des Wnt-Signalweges maligne Progression fördert und an der Entwicklung von verschiedenen humanen Tumorentitäten beteiligt ist [180, 181].

Als erster transmembranärer Rezeptor des Wnt-Signalweges ist das Rezeptorprotein Frizzled-3 (FZD3) ausgewählt worden, da es nicht nur bei der neuronalen Differenzierung eine entscheidende Rolle spielt, sondern sich auch eine Überexpression dieses Wnt-Proteins in vielen Tumorentitäten gezeigt hat [187, 189, 190]. Bei HNSCC-Zelllinien und bei soliden HNSCC-Tumoren konnte eine heterogene Expression des potentiellen Tumorstammzellmarkers FZD3 im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Mit durchschnittlich 1,2 % FZD3⁺-Zellen bei Zelllinien und 8,1 % bei Primärtumoren ist bei diesem Glykoprotein-Rezeptor eine deutlich höhere Expression bei dem heterogenen Primärgewebe auffällig. Da FZD3 auf vielen unterschiedlichen physiologischen Gewebearten nachgewiesen werden konnte, ist eine Tumordinfiltration von FZD3⁺-Zellen ebenso wie eine Down-Regulation dieses Rezeptors unter

Kulturbedingungen als Ursache für diese Beobachtung zu diskutieren [188]. Eine Coexpression mit Oct-4 konnte in dieser Arbeit ebenso wenig gezeigt werden, wie eine Zunahme FZD3⁺-Zellen in den durchgeführten Anreicherungsversuchen mittels in-vitro-Chemotherapie, welche zur Selektion resistenter Zellen dienten. Da aktuell in der Literatur keine Beschreibung von FZD3 bei HNSCC vorliegt, ist der Stellenwert dieses Wnt-Rezeptors insgesamt als weitgehend unklar einzustufen.

Besser untersucht und mit einer Überexpression bei HNSCC beschrieben ist der zweite untersuchte potentielle Tumorstammzellmarker des Wnt-Signalweges, Frizzled-7 (FZD7) [202]. Beim Kolonkarzinom konnte eine Assoziation zwischen der Expression des Glykoproteins FZD7 und einigen stammzellspezifischen Eigenschaften, inklusive Tumorinitiierung, Invasion, Progression und Motilität, nachgewiesen werden [200]. Weiterhin ist bekannt, dass mittels pharmakologischer Inhibition die Progression von Tumoren effektiv gehemmt werden kann [196]. In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine Expressionsrate von 26,7 % auf permanenten HNSCC-Zelllinien und 8,1 % auf HNSCC-Gewebeproben gemessen werden. Damit liegt das Expressionsprofil des potentiellen Tumorstammzellmarkers in dieser Arbeit deutlich unter der vorbeschriebenen Expressionsrate von 45,5 % auf soliden Tumoren [202]. Ein Grund für die niedrigere Expressionsrate liegt einerseits in der Vorselektion, welche mittels des Lineage-Antikörper-Mix (Anti-Human-CD3, -CD14, -CD16, -CD19, -CD20, -CD56) getroffen wurde, um tumorinfiltrierende PBMCs auszuschließen. Andererseits muss die dreistündliche enzymatische Inkubation zur Herstellung einer Einzelzellsuspension sowie das unterschiedliche Nachweisverfahren als Grund für das unterschiedliche Expressionsprofil herangezogen werden. In den nachfolgenden Untersuchungen gelang bei HNSCC-Zelllinien der Nachweis einer positiven und signifikanten Korrelation von FZD7 mit dem embryonalen Stammzellfaktor Oct-4 ($r_s = +0,9762$, $p = 0,0004$). Diese Beobachtung gelang jedoch ausschließlich bei HNSCC-Zelllinien. Bei soliden Tumoren war zwar ein positiver Zusammenhang zwischen diesen beiden Markern erkennbar, die Korrelation hingegen statistisch nicht signifikant ($r_s = +0,8208$, $p = 0,1333$). Eine Ursache dieser Beobachtung ist in der Heterogenität des Primärgewebes zu suchen. Ergänzend dazu konnte in der Dot Plot-Darstellung der durchflusszytometrischen Mehrfachfärbungen von Oct-4 und FZD7 eine lin⁻/Oct-4⁻/FZD7⁺-Population ausgemacht werden (Abbildung 30, Teilabbildung B, Seite 80), welche sich in der Berechnung der nicht signifikanten Korrelation niederschlägt. Eine Zuordnung dieser Population ist anhand der vorliegenden Daten nicht möglich. Erwähnenswert ist jedoch, dass diese lin⁻/Oct-4⁻/FZD7⁺-Population sich in vier der fünf untersuchten Geweben nachweisen ließ (MW: 6,2 %, SD: 2,5). In Bezug auf den Nachweis der sehr signifikanten Korrelation zwischen Oct-4 und FZD7 bei HNSCC-Zelllinien ist weiter auszuführen, dass in der Literatur ein funktioneller Zusammenhang zwischen FZD7 und Oct-4 bei embryonalen Stammzellen beschrieben ist [195]. Eine Coexpression dieser beiden Marker bei Tumorzelllinien, wie anhand von permanenten HNSCC-Zelllinien in dieser Arbeit gezeigt, ist bisher nicht publiziert.

In Analogie zu den zuvor dargestellten potentiellen Tumorstammzellmarkern ist auch das Expressionsverhalten von FZD7 nach dem Selektionsverfahren der Anreicherung bei HNSCC-Zelllinien untersucht worden. Bei allen untersuchten Zelllinien konnte nach 48-stündiger chemotherapeutischer Behandlung eine prozentuale Zunahme von FZD7⁺-Zellen beobachtet werden. Diese Veränderung des Expressionsprofils war, wie am Beispiel der Zelllinie PCI-I dargestellt (Tabelle 36, Seite 85), jedoch nur teilweise statistisch signifikant. Nur eine Behandlung mit 10 µM Paclitaxel und einer Letalität von > 80 % führte in den Untersuchungen zu einem statistisch signifikanten Anstieg der FZD7⁺-Zellen. Die eingesetzten Konzentrationen von 5-Fluorouracil und Cisplatin hingegen, welche eine geringere Zytotoxizität gegenüber den HNSCC-Zelllinien zeigten (< 70 %), ließen keine statistisch signifikante Veränderung des Expressionsprofils von FZD7 erkennen. Die Durchführung einer linearen Regressionsanalyse ($r^2 = 0,6142$; $p = < 0,0001$) lässt ferner ersichtlich werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der prozentualen FZD7-Expression und der relativen Lebensfähigkeit besteht. Dieses lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei FZD7⁺-Zellen um Tumorzellen mit erhöhter Resistenz gegenüber einer in-vitro-Chemotherapie handelt.

Zusammenfassend ist anhand der vorliegenden Ergebnisse festzustellen, dass der potentielle Tumorstammzellmarker FZD7 bei HNSCC-Zelllinien mit einer signifikanten Coexpression mit Oct-4 sowie einer erhöhten Resistenz gegenüber Zytostatika mehrere stammzellspezifische Charakteristika erfüllt. Die Übertragbarkeit auf heterogene Gewebeproben von HNSCC ist, wie zuvor aufgeführt, jedoch nur bedingt gegeben. Weitere Untersuchungen, wie zum Beispiel eine durchflusszytometrische Sortierung FZD7⁺- und FZD7⁻-Zellen mit anschließendem Einsatz in einem immundefizienten Mausmodell zur Untersuchung des kanzerogenen Potentials sowie ein direkter Vergleich der sortierten Zellen durch Einsatz im MTT-Zytotoxizitäts-Assay im Rahmen einer weiteren in-vitro-Chemotherapie sind notwendig, um den Stellenwert des potentiellen Tumorstammzellmarkers FZD7 exakter bestimmen zu können. Des Weiteren ist eine Differenzierung und Typisierung der FZD7⁺-Zellen in soliden HNSCC-Geweben zwingend erforderlich.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sind mittels des *Human Pluripotent Stem Cell Array* (Proteom Profiler™ Array) insgesamt 15 embryonale Stammzellproteine anhand von HNSCC-Zelllinien und soliden HNSCC-Tumoren untersucht worden. Diese Screening-Methode gilt als schnelle und sensitive Möglichkeit zum gleichzeitigen Nachweis eines relativen Expressionslevels von folgenden 15 Stammzellmarkern: AFP, E-Cadherin, GATA-4, Goosecoid, HCG, HNF3-β/FoxA2, Nanog, Oct-4, Otx2, PDX-1/IPF1, Snail, Sox2, Sox17, TP63/TP73L und VEGF.

Ein positiver Nachweis aller genannten Stammzellproteine konnte sowohl in Tumorzelllinien als auch in soliden Gewebeproben von HNSCC erbracht werden. Die Expression der Stammzellproteine zeigte eine relativ homogene Verteilung in einem Bereich zwischen 15,1 % und 38,5 % bzw. zwischen 6,6 % und 19,3 %. Eine Ausnahme dieser homogenen Expression war

nur bei dem transmembranären Glykoprotein E-Cadherin zu beobachten, welches mit einem durchschnittlichen Expressionslevel von 72,2 % bei Zelllinien und 56,0 % bei den Primärgeweben deutlich erhöht nachweisbar war. Diese Beobachtung spiegelt sich in der aktuellen Literatur wider, wobei sogar Expressionsprofile für E-Cadherin von bis zu 85 % beschrieben werden [135]. Bezogen auf das Expressionslevel in HNSCC liegen aktuell keine größeren Studien über andere embryonale Stammzellmarker zum Vergleich vor.

Ebenfalls im *Human Pluripotent Stem Cell Array* enthalten war der Transkriptionsfaktor Oct-4, für den ein aktueller Bericht über die Generierung pluripotenter Stammzellen aus adulten Zellen mittels Ein-Faktor-Induktion vorliegt [237]. Diese und weitere Untersuchungen haben dazu geführt, dass Oct-4 nicht nur eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung von stammzellspezifischen Eigenschaften, wie Pluripotenz und Selbsterneuerung, sondern auch eine wichtige Rolle in der Karzinogenese zugesprochen wird [238, 239]. In der Tumorforschung kommt dem Stammzellmarker Oct-4 somit eine besonders hohe Wertigkeit zu, wobei nur die Oct-4A-Isoform für die stammzellspezifischen Eigenschaften, wie Pluripotenz und Selbsterneuerung, verantwortlich gemacht wird und auch nur diese Isoform im Nukleolus lokalisiert ist. Bei der Oct-4B-Isoform handelt es sich hingegen um ein zytoplasmatisches Protein mit allgemeinen zellprotektiven Funktionen [241, 244]. Im *Human Pluripotent Stem Cell Array* war ein unselektiver Oct-4-Antikörper enthalten, welcher den Nachweis einer relativ homogenen Expressionsverteilung mit einem durchschnittlichen Niveau von 17,3 % bzw. 9,1 % in HNSCC-Zelllinien und soliden HNSCC-Gewebeproben erbracht hatte. Hierbei ist zu erwähnen, dass aufgrund des unselektiven Antikörpers im *Stem Cell Array* keine Zuordnung zu einer Oct-4-Isoform möglich ist. Zur Differenzierung zwischen der Oct-4A- und der Oct-4B-Isoform sowie genaueren Quantifizierung erfolgten weiterführende Analysen mittels Durchflusszytometrie und Immunhistologie. Immunhistologisch wurde bei den HNSCC-Zelllinien ein allgemeiner und unselektiver Oct-4- neben einem selektiven Oct-4A-Antikörper verwendet. Wie in Abbildung 19 (Seite 65) dargestellt, konnte bei Färbungen mit dem unselektiven Oct-4-Antikörper lediglich eine Oct-4A-typische nukleäre Färbung hergestellt werden. Zytoplasmatische Oct-4-Proteine, welche typisch für die Oct-4B-Isoform sind, konnten in permanenten Zelllinien nicht detektiert werden. Des Weiteren bestätigte der selektive Oct-4A-Antikörper, mit dem der direkte Nachweis von nukleären Oct-4A-Proteinen möglich war, die Anwesenheit von Oct-4A in HNSCC-Zelllinien (Abbildung 23, Seite 70). Aufgrund der nukleären Lokalisation von Oct-4 wurde geschlussfolgert, dass lediglich die Oct-4A-Isoform in permanenten HNSCC-Zelllinien präsent ist.

Auch in soliden HNSCC-Gewebeproben wurden immunhistologische Färbungen mit dem selektiven Oct-4A-Antikörper durchgeführt und der Nachweis von Oct-4A erbracht (Abbildung 27, Seite 77). Eine sichere zelluläre Lokalisation mittels des unselektiven Oct-4-Antikörpers war in den immunhistologischen Färbungen von Tumorgewebeproben nicht möglich (Daten nicht gezeigt). In der FACS-Analyse fand ein unselektiver Oct-4-Antikörper Verwendung, da ein selektiver sowie direkt gelabelter Oct-4A-Antikörper für die Durchflusszytometrie nicht

vertrieben wurde und Färbungen mit Sekundärantikörpern eine hohe Rate von unspezifischen Bindungen zeigten. Zum Ausschluss von mononukleären Zellen des peripheren Blutes, welche neben Oct-4B ebenfalls das CD3-Rezeptorprotein exprimieren, wird eine kombinierte Färbung mit dem Lineage-Antikörper-Mix (Anti-Human-CD3, -CD14, -CD16, -CD19, -CD20, -CD56) als allgemein notwendig eingestuft und ist deshalb in weiterführenden Analysen erfolgt [80, 289, 290]. Das Expressionsprofil von Oct-4 bei HNSCC-Zelllinien variierte in der FACS-Analyse deutlich zwischen 3,6 und 86,6 % mit einer durchschnittlichen Expressionsrate von 22,9 %. Während das durchschnittliche Expressionslevel der FACS-Analyse damit geringfügig höher ausfiel als im *Stem Cell Array*, war die in der Durchflusszytometrie beobachtbare Heterogenität in den Expressionsergebnissen des *Stem Cell Arrays* nicht vorzufinden. Aufgrund der häufigen Versuchsdurchführung (n = 6 - 11) sowie der etablierten Methodik sind die Expressionslevel der durchflusszytometrischen Untersuchung als die wahren Werte anzunehmen. Ursächlich für die anders ausfallenden Ergebnisse des *Stem Cell Arrays* müssen sowohl methodische Fehler als auch eine Ungenauigkeit der Nachweismethode in Betracht gezogen werden. Dieses hat unter anderem zur Einstufung der neuen Methode als *Screening*-Verfahren in dieser Arbeit geführt. Auch in den HNSCC-Primärtumoren konnte mittels des *Stem Cell Arrays* ein homogenes Oct-4-Expressionslevel von 9,1 % nachgewiesen werden. In der FACS-Analyse zeigte sich, in Analogie zu den HNSCC-Zelllinien, ein geringeres sowie heterogeneres Expressionsmuster von $\text{lin}^-/\text{Oct-4}^+$ -Zellen mit durchschnittlich 4,4 %. Als $\text{lin}^+/\text{Oct-4}^+$ konnten nur sehr wenige Zellen (< 0,1 %) in den fünf untersuchten Tumorproben identifiziert werden, welche somit nicht als ursächlich für das höhere Expressionsniveau der *Stem Cell Array*-Methode angenommen werden können. Obwohl im Gegensatz zu den zuvor diskutierten Zelllinien verschiedenartige Tumorgewebeproben im *Stem Cell Array* und in der Durchflusszytometrie eingesetzt wurden, muss ein ähnlicher Effekt, nämlich eine Ungenauigkeit oder ein methodischer Fehler des *Stem Cell Array*-Verfahrens, angenommen werden. Bezogen auf die prozentualen Expressionsprofile von HNSCC-Zelllinien muss kritisch diskutiert werden, dass teilweise Expressionsraten von bis zu durchschnittlich 56,4 % (UT-SCC 60A, Abbildung 21, Seite 66) nicht einer kleinen Subpopulationsgröße entsprechen, wie nach der Tumorstammzelltheorie gefordert. Expressionsraten von bis zu durchschnittlich 10,8 % (T956, Abbildung 29, Seite 78), wie bei soliden Tumoren gezeigt, werden hingegen schon eher dem Charakteristikum einer tumorstammzelltypischen Subpopulationsgröße gerecht. Ergänzend ist zu erwähnen, dass in der Literatur prozentuale Oct-4-Expressionsraten bei Tumorzelllinien anderer Tumorentitäten (MCF7 beim Mammakarzinom) von über 80 % beschrieben sind [302], wobei auch diesbezüglich gegensätzliche Aussagen vorzufinden sind [303].

In den weiteren immunhistologischen Färbungen mit dem selektiven Oct-4A-Antikörper bei HNSCC-Zelllinien konnte neben einer nukleären Lokalisation des Proteins der Nachweis einer Coexpression mit dem Stammzellprotein Nanog erbracht werden (Abbildung 23, Seite 70). Diese Coexpression konnte jedoch nur bei permanenten HNSCC-Zelllinien und nicht bei soliden

Tumoren im Rahmen der Dissertationsarbeit gezeigt werden. Während sowohl eine Oct-4-Expression als auch eine Oct-4/Nanog-Coexpression bei HNSCC-Zelllinien und soliden Tumorproben in der Literatur beschrieben sind [141, 163], konnte anhand der vorliegenden Untersuchungen erstmals der Nachweis der Oct-4A-Isoform bei Zelllinien und Primärtumoren sowie eine Coexpression dieser Isoform mit dem Transkriptionsfaktor Nanog bei HNSCC-Zelllinien erbracht werden. Wie schon bei den anderen potentiellen Tumorstammzellmarkern der CD-Nomenklatur sowie des Wnt-Signalweges, sind auch Expressionsveränderungen von Oct-4 durch Anreicherungsversuche mit verschiedenen Zytostatika untersucht worden. Hierbei zeigten sich unter 5-Fluorouracil-, Cisplatin- sowie Paclitaxelbehandlung statistisch signifikante Zunahmen des Expressionsniveaus von Oct-4 bei der HNSCC-Zelllinie PCI-I (Abbildung 32, Abbildung 33, Seite 84; Tabelle 36, Seite 85). Dass ein linearer Zusammenhang zwischen der prozentualen Oct-4-Expression und der relativen Lebensfähigkeit besteht, lässt sich nach Durchführung einer linearen Regressionsanalyse erkennen ($r^2 = 0,5256$; $p = < 0,0001$). In Bezug auf die zuvor erwähnte signifikante Coexpression der beiden Stammzellmarker Oct-4 und FZD7 bei HNSCC-Zelllinien ist weiter auszuführen, dass auch die Oct-4⁺/FZD7⁺-Population im Rahmen einer in-vitro-Chemotherapie analysiert worden ist. Hierbei zeigte sich nach Behandlung mit 200 μ M 5-Fluorouracil mit einer Letalität von ca. 38 % bei PCI-I-Zellen keine signifikante Zunahme der doppelt-positiven Population. Bei einer 69,6 %igen sowie 81,3 %igen Letalität unter 10 μ M Cisplatin- bzw. 10 μ M Paclitaxeltherapie war hingegen eine signifikante Expressionszunahme von Oct-4⁺/FZD7⁺-Zellen zu verzeichnen (Tabelle 36, Seite 85). Auch hier ließ die lineare Regressionsanalyse ($r^2 = 0,6081$; $p = < 0,0001$) eine deutliche Abhängigkeit zwischen der relativen Lebensfähigkeit und dem Expressionslevel erkennen. Diese Expressionszunahme der Oct-4⁺-, FZD7⁺- und Oct-4⁺/FZD7⁺-Population unter in-vitro-Chemotherapie lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich hierbei um mutmaßliche Tumorstammzellen mit erhöhter Resistenz gegenüber Zytostatika handelte. Tatsächlich konnte vielfach gezeigt werden, dass potentielle Tumorstammzellen mit erhöhter Expression von embryonalen Stammzellproteinen, wie Oct-4, eine erhöhte Chemoresistenz aufweisen [304]. Hu et al. wiesen nach, dass Oct-4 das Überleben von Tumorstammzellen teilweise durch den Oct-4/Tcl1/Akt1-Pathway mit Inhibierung der Apoptose aufrechterhält [302]. Darüber hinaus beschrieben Wang et al. einen Einfluss des Oct-4/Tcl1/Akt1-Pathway auf das Überleben von Tumorzellen sowie eine Empfindlichkeit gegenüber Zytostatika durch Regulierung verschiedener Multi Drug Resistance Gene (MDR) [305]. Auch in permanenten HNSCC-Zelllinien gelangen Yanamoto et al. der Nachweis einer tumorstammzellähnlichen Population (Hoechst 33342), welche neben einem erhöhten Expressionslevel von Oct-4 eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil zeigten [279]. Ferner beschrieben Tsai et al. in Cisplatin-angereicherten Zellen eine erhöhte Expression der Stammzellmarker Nanog, Oct-4, Bmi1, CD117, CD133 und ABCG2 sowie eine erhöhte Fähigkeit zur Migration, Invasion und Klonogenität [262].

Die durchgeführten Anreicherungsversuche mittels in-vitro-Chemotherapie bei soliden Tumorgewebeproben endeten stets frustan, da selbst unter geringen Zytostatikakonzentrationen die Anzahl vitaler Zellen für eine FACS-Analyse zu gering ausfiel. Bei erneuten Versuchen wären größere Tumormengen notwendig. Alternativ wäre als Nachweisverfahren die RT-PCR zu diskutieren, da bei dieser Methode kleinere Zellzahlen mit geringeren Proteinmengen ausreichend gewesen wären. Ebenfalls könnten und sollten mittels RT-PCR die zuvor gewonnen Ergebnisse der Anreicherungsversuche bestätigt werden. Notwendig wäre die RT-PCR auch zum Ausschluss von Oct-4 Pseudogenen, welche ein Problem der Tumorstammzellforschung darstellen und sowohl in Zelllinien als auch neoplastischen Geweben nachgewiesen werden konnten. Denn trotz des positiven Nachweises von Oct-4 mit Hilfe verschiedener Nachweisverfahren und unterschiedlichen Antikörpern kann eine Beteiligung von Oct-4 Pseudogenen, wie beispielsweise Oct-4pg5 und Oct-4pg1, welche in verschiedenen Tumorzelllinien und soliden Tumoren bestätigt werden konnten [306], anhand der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden.

Die Tumorstammzelltheorie beinhaltet die Hypothese, dass unter einer Chemotherapie der Großteil der Tumormassen abstirbt, jedoch wenige maligne Stammzellen in situ verbleiben und für die Entstehung eines Tumorrezidivs verantwortlich sind [80]. Anhand der vorliegenden Daten soll diese Hypothese erweitert werden, wie in Abbildung 34 gezeigt.

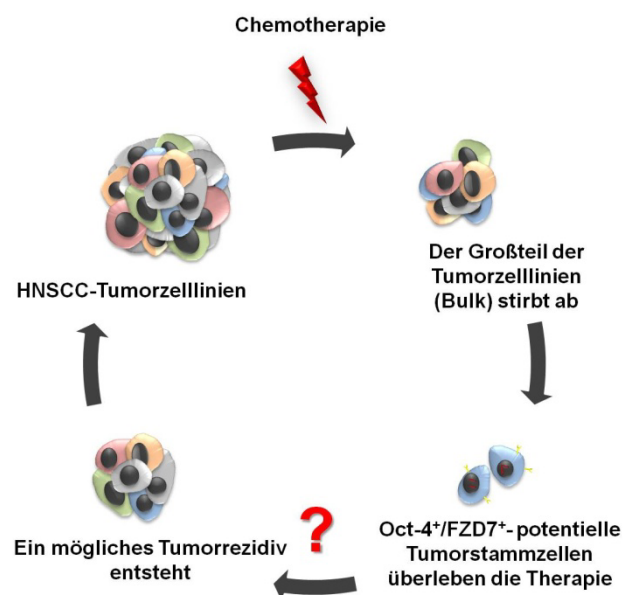


Abbildung 34: Kreislauf der Entstehung von Tumorrezidiven nach der Tumorstammzelltheorie bei HNSCC-Zelllinien anhand Oct-4⁺/FZD7⁺- potentieller Tumorstammzellen

Die Tumorstammzelltheorie besagt, dass nach der Chemotherapie eines heterogenen Tumors die entdifferenzierten Tumorzellen absterben, die resistenten Tumorstammzellen trotz der Behandlung vital bleiben und für ein Tumorrezidiv verantwortlich sind. Da anhand von HNSCC-Zelllinien, wie am Beispiel von PCI-I in Kapitel 3.4 (Seite 83ff) gezeigt, mittels eines Anreicherungsversuches resistente Oct-4⁺/FZD7⁺-Zellen identifiziert werden konnten, ist der Kreislauf der Tumorrezidivbildung nach der Tumorstammzelltheorie ergänzt worden. Unklar ist jedoch, ob die gemessenen und vitalen Oct-4⁺/FZD7⁺-Zellen zur erneuten Proliferation fähig sind.

Anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, dass in einem Tumor mit heterogenem Zellbild durch eine Chemotherapie die entdifferenzierten Tumorzellen absterben und nur resistente Tumorstammzellen, in diesem Fall die Oct-4⁺/FZD7⁺-Zellen, überleben. Diese Hypothese kann jedoch auf Grundlage der Daten dieser Dissertationsarbeit nur auf permanente HNSCC-Zelllinien bezogen werden. Des Weiteren ist im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht worden und damit als unklar einzustufen, ob die resistenten Oct-4⁺/FZD7⁺-Zellen nach erfolgter in-vitro-Chemotherapie eine erneute Proliferationsfähigkeit besitzen. Hierzu sind weitere Untersuchungen mittels durchflusszytometrischer Sortierung der Oct-4⁺/FZD7⁺-Zellen und anschließendem Vergleich mit Oct-4⁻/FZD7⁻-Zellen als notwendig einzustufen. In den weiteren Analysen sind besonders die stammzellspezifischen Eigenschaften, einschließlich der Invasion, Migration, Proliferation, Tumorentstehung (z. B. in einem immundefizienten-Mausmodell) sowie weitere Resistenz- und Proteinanalysen von Bedeutung, um die vielleicht einzigartige Biologie dieser malignen Zellen zu verstehen und neue therapeutische Ansätze offerieren zu können.

4.4 Ausblick

Verlässliche Tumorstammzellmarker sind in der Stammzellforschung deshalb von elementarer Bedeutung, da erst sie die Identifizierung von Stammzellen möglich machen. Der Nachweis spezifischer Tumorstammzellmarker eröffnet die Möglichkeit zur Entwicklung von gezielten Therapieverfahren, beispielsweise Antikörper zur selektiven Zellelimination, um Heilungschancen langfristig zu verbessern. Problematisch gestaltet sich jedoch die fehlende Tumorselektivität jener Tumorstammzellmarker, welche sich ebenfalls auf physiologischen Gewebearten, wie zum Beispiel im Rahmen dieser Arbeit an gesunder Nasenschleimhaut gezeigt, nachweisen ließen. Diese fehlende Tumorselektivität kann schwerwiegende Folgen haben, wie an dem folgenden Beispiel gezeigt werden soll: Anfang des einundzwanzigsten Jahrhunderts entwickelte die Firma Boehringer Ingelheim (Biberach, Deutschland) den humanisierten monoklonalen Antikörper Bivatuzumab, welcher mit dem zytotoxischen Wirkstoff Mertansine konjugiert wurde. Bivatuzumab bindet selektiv das Oberflächenmolekül CD44v6, welches auf über 95 % der HNSCC-Tumore, jedoch auch auf normalen Plattenepithelzellen, inklusive den Keratinozyten der Haut, exprimiert wird [307]. In Phase 1 Studien wurde dieses Medikament bei Patienten mit fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches eingesetzt. Aufgrund des starken dermalen zytotoxischen Effektes von Bivatuzumab Mertansine mit Todesfällen nach Entstehung eines Lyell-Syndroms (auch Toxische epidermale Nekrolyse = TEN) mussten die Studien vorzeitig beendet werden [308, 309].

Notwendig ist daher die Erforschung eines Tumorstammzellproteins, welches fast ausschließlich von Tumorzellen exprimiert wird. Erst danach könnten Therapeutika mit akzeptablem Nebenwirkungsprofil entwickelt werden, um die Heilungschancen dieser Tumorerkrankung zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Mit ca. 900.000 diagnostizierten Neuerkrankungen pro Jahr stehen Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; HNSCC) an sechster Stelle der am häufigsten auftretenden Neoplasien weltweit. Besonders in fortgeschrittenen Tumorstadien (UICC III und IV), welche einen prozentualen Anteil von über 50 % bei Diagnosestellung ausmachen, stellt die systemische Chemotherapie, meist im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzeptes, eine Behandlungsoption dar. Über die biologischen Auswirkungen einer systemischen Chemotherapie sowohl auf das Mikromilieu als auch auf den Tumor selbst ist bisher wenig bekannt. Daher sind im ersten Teil dieser Arbeit Zytokinveränderungen unter in vitro-Chemotherapie untersucht und im zweiten Teil verschiedene potentielle Tumorstammzellmarker und deren Expressionsveränderungen unter Zytostatikabehandlung analysiert worden.

Patienten mit HNSCC zeigen eine Verschiebung des TH₁/TH₂-Zytokingleichgewichtes zugunsten der TH₂-Zytokine, woraus sich prognostische und therapeutische Konsequenzen ergeben. Die Auswirkungen einer Zytostatikabehandlung auf die lokalen Zytokinveränderungen, besonders auf das TH₁/TH₂-Gleichgewicht, sind bisher weitgehend unverstanden. Daher sind insgesamt acht HNSCC-Zelllinien einer in-vitro-Chemotherapie mit den klinisch gängigen Zytostatika 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel unterzogen worden, um anschließend das Expressionsniveau von insgesamt 13 TH₁/TH₂-Zytokine in den Überständen zu bestimmen. In den Untersuchungen zeigte sich sowohl bei Primärtumoren als auch bei Metastasen unter subletalen Dosierungen von 5-Fluorouracil und Cisplatin ein Konzentrationsanstieg der Zytokine IL-6 und G-CSF und ein Abfall des Konzentrationslevels von IL-1 β . Außerdem führte eine subletale Chemotherapie mit den beiden erwähnten Wirkstoffen bei Primärtumoren zu einem Anstieg von GM-CSF und TNF- α , während die dazugehörigen Metastasen mit einem konzentrationsabhängigen Abfall dieser Zytokine reagierten. Bei dem Zytokin IL-8 konnten unter Behandlung mit 5-Fluorouracil und Cisplatin keine Sekretionsveränderungen beobachtet werden. Unter einer in-vitro-Chemotherapie mit dem Zytostatikum Paclitaxel konnte hingegen bei allen Zelllinien, d. h. bei Primärtumoren und Metastasen, ein starker Abfall aller nachweisbaren Zytokinen, inklusive G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α festgestellt werden. Anhand der vorliegenden Daten kann zusammengefasst werden, dass eine in-vitro-Chemotherapie zu komplexen Veränderungen des Mikromilieus bei HNSCC führt.

In der onkologischen Forschung hat in den letzten Jahren die Tumorstammzelltheorie an Bedeutung gewonnen. Jene besagt, dass ein Tumor aus heterogenen Zellpopulationen besteht, unter denen lediglich eine kleine Entität von Tumorzellen mit stammzellspezifischen Eigenschaften ausgemacht werden kann. Diesen sogenannten Tumorstammzellen (Cancer Stem Cell, CSC) werden maligne Eigenschaften, wie Differenzierungsfähigkeit, Selbsterneuerung und homöostatische Kontrolle, zugeschrieben. Von besonderer Bedeutung ist dabei eine erhöhte Resistenz gegenüber den aktuellen antiproliferativen Therapieverfahren zusammen mit der Fähigkeit der Metastasierung, wodurch diese Subpopulation von Tumorzellen für die Rezidiventstehung verantwortlich gemacht wird. Da verlässliche Marker zur Identifizierung und gezielten Behandlung dieser Tumorstammzellen weitestgehend fehlen, sind in dieser Arbeit sowohl permanente HNSCC-Zelllinien als auch solide Tumorproben auf potentielle Tumorstammzellmarker untersucht worden. Des Weiteren wurde das Expressionsverhalten von markertragenden, potentiellen Tumorstammzellen unter in-vitro-Chemotherapie analysiert.

Sowohl in HNSCC-Zelllinien als auch in soliden Tumorproben konnte der Nachweis eines relativ hohen Expressionsniveaus von CD44 und CD59 erbracht werden, während andere Marker der CD-Nomenklatur, wie CD34, CD117 und CD133, nur auf einem geringen Anteil der Tumorzellen gefunden werden konnten. Ebenfalls zeigte sich eine heterogene Expression der Wnt-Rezeptorproteine Frizzled-(FZD) 3 und 7. Ferner konnten die embryonalen Stammzellmarker E-Cadherin, GATA-4, Goosecoid, Nanog, Oct-4, Snail, Sox2 und Sox17 in beiden Gewebearten detektiert werden. Weiterführende Analysen des Transkriptionsfaktors Oct-4, dem eine wesentliche Beteiligung an der Kanzerogenese zugesprochen wird, bestätigten den Nachweis der Oct-4A-Isoform in HNSCC-Zelllinien und solidem HNSCC-Gewebe sowie eine signifikante Korrelation dieses Stammzellmarkers mit dem FZD7-Protein in permanenten Zelllinien. Weiterhin nachweisbar war eine Coexpression von Oct-4 mit Nanog in HNSCC-Zelllinien. In den Anreicherungsversuchen unter in-vitro-Chemotherapie mit den Zytostatika 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel war eine teilweise signifikante Zunahme von FZD7⁺-, Oct-4⁺- und Oct-4⁺/FZD7⁺-Zellpopulationen beobachtet worden. Anhand der vorliegenden Daten wurde somit geschlussfolgert, dass die potentiellen Tumorstammzellmarker Oct-4 und FZD eine Subpopulation mit erhöhter Chemoresistenz darstellen und damit Charakteristika von Tumorstammzellen erfüllen.

6 Literaturverzeichnis

1. Argiris, A., et al., *Head and neck cancer*. Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1695-709.
2. Marur, S. and A.A. Forastiere, *Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment*. Mayo Clin Proc, 2008. **83**(4): p. 489-501.
3. Chin, D., et al., *Head and neck cancer: past, present and future*. Expert Rev Anticancer Ther, 2006. **6**(7): p. 1111-8.
4. Hauswald, H., et al., *Long-term outcome and patterns of failure in patients with advanced head and neck cancer*. Radiat Oncol, 2011. **6**: p. 70.
5. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J Clin, 2008. **58**(2): p. 71-96.
6. Leong, S.P., et al., *Clinical patterns of metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(2): p. 221-32.
7. Ozdek, A., et al., *Histopathological predictors of occult lymph node metastases in supraglottic squamous cell carcinomas*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2000. **257**(7): p. 389-92.
8. Dietl, B., et al., *Frequency and distribution pattern of distant metastases in patients with ENT tumors and their consequences for pretherapeutic staging*. Strahlenther Onkol, 2007. **183**(3): p. 138-43.
9. Garavello, W., et al., *Risk factors for distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2006. **132**(7): p. 762-6.
10. Jackel, M.C., A. Reischl, and P. Huppert, *Efficacy of radiologic screening for distant metastases and second primaries in newly diagnosed patients with head and neck cancer*. Laryngoscope, 2007. **117**(2): p. 242-7.
11. Merino, O.R., R.D. Lindberg, and G.H. Fletcher, *An analysis of distant metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts*. Cancer, 1977. **40**(1): p. 145-51.
12. Senft, A., et al., *Screening for distant metastases in head and neck cancer patients by chest CT or whole body FDG-PET: a prospective multicenter trial*. Radiother Oncol, 2008. **87**(2): p. 221-9.
13. Spector, J.G., et al., *Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx*. Laryngoscope, 2001. **111**(6): p. 1079-87.

14. Sessions, D.G., et al., *Analysis of treatment results for oral tongue cancer*. Laryngoscope, 2002. **112**(4): p. 616-25.
15. Chung, C.H., et al., *Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression*. Cancer Cell, 2004. **5**(5): p. 489-500.
16. Woolgar, J.A. and A. Triantafyllou, *Pitfalls and procedures in the histopathological diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and a review of the role of pathology in prognosis*. Oral Oncol, 2009. **45**(4-5): p. 361-85.
17. Gillison, M.L., *Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity*. Semin Oncol, 2004. **31**(6): p. 744-54.
18. Ang, K.K., et al., *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(1): p. 24-35.
19. Goldenberg, D., et al., *Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction*. Laryngoscope, 2004. **114**(6): p. 1027-31.
20. Lee, C.H., et al., *The precancer risk of betel quid chewing, tobacco use and alcohol consumption in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis in southern Taiwan*. Br J Cancer, 2003. **88**(3): p. 366-72.
21. Wittekind, C., Meyer, H.-J., *TNM: Classification of Malignant Tumours (7th Edition)*. 2010: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
22. Seiwert, T.Y. and E.E. Cohen, *State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer*. Br J Cancer, 2005. **92**(8): p. 1341-8.
23. Simon, C. and P.K. Plinkert, *Combined modality approaches in the treatment of head and neck cancer patients*. HNO, 2008. **56**(6): p. 575-84.
24. Posner, M.R., *Integrating systemic agents into multimodality treatment of locally advanced head and neck cancer*. Ann Oncol, 2010. **21 Suppl 7**: p. vii246-51.
25. Bernier, J., et al., *Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(19): p. 1945-52.
26. Cooper, J.S., et al., *Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 2004. **350**(19): p. 1937-44.
27. Bourhis, J., et al., *Individual patients' data meta-analyses in head and neck cancer*. Curr Opin Oncol, 2007. **19**(3): p. 188-94.
28. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 567-78.

29. Posner, M.R., et al., *Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer*. N Engl J Med, 2007. **357**(17): p. 1705-15.
30. Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K., *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 9. Auflage. 2004: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; Auflage: 9 (19. Oktober 2004).
31. Chandana, S.R. and B.A. Conley, *Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced squamous cancers of the head and neck: current status and future prospects*. Curr Opin Oncol, 2009. **21**(3): p. 218-23.
32. Gan, Y., et al., *Pharmacodynamics of taxol in human head and neck tumors*. Cancer Res, 1996. **56**(9): p. 2086-93.
33. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival*. Lancet Oncol, 2010. **11**(1): p. 21-8.
34. Vermorken, J.B., et al., *Overview of the efficacy of cetuximab in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck in patients who previously failed platinum-based therapies*. Cancer, 2008. **112**(12): p. 2710-9.
35. Wilken, R., et al., *Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 12.
36. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
37. Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U. , *Pathologie Pathologie*. Vol. 3. Auflage. 2004: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; Auflage: 3 (16. April 2004).
38. van der Waal, I., *Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management*. Oral Oncol, 2009. **45**(4-5): p. 317-23.
39. Leemans, C.R., B.J. Braakhuis, and R.H. Brakenhoff, *The molecular biology of head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(1): p. 9-22.
40. Douglas, W.G., et al., *Development of head and neck squamous cell carcinoma is associated with altered cytokine responsiveness*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(10): p. 585-93.
41. Pries, R. and B. Wollenberg, *Cytokines in head and neck cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(3): p. 141-6.
42. Rakesh, K. and D.K. Agrawal, *Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(5): p. 649-57.

43. Becker, Y., *Molecular immunological approaches to biotherapy of human cancers--a review, hypothesis and implications*. Anticancer Res, 2006. **26**(2A): p. 1113-34.
44. Montag, M., et al., *Angiogenic growth factors in tissue homogenates of HNSCC: expression pattern, prognostic relevance, and interrelationships*. Cancer Sci, 2009. **100**(7): p. 1210-8.
45. Ninck, S., et al., *Expression profiles of angiogenic growth factors in squamous cell carcinomas of the head and neck*. Int J Cancer, 2003. **106**(1): p. 34-44.
46. Gutschalk, C.M., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promote malignant growth of cells from head and neck squamous cell carcinomas in vivo*. Cancer Res, 2006. **66**(16): p. 8026-36.
47. Chen, Z., et al., *Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(6): p. 1369-79.
48. Mann, E.A., et al., *Cytokine expression by head and neck squamous cell carcinomas*. Am J Surg, 1992. **164**(6): p. 567-73.
49. Pak, A.S., et al., *Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(1): p. 95-103.
50. Young, M.R., et al., *Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+ natural suppressor cells*. Int J Cancer, 1997. **74**(1): p. 69-74.
51. Worden, B., et al., *Hepatocyte growth factor/scatter factor differentially regulates expression of proangiogenic factors through Egr-1 in head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7071-80.
52. Wolf, J.S., et al., *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*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(6): p. 1812-20.
53. Mann, E.A., et al., *Cytokine regulation of gelatinase production by head and neck squamous cell carcinoma: the role of tumor necrosis factor-alpha*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1995. **104**(3): p. 203-9.
54. Mukhopadhyay, P., et al., *The cyclin-dependent kinase 2 inhibitor down-regulates interleukin-1beta-mediated induction of cyclooxygenase-2 expression in human lung carcinoma cells*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1758-66.

55. Teruel, A., et al., *Potential contribution of naive immune effectors to oral tumor resistance: role in synergistic induction of VEGF, IL-6, and IL-8 secretion*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(3): p. 359-66.
56. Woods, K.V., et al., *Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens*. Cancer Res, 1998. **58**(14): p. 3132-41.
57. St John, M.A., et al., *Proinflammatory mediators upregulate snail in head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(19): p. 6018-27.
58. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
59. Pries, R., et al., *Secretion of tumor-promoting and immune suppressive cytokines by cell lines of head and neck squamous cell carcinoma*. In Vivo, 2006. **20**(1): p. 45-8.
60. Kanazawa, T., et al., *Interleukin-6 directly influences proliferation and invasion potential of head and neck cancer cells*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2007. **264**(7): p. 815-21.
61. Gasche, J.A., et al., *Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells*. Int J Cancer, 2011. **129**(5): p. 1053-63.
62. Bancroft, C.C., et al., *Coexpression of proangiogenic factors IL-8 and VEGF by human head and neck squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF-kappaB signal pathways*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(2): p. 435-42.
63. Suzuki, F., et al., *Prognostic significance of cytoplasmic macrophage migration inhibitory factor expression in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with concurrent chemoradiotherapy*. Oncol Rep, 2005. **13**(1): p. 59-64.
64. Bekereditian-Ding, I., et al., *Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha*. Immunology, 2009. **128**(3): p. 439-50.
65. Zeidler, R., et al., *Tumor cell-derived prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1*. FASEB J, 2000. **14**(5): p. 661-8.
66. Yapijakis, C., et al., *Association of polymorphisms in Tumor Necrosis Factor Alpha and Beta genes with increased risk for oral cancer*. Anticancer Res, 2009. **29**(6): p. 2379-86.
67. Koontongkaew, S., P. Amornphimoltham, and B. Yapong, *Tumor-stroma interactions influence cytokine expression and matrix metalloproteinase activities in paired primary and metastatic head and neck cancer cells*. Cell Biol Int, 2009. **33**(2): p. 165-73.

68. Young, M.R., et al., *Human squamous cell carcinomas of the head and neck chemoattract immune suppressive CD34(+) progenitor cells*. Hum Immunol, 2001. **62**(4): p. 332-41.
69. Chin, D., et al., *Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis*. Br J Plast Surg, 2004. **57**(7): p. 595-602.
70. Druzgal, C.H., et al., *A pilot study of longitudinal serum cytokine and angiogenesis factor levels as markers of therapeutic response and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2005. **27**(9): p. 771-84.
71. Lathers, D.M. and M.R. Young, *Increased aberrance of cytokine expression in plasma of patients with more advanced squamous cell carcinoma of the head and neck*. Cytokine, 2004. **25**(5): p. 220-8.
72. Sparano, A., et al., *Modulation of Th1 and Th2 cytokine profiles and their association with advanced head and neck squamous cell carcinoma*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2004. **131**(5): p. 573-6.
73. Lu, X., et al., *Serum CCL2 and serum TNF-alpha--two new biomarkers predict bone invasion, post-treatment distant metastasis and poor overall survival in nasopharyngeal carcinoma*. Eur J Cancer, 2011. **47**(3): p. 339-46.
74. Kondo, T., et al., *Favorable prognosis of renal cell carcinoma with increased expression of chemokines associated with a Th1-type immune response*. Cancer Sci, 2006. **97**(8): p. 780-6.
75. Mashino, K., et al., *Effective strategy of dendritic cell-based immunotherapy for advanced tumor-bearing hosts: the critical role of Th1-dominant immunity*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(10): p. 785-94.
76. Garrity, T., et al., *Increased presence of CD34+ cells in the peripheral blood of head and neck cancer patients and their differentiation into dendritic cells*. Int J Cancer, 1997. **73**(5): p. 663-9.
77. Lathers, D.M., N. Achille, and M.R. Young, *Dendritic cell development from mobilized peripheral blood CD34+ cells*. Methods Mol Biol, 2003. **215**: p. 409-15.
78. Lathers, D.M., et al., *Dendritic cell differentiation pathways of CD34+ cells from the peripheral blood of head and neck cancer patients*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(5): p. 623-8.
79. Young, M.R., *Tumor skewing of CD34+ progenitor cell differentiation into endothelial cells*. Int J Cancer, 2004. **109**(4): p. 516-24.
80. Wollenberg, B., *Implication of stem cells in the biology and therapy of head and neck cancer*. Laryngorhinootologie, 2011. **90 Suppl 1**: p. S110-9.

81. Meirovitz, A., et al., *Cytokines levels, severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer--a prospective pilot study*. Radiat Oncol, 2010. **5**: p. 16.
82. Silver, H.J., M.S. Dietrich, and B.A. Murphy, *Changes in body mass, energy balance, physical function, and inflammatory state in patients with locally advanced head and neck cancer treated with concurrent chemoradiation after low-dose induction chemotherapy*. Head Neck, 2007. **29**(10): p. 893-900.
83. Dietz, A., et al., *Prognostic relevance of serum levels of the angiogenic peptide bFGF in advanced carcinoma of the head and neck treated by primary radiochemotherapy*. Head Neck, 2000. **22**(7): p. 666-73.
84. Poth, K.J., et al., *Cisplatin treatment induces a transient increase in tumorigenic potential associated with high interleukin-6 expression in head and neck squamous cell carcinoma*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(8): p. 2430-9.
85. Lanca, R., Gearhart, J, Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Donall Thomas, E. , *Essentials of Stem Cell Biology; 2nd edition*. Academic Press; 2nd edition. (12. Juni 2009), 2009. **2nd edition**(2): p. 18.
86. Virchow, R., *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre* Berliner Medizinhistorisches Museum (BMM) an der Charité, 1858 **1**(1).
87. Makino, S., *The role of tumor stem-cells in regrowth of the tumor following drastic applications*. Acta Unio Int Contra Cancrum, 1959. **15**(Suppl 1): p. 196-8.
88. Kleinsmith, L.J. and G.B. Pierce, Jr., *Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells*. Cancer Res, 1964. **24**: p. 1544-51.
89. Pierce, G.B. and C. Wallace, *Differentiation of malignant to benign cells*. Cancer Res, 1971. **31**(2): p. 127-34.
90. Pierce, G.B. and W.C. Speers, *Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation*. Cancer Res, 1988. **48**(8): p. 1996-2004.
91. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
92. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 645-8.
93. Eramo, A., et al., *Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population*. Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 504-14.

94. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
95. Suetsugu, A., et al., *Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(4): p. 820-4.
96. Ricci-Vitiani, L., et al., *Colon cancer stem cells*. Gut, 2008. **57**(4): p. 538-48.
97. Schatton, T., et al., *Identification of cells initiating human melanomas*. Nature, 2008. **451**(7176): p. 345-9.
98. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
99. Li, C., et al., *Identification of pancreatic cancer stem cells*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1030-7.
100. Prince, M.E., et al., *Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 973-8.
101. Patrawala, L., et al., *Hierarchical organization of prostate cancer cells in xenograft tumors: the CD44+alpha2beta1+ cell population is enriched in tumor-initiating cells*. Cancer Res, 2007. **67**(14): p. 6796-805.
102. Szotek, P.P., et al., *Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(30): p. 11154-9.
103. Clevers, H., *The cancer stem cell: premises, promises and challenges*. Nat Med, 2011. **17**(3): p. 313-9.
104. Maenhaut, C., et al., *Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? An analysis*. Carcinogenesis, 2010. **31**(2): p. 149-58.
105. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
106. Essers, M.A. and A. Trumpp, *Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy*. Mol Oncol, 2010. **4**(5): p. 443-50.
107. Regenbrecht, C.R., H. Lehrach, and J. Adjaye, *Stemming cancer: functional genomics of cancer stem cells in solid tumors*. Stem Cell Rev, 2008. **4**(4): p. 319-28.
108. Dick, J.E., *Stem cell concepts renew cancer research*. Blood, 2008. **112**(13): p. 4793-807.
109. Albers, A.E., et al., *Stem cells in squamous head and neck cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2011.

110. Jones, D.L. and A.J. Wagers, *No place like home: anatomy and function of the stem cell niche*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 11-21.
111. Calabrese, C., et al., *A perivascular niche for brain tumor stem cells*. Cancer Cell, 2007. **11**(1): p. 69-82.
112. Clarke, M.F. and M. Fuller, *Stem cells and cancer: two faces of eve*. Cell, 2006. **124**(6): p. 1111-5.
113. Ghotra, V.P., J.C. Puigvert, and E.H. Danen, *The cancer stem cell microenvironment and anti-cancer therapy*. Int J Radiat Biol, 2009. **85**(11): p. 955-62.
114. Li, L. and W.B. Neaves, *Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters*. Cancer Res, 2006. **66**(9): p. 4553-7.
115. Cabarcas, S.M., L.A. Mathews, and W.L. Farrar, *The cancer stem cell niche-there goes the neighborhood?* Int J Cancer, 2011.
116. Vezzoni, L. and G. Parmiani, *Limitations of the cancer stem cell theory*. Cytotechnology, 2008. **58**(1): p. 3-9.
117. Diaz-Ramos, M.C., P. Engel, and R. Bastos, *Towards a comprehensive human cell-surface immunome database*. Immunol Lett, 2010. **134**(2): p. 183-7.
118. Zola, H., et al., *CD molecules 2006--human cell differentiation molecules*. J Immunol Methods, 2007. **319**(1-2): p. 1-5.
119. Fina, L., et al., *Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells*. Blood, 1990. **75**(12): p. 2417-26.
120. Watt, S.M., et al., *Distribution and epitope analysis of the cell membrane glycoprotein (HPCA-1) associated with human hemopoietic progenitor cells*. Leukemia, 1987. **1**(5): p. 417-26.
121. Simmons, D.L., et al., *Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells*. J Immunol, 1992. **148**(1): p. 267-71.
122. Young, M.R., et al., *Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer*. Int J Cancer, 1996. **67**(3): p. 333-8.
123. Young, M.R. and D.M. Lathers, *Myeloid progenitor cells mediate immune suppression in patients with head and neck cancers*. Int J Immunopharmacol, 1999. **21**(4): p. 241-52.
124. Lesley, J., R. Hyman, and P.W. Kincade, *CD44 and its interaction with extracellular matrix*. Adv Immunol, 1993. **54**: p. 271-335.
125. Turley, E.A., P.W. Noble, and L.Y. Bourguignon, *Signaling properties of hyaluronan receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4589-92.

126. Toole, B.P., *Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(24): p. 7462-7468.
127. Ponta, H., L. Sherman, and P.A. Herrlich, *CD44: from adhesion molecules to signalling regulators*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(1): p. 33-45.
128. Bourguignon, L.Y., D. Zhu, and H. Zhu, *CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression*. Front Biosci, 1998. **3**: p. d637-49.
129. Kuniyasu, H., et al., *Heparan sulfate enhances invasion by human colon carcinoma cell lines through expression of CD44 variant exon 3*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(12): p. 4067-72.
130. Misra, S., et al., *Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25285-8.
131. Dalerba, P., et al., *Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10158-63.
132. Pries, R., et al., *Potential stem cell marker CD44 is constitutively expressed in permanent cell lines of head and neck cancer*. In Vivo, 2008. **22**(1): p. 89-92.
133. Herold-Mende, C., et al., *Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck*. J Pathol, 1996. **179**(1): p. 66-73.
134. Van Hal, N.L., et al., *Characterization of CD44v6 isoforms in head-and-neck squamous-cell carcinoma*. Int J Cancer, 1999. **82**(6): p. 837-45.
135. Kawano, T., et al., *Expression of E-cadherin, and CD44s and CD44v6 and its association with prognosis in head and neck cancer*. Auris Nasus Larynx, 2004. **31**(1): p. 35-41.
136. Marhaba, R., M. Bourouba, and M. Zoller, *CD44v6 promotes proliferation by persisting activation of MAP kinases*. Cell Signal, 2005. **17**(8): p. 961-73.
137. Spafford, M.F., et al., *Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1996. **122**(6): p. 627-32.
138. Wielenga, V.J., et al., *Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway*. Am J Pathol, 1999. **154**(2): p. 515-23.
139. Okamoto, A., et al., *Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Oral Oncol, 2009. **45**(7): p. 633-9.
140. Orian-Rousseau, V., *CD44, a therapeutic target for metastasising tumours*. Eur J Cancer, 2010. **46**(7): p. 1271-7.
141. Su, J., et al., *Identification of cancer stem-like CD44+ cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line*. Arch Med Res, 2011. **42**(1): p. 15-21.

142. Perez, A., et al., *CD44 interacts with EGFR and promotes head and neck squamous cell carcinoma initiation and progression*. Oral Oncol, 2013. **49**(4): p. 306-13.
143. Oh, S.Y., et al., *CD44-negative cells in head and neck squamous carcinoma also have stem-cell like traits*. Eur J Cancer, 2012. **49**(1): p. 272-80.
144. Law, R.H., et al., *The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin*. Nature, 2010. **468**(7322): p. 447-51.
145. Wickham, S.E., et al., *Mapping the intermedilysin-human CD59 receptor interface reveals a deep correspondence with the binding site on CD59 for complement binding proteins C8alpha and C9*. J Biol Chem, 2011. **286**(23): p. 20952-62.
146. Donin, N., et al., *Complement resistance of human carcinoma cells depends on membrane regulatory proteins, protein kinases and sialic acid*. Clin Exp Immunol, 2003. **131**(2): p. 254-63.
147. Ravindranath, N.M. and C. Shuler, *Expression of complement restriction factors (CD46, CD55 & CD59) in head and neck squamous cell carcinomas*. J Oral Pathol Med, 2006. **35**(9): p. 560-7.
148. Besmer, P., et al., *A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family*. Nature, 1986. **320**(6061): p. 415-21.
149. Yarden, Y., et al., *Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand*. EMBO J, 1987. **6**(11): p. 3341-51.
150. Avraham, H., et al., *Effects of the stem cell factor, c-kit ligand, on human megakaryocytic cells*. Blood, 1992. **79**(2): p. 365-71.
151. Simmons, P.J., et al., *c-kit is expressed by primitive human hematopoietic cells that give rise to colony-forming cells in stroma-dependent or cytokine-supplemented culture*. Exp Hematol, 1994. **22**(2): p. 157-65.
152. Hirota, S., et al., *Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors*. Science, 1998. **279**(5350): p. 577-80.
153. Furitsu, T., et al., *Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product*. J Clin Invest, 1993. **92**(4): p. 1736-44.
154. Sheu, L.F., et al., *Co-expression of c-kit and stem cell factor in primary and metastatic nasopharyngeal carcinomas and nasopharyngeal epithelium*. J Pathol, 2005. **207**(2): p. 216-23.

155. Weigmann, A., et al., *Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12425-30.
156. Yin, A.H., et al., *AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 1997. **90**(12): p. 5002-12.
157. Oshima, Y., et al., *Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting*. Gastroenterology, 2007. **132**(2): p. 720-32.
158. Richardson, G.D., et al., *CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 16): p. 3539-45.
159. Uchida, N., et al., *Direct isolation of human central nervous system stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14720-5.
160. Hermann, P.C., et al., *Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 313-23.
161. Collins, A.T., et al., *Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10946-51.
162. Brunner, M., et al., *Elevated levels of circulating endothelial progenitor cells in head and neck cancer patients*. J Surg Oncol, 2008. **98**(7): p. 545-50.
163. Chiou, S.H., et al., *Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(13): p. 4085-95.
164. Wei, X.D., et al., *In vivo investigation of CD133 as a putative marker of cancer stem cells in Hep-2 cell line*. Head Neck, 2009. **31**(1): p. 94-101.
165. Yang, J.P., et al., *Chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in laryngeal carcinoma*. Chin Med J (Engl), 2011. **124**(7): p. 1055-60.
166. Nusse, R. and H.E. Varmus, *Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome*. Cell, 1982. **31**(1): p. 99-109.
167. Rijsewijk, F., et al., *The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless*. Cell, 1987. **50**(4): p. 649-57.
168. Hsieh, J.C., et al., *Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3546-51.

169. Bhanot, P., et al., *A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor*. Nature, 1996. **382**(6588): p. 225-30.
170. Wehrli, M., et al., *arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling*. Nature, 2000. **407**(6803): p. 527-30.
171. Chen, W., et al., *Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4*. Science, 2003. **301**(5638): p. 1391-4.
172. Mao, J., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway*. Mol Cell, 2001. **7**(4): p. 801-9.
173. Mikels, A.J. and R. Nusse, *Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context*. PLoS Biol, 2006. **4**(4): p. e115.
174. Singla, D.K., et al., *wnt3a but not wnt11 supports self-renewal of embryonic stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(2): p. 789-95.
175. Kielman, M.F., et al., *Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling*. Nat Genet, 2002. **32**(4): p. 594-605.
176. Kelly, K.F., et al., *beta-catenin enhances Oct-4 activity and reinforces pluripotency through a TCF-independent mechanism*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(2): p. 214-27.
177. Pereira, L., F. Yi, and B.J. Merrill, *Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(20): p. 7479-91.
178. He, T.C., et al., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. Science, 1998. **281**(5382): p. 1509-12.
179. You, Z., et al., *Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis*. J Cell Biol, 2002. **157**(3): p. 429-40.
180. Holcombe, R.F., et al., *Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma*. Mol Pathol, 2002. **55**(4): p. 220-6.
181. Howng, S.L., et al., *Differential expression of Wnt genes, beta-catenin and E-cadherin in human brain tumors*. Cancer Lett, 2002. **183**(1): p. 95-101.
182. Uraguchi, M., et al., *Activation of WNT family expression and signaling in squamous cell carcinomas of the oral cavity*. J Dent Res, 2004. **83**(4): p. 327-32.
183. Musgrove, E.A., *Wnt signalling via the epidermal growth factor receptor: a role in breast cancer?* Breast Cancer Res, 2004. **6**(2): p. 65-8.
184. Diaz Prado, S.M., et al., *Expression of Wnt gene family and frizzled receptors in head and neck squamous cell carcinomas*. Virchows Arch, 2009. **455**(1): p. 67-75.

185. Wang, Y., et al., *A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the Drosophila tissue polarity gene frizzled*. J Biol Chem, 1996. **271**(8): p. 4468-76.
186. Katoh, M., *WNT signaling in stem cell biology and regenerative medicine*. Curr Drug Targets, 2008. **9**(7): p. 565-70.
187. Armstrong, A., et al., *Frizzled3 is required for neurogenesis and target innervation during sympathetic nervous system development*. J Neurosci, 2011. **31**(7): p. 2371-81.
188. Sala, C.F., et al., *Identification, gene structure, and expression of human frizzled-3 (FZD3)*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(1): p. 27-34.
189. Endo, Y., et al., *Wnt-3a and Dickkopf-1 stimulate neurite outgrowth in Ewing tumor cells via a Frizzled3- and c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(7): p. 2368-79.
190. Bengochea, A., et al., *Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma*. Br J Cancer, 2008. **99**(1): p. 143-50.
191. Tanaka, S., et al., *A novel frizzled gene identified in human esophageal carcinoma mediates APC/beta-catenin signals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 10164-9.
192. Liss, M.A., et al., *Characterization of soy-based changes in Wnt-frizzled signaling in prostate cancer*. Cancer Genomics Proteomics, 2010. **7**(5): p. 245-52.
193. Heller, R.S., et al., *Expression of Wnt, Frizzled, sFRP, and DKK genes in adult human pancreas*. Gene Expr, 2003. **11**(3-4): p. 141-7.
194. Sagara, N., et al., *Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human frizzled-1, frizzled-2, and frizzled-7*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **252**(1): p. 117-22.
195. Melchior, K., et al., *The WNT receptor FZD7 contributes to self-renewal signaling of human embryonic stem cells*. Biol Chem, 2008. **389**(7): p. 897-903.
196. Merle, P., et al., *Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2004. **127**(4): p. 1110-22.
197. Khan, N.I., K.F. Bradstock, and L.J. Bendall, *Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Haematol, 2007. **138**(3): p. 338-48.
198. Kirikoshi, H., H. Sekihara, and M. Katoh, *Up-regulation of Frizzled-7 (FZD7) in human gastric cancer*. Int J Oncol, 2001. **19**(1): p. 111-5.
199. Ueno, K., et al., *Frizzled-7 as a potential therapeutic target in colorectal cancer*. Neoplasia, 2008. **10**(7): p. 697-705.

200. Vincan, E., et al., *Frizzled-7 dictates three-dimensional organization of colorectal cancer cell carcinoids*. *Oncogene*, 2007. **26**(16): p. 2340-52.
201. Nambotin, S.B., et al., *Pharmacological inhibition of Frizzled-7 displays anti-tumor properties in hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2011. **54**(2): p. 288-99.
202. Zeng, Z.Y., et al., *Gene expression profiling of nasopharyngeal carcinoma reveals the abnormally regulated Wnt signaling pathway*. *Hum Pathol*, 2007. **38**(1): p. 120-33.
203. Greenburg, G. and E.D. Hay, *Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells*. *J Cell Biol*, 1982. **95**(1): p. 333-9.
204. Polyak, K. and R.A. Weinberg, *Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(4): p. 265-73.
205. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. *Cell*, 2009. **139**(5): p. 871-90.
206. Kong, D., et al., *Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12445.
207. Takkunen, M., et al., *Snail-dependent and -independent epithelial-mesenchymal transition in oral squamous carcinoma cells*. *J Histochem Cytochem*, 2006. **54**(11): p. 1263-75.
208. Angst, B.D., C. Marozzi, and A.I. Magee, *The cadherin superfamily: diversity in form and function*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 4): p. 629-41.
209. Takeichi, M., et al., *Cadherin-mediated cell-cell adhesion and neurogenesis*. *Neurosci Res Suppl*, 1990. **13**: p. S92-6.
210. Sakaki, T., et al., *Changing expression of E- and P-cadherin during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide*. *J Oral Pathol Med*, 2003. **32**(9): p. 530-7.
211. Lewis, J.E., et al., *E-cadherin mediates adherens junction organization through protein kinase C*. *J Cell Sci*, 1994. **107** (Pt 12): p. 3615-21.
212. Behrens, J., et al., *Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion*. *J Cell Biol*, 1989. **108**(6): p. 2435-47.
213. Iwai, S., et al., *Involvement of the Wnt-beta-catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells*. *Int J Oncol*, 2011. **37**(5): p. 1095-103.
214. Prenzel, K.L., et al., *Skip metastasis in nonsmall cell lung carcinoma: predictive markers and isolated tumor cells in N1 lymph nodes*. *Cancer*, 2004. **100**(9): p. 1909-17.

215. Zhang, W., et al., *E-cadherin loss promotes the initiation of squamous cell carcinoma invasion through modulation of integrin-mediated adhesion*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 2): p. 283-91.
216. Mandal, M., et al., *Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features*. Cancer, 2008. **112**(9): p. 2088-100.
217. Huber, G.F., et al., *Down regulation of E-Cadherin (ECAD) - a predictor for occult metastatic disease in sentinel node biopsy of early squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 217:1-8.
218. Grau, Y., C. Carteret, and P. Simpson, *Mutations and Chromosomal Rearrangements Affecting the Expression of Snail, a Gene Involved in Embryonic Patterning in DROSOPHILA MELANOGASTER*. Genetics, 1984. **108**(2): p. 347-60.
219. Manzanares, M., A. Locascio, and M.A. Nieto, *The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution*. Trends Genet, 2001. **17**(4): p. 178-81.
220. Barrallo-Gimeno, A. and M.A. Nieto, *The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer*. Development, 2005. **132**(14): p. 3151-61.
221. Batlle, E., et al., *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 84-9.
222. Neilson, E.G., D. Plieth, and C. Venkov, *Epithelial-mesenchymal transitions and the intersecting cell fate of fibroblasts and metastatic cancer cells*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2003. **114**: p. 87-100; discussion 100-1.
223. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
224. Moody, S.E., et al., *The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 197-209.
225. Yokoyama, K., et al., *Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro*. Oral Oncol, 2001. **37**(1): p. 65-71.
226. Chang, C.J., et al., *Let-7d functions as novel regulator of epithelial-mesenchymal transition and chemoresistant property in oral cancer*. Oncol Rep, 2011. **26**(4): p. 1003-10.
227. Ginos, M.A., et al., *Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Cancer Res, 2004. **64**(1): p. 55-63.

228. Hayry, V., et al., *Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue*. Br J Cancer, 2010. **102**(5): p. 892-7.
229. Blum, M., et al., *Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene goosecoid*. Cell, 1992. **69**(7): p. 1097-106.
230. Cho, K.W., et al., *Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the Xenopus homeobox gene goosecoid*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1111-20.
231. Hartwell, K.A., et al., *The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(50): p. 18969-74.
232. Mani, S.A., et al., *Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10069-74.
233. Takeda, J., S. Seino, and G.I. Bell, *Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(17): p. 4613-20.
234. Pesce, M. and H.R. Scholer, *Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development*. Stem Cells, 2001. **19**(4): p. 271-8.
235. Nichols, J., et al., *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. Cell, 1998. **95**(3): p. 379-91.
236. Niwa, H., J. Miyazaki, and A.G. Smith, *Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells*. Nat Genet, 2000. **24**(4): p. 372-6.
237. Kim, J.B., et al., *Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells*. Cell, 2009. **136**(3): p. 411-9.
238. Gidekel, S., et al., *Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant*. Cancer Cell, 2003. **4**(5): p. 361-70.
239. Tai, M.H., et al., *Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2005. **26**(2): p. 495-502.
240. Siu, A., et al., *Stem cell markers as predictors of oral cancer invasion*. Anticancer Res. **32**(4): p. 1163-6.
241. Cauffman, G., et al., *POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos*. Stem Cells, 2006. **24**(12): p. 2685-91.
242. Lee, J., et al., *The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal*. J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33554-65.

- 243. Wang, X., et al., *Alternative translation of OCT4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response*. Stem Cells, 2009. **27**(6): p. 1265-75.
- 244. Atlasi, Y., et al., *OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells*. Stem Cells, 2008. **26**(12): p. 3068-74.
- 245. Papamichos, S.I., et al., *OCT4B1 isoform: the novel OCT4 alternative spliced variant as a putative marker of stemness*. Mol Hum Reprod, 2009. **15**(5): p. 269-70.
- 246. Wegner, M., *From head to toes: the multiple facets of Sox proteins*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(6): p. 1409-20.
- 247. Avilion, A.A., et al., *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. Genes Dev, 2003. **17**(1): p. 126-40.
- 248. Kashyap, V., et al., *Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs*. Stem Cells Dev, 2009. **18**(7): p. 1093-108.
- 249. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
- 250. Ellis, P., et al., *SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult*. Dev Neurosci, 2004. **26**(2-4): p. 148-65.
- 251. Ferri, A.L., et al., *Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain*. Development, 2004. **131**(15): p. 3805-19.
- 252. Hagstrom, S.A., et al., *SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies*. Am J Med Genet A, 2005. **138A**(2): p. 95-8.
- 253. Fang, X., et al., *The SOX2 response program in glioblastoma multiforme: an integrated ChIP-seq, expression microarray, and microRNA analysis*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 11.
- 254. Gangemi, R.M., et al., *SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity*. Stem Cells, 2009. **27**(1): p. 40-8.
- 255. Ge, N., et al., *Prognostic significance of Oct4 and Sox2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma*. J Transl Med, 2010. **8**: p. 94.
- 256. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 643-55.

- 257. Mitsui, K., et al., *The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 631-42.
- 258. Silva, J., et al., *Nanog is the gateway to the pluripotent ground state*. Cell, 2009. **138**(4): p. 722-37.
- 259. Meng, H.M., et al., *Overexpression of nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer*. Cancer Biol Ther, 2010. **9**(4).
- 260. Pan, Y., et al., *Nanog is highly expressed in ovarian serous cystadenocarcinoma and correlated with clinical stage and pathological grade*. Pathobiology, 2010. **77**(6): p. 283-8.
- 261. Jeter, C.R., et al., *NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation*. Oncogene, 2011. **30**(36): p. 3833-45.
- 262. Tsai, L.L., et al., *Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2011. **40**(8): p. 621-8.
- 263. Katoh, M., *Molecular cloning and characterization of human SOX17*. Int J Mol Med, 2002. **9**(2): p. 153-7.
- 264. Kim, I., T.L. Saunders, and S.J. Morrison, *Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells*. Cell, 2007. **130**(3): p. 470-83.
- 265. Matsui, T., et al., *Redundant roles of Sox17 and Sox18 in postnatal angiogenesis in mice*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 17): p. 3513-26.
- 266. Shimoda, M., et al., *Sox17 plays a substantial role in late-stage differentiation of the extraembryonic endoderm in vitro*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 21): p. 3859-69.
- 267. Sohn, J., et al., *Identification of Sox17 as a transcription factor that regulates oligodendrocyte development*. J Neurosci, 2006. **26**(38): p. 9722-35.
- 268. Du, Y.C., et al., *Induction and down-regulation of Sox17 and its possible roles during the course of gastrointestinal tumorigenesis*. Gastroenterology, 2009. **137**(4): p. 1346-57.
- 269. Ko, L.J. and J.D. Engel, *DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(7): p. 4011-22.
- 270. Kuo, C.T., et al., *GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation*. Genes Dev, 1997. **11**(8): p. 1048-60.
- 271. Weiss, M.J. and S.H. Orkin, *GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis*. Exp Hematol, 1995. **23**(2): p. 99-107.

- 272. Arceci, R.J., et al., *Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(4): p. 2235-46.
- 273. Heikinheimo, M., et al., *Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary*. Endocrinology, 1997. **138**(8): p. 3505-14.
- 274. Ketola, I., et al., *Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis*. Endocrinology, 1999. **140**(3): p. 1470-80.
- 275. Haveri, H., et al., *Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa*. BMC Gastroenterol, 2008. **8**: p. 9.
- 276. Hellebrekers, D.M., et al., *GATA4 and GATA5 are potential tumor suppressors and biomarkers in colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(12): p. 3990-7.
- 277. Gammon, L., et al., *Stem cell characteristics of cell sub-populations in cell lines derived from head and neck cancers of Fanconi anemia patients*. J Oral Pathol Med, 2011. **40**(2): p. 143-52.
- 278. Felthaus, O., et al., *Cancer stem cell-like cells from a single cell of oral squamous carcinoma cell lines*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **407**(1): p. 28-33.
- 279. Yanamoto, S., et al., *Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells*. Oral Oncol, 2011. **47**(9): p. 855-60.
- 280. Koukourakis, M.I., et al., *Cancer stem cell phenotype relates to radio-chemotherapy outcome in locally advanced squamous cell head-neck cancer*. Br J Cancer. **106**(5): p. 846-53.
- 281. Tanvetyanon, T., et al., *Prognostic factors for survival after salvage reirradiation of head and neck cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(12): p. 1983-91.
- 282. Lindl, T., Gstraunthaler, G., *Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank*. Spektrum Akademischer Verlag, 2008. **Auflage: 6. Aufl.**
- 283. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag, 2011. **Auflage: 3. Auflage.**
- 284. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
- 285. Shapiro, H., *Practical Flow Cytometry*. John Wiley & Sons, 2003. **4th Edition**(4).
- 286. Carlsson, M., et al., *Quantification and visualization of cardiovascular 4D velocity mapping accelerated with parallel imaging or k-t BLAST: Head to head comparison and validation at 1.5T and 3T*. J Cardiovasc Magn Reson, 2011. **13**(1): p. 55.

287. Huang, G.C., et al., *The synergistic cytotoxicity of cisplatin and taxol in killing oral squamous cell carcinoma*. Jpn J Clin Oncol, 2004. **34**(9): p. 499-504.
288. Brown, K.L., A. Maiti, and P. Johnson, *Role of sulfation in CD44-mediated hyaluronan binding induced by inflammatory mediators in human CD14(+) peripheral blood monocytes*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5367-74.
289. Zangrossi, S., et al., *Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker*. Stem Cells, 2007. **25**(7): p. 1675-80.
290. Kotoula, V., S.I. Papamichos, and A.F. Lambropoulos, *Revisiting OCT4 expression in peripheral blood mononuclear cells*. Stem Cells, 2008. **26**(1): p. 290-1.
291. Cheng, Y. and W.H. Prusoff, *Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction*. Biochem Pharmacol, 1973. **22**(23): p. 3099-108.
292. Cullen, K.J., et al., *Glutathione S-transferase pi amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8097-102.
293. Kaluderovic, M.R., et al., *Organogallium(III) complexes as apoptosis promoting anticancer agents for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines*. J Inorg Biochem, 2011. **105**(2): p. 164-70.
294. Aissat, N., et al., *Antiproliferative effects of rapamycin as a single agent and in combination with carboplatin and paclitaxel in head and neck cancer cell lines*. Cancer Chemother Pharmacol, 2008. **62**(2): p. 305-13.
295. Whiteside, T.L., *Immunobiology of head and neck cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2005. **24**(1): p. 95-105.
296. Saito, Y., et al., *Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(3): p. 275-80.
297. Wilson, A., et al., *Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair*. Cell, 2008. **135**(6): p. 1118-29.
298. Ali, A.M., et al., *Determining circulating endothelial cells using CellSearch system during preoperative systemic chemotherapy in breast cancer patients*. Eur J Cancer, 2011. **47**(15): p. 2265-72.
299. Dalerba, P., R.W. Cho, and M.F. Clarke, *Cancer stem cells: models and concepts*. Annu Rev Med, 2007. **58**: p. 267-84.
300. Desai, R.S., et al., *Immunohistochemical expression of CD34 for characterization and quantification of mucosal vasculature and its probable role in malignant*

- transformation of atrophic epithelium in oral submucous fibrosis*. Oral Oncol, 2010. **46**(7): p. 553-8.
301. Chikamatsu, K., et al., *Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Head Neck, 2011. **33**(2): p. 208-15.
302. Hu, T., et al., *Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis*. Cancer Res, 2008. **68**(16): p. 6533-40.
303. Cantz, T., et al., *Absence of OCT4 expression in somatic tumor cell lines*. Stem Cells, 2008. **26**(3): p. 692-7.
304. Tsuchida, R., et al., *Cisplatin treatment increases survival and expansion of a highly tumorigenic side-population fraction by upregulating VEGF/Flt1 autocrine signaling*. Oncogene, 2008. **27**(28): p. 3923-34.
305. Wang, X.Q., et al., *Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP-binding cassette G2 pathway*. Hepatology, 2010. **52**(2): p. 528-39.
306. Suo, G., et al., *Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(4): p. 1047-51.
307. Heider, K.H., et al., *CD44v6: a target for antibody-based cancer therapy*. Cancer Immunol Immunother, 2004. **53**(7): p. 567-79.
308. Tjink, B.M., et al., *A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(20 Pt 1): p. 6064-72.
309. Riechelmann, H., et al., *Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2008. **44**(9): p. 823-9.

7 Abbildungsverzeichnis

Nr.	Abbildungstitel	Seite
1	Physiologische Funktion der von T-Helfer-Zellen sezernierten Zytokine	6
2	Auswahl HNSCC-relevanter Zytokine mit ihren Funktionen im Mikromilieu	7
3	Stochastisches versus hierarchisches Modell der Heterogenität von Tumoren	12
4	Bestandteile der Tumorstammzellnische	14
5	Kreislauf der Entstehung von Tumorrezidiven nach der Tumorstammzelltheorie	25
6	Prinzip der Zellzahl- sowie Vitalitätsbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer	37
7	Auswertung des <i>Human Pluripotent Stem Cell Array Kit</i>	46
8	Konzentrations-Effekt-Kurven unter 5-Fluorouracilbehandlung am Beispiel der HNSCC-Zelllinie PCI-I	48
9	Konzentrations-Effekt-Kurven nach 48-stündiger Cisplatinbehandlung am Beispiel der beiden HNSCC-Primärtumorzelllinien BHY und PCI-I	49
10	Konzentrations-Effekt-Kurven nach 48-stündiger Paclitaxelbehandlung am Beispiel der Zelllinien UT-SCC 60A/B	50
11	Zytokinsekretion unter 5-Fluorouracilbehandlung	54
12	Zytokinsekretion des Zytokins TNF- α von den HNSCC-Zelllinien PCI-I und UT-SCC 74B unter 5-Fluorouracilbehandlung	55
13	Zytokinsekretion unter Cisplatinbehandlung	56
14	Zytokinsekretion des Zytokins TNF- α der HNSCC-Zelllinien PCI-I und UT-SCC 74B unter Cisplatinbehandlung	58
15	Zytokinsekretion unter Paclitaxelbehandlung	59
16	FACS-Analyse zur Charakterisierung von potentiellen Tumorstammzellmarkern der CD-Nomenklatur in permanenten HNSCC-Zelllinien	61
17	FACS-Analyse zur Charakterisierung von potentiellen Tumorstammzellmarkern des Wnt-Signalwegs in permanenten HNSCC-Zelllinien	62
18	<i>Human Pluripotent Stem Cell Array</i> zur Identifizierung von potentiellen Tumorstammzellmarkern embryonalen Ursprungs in permanenten HNSCC-Zelllinien	64
19	Immunhistologischer Nachweis von Oct-4 am Beispiel der Zelllinie UT-SCC 60B	65
20	FACS-Identifizierung von Oct-4 am Beispiel der Zelllinie UT-SCC 60B	66
21	FACS-Analyse der Oct-4-Expression in permanenten HNSCC-Zelllinien	66
22	Doppelfärbung von Oct-4 mit FZD7, CD44 und CD59 in der FACS-Analyse am Beispiel der Zelllinie UT-SCC 60B	69
23	Immunhistologischer Nachweis einer Coexpression von Oct-4 und Nanog am Beispiel der Zelllinie UT-SCC 12B	70
24	FACS-Analyse zur Charakterisierung von potentiellen Tumorstammzellmarkern der CD-Nomenklatur in HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe	72
25	FACS-Analyse zur Charakterisierung von potentiellen Tumorstammzellmarkern des Wnt-Signalwegs in HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe	73
26	Proteome Profiler™ Array zur Identifizierung von potentiellen Tumorstammzellmarkern embryonalen Ursprungs in HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe	75

Fortsetzung des Abbildungsverzeichnisses auf der folgenden Seite

Nr.	Abbildungstitel	Seite
27	Immunhistologischer Nachweis von Oct-4 A am Beispiel des Tumors T601	77
28	FACS-Analyse zur Identifizierung von Oct-4 am Beispiel des soliden HNSCC-Tumors T951	77
29	FACS-Analyse der Oct-4-Expression in HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeproben	78
30	Doppelfärbung von Oct-4 mit FZD7, CD44 und CD59 in der FACS-Analyse am Beispiel des soliden HNSCC-Tumors T951	80
31	Konzentrations-Effekt-Kurven der HNSCC-Zelllinie PCI-I nach einer 48-stündigen in-vitro-Chemotherapie mit 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel	83
32	FACS-Analyse von Oct-4 vor sowie nach in-vitro-Chemotherapie mit 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel am Beispiel der HNSCC-Zelllinie PCI-I	84
33	Prozentuale Oct-4-Expressionprofile vor sowie nach in-vitro-Chemotherapie mit 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel am Beispiel der HNSCC-Zelllinie PCI-I	84
34	Kreislauf der Entstehung von Tumorrezidiven nach der Tumorstammzelltheorie bei HNSCC-Zelllinien anhand Oct-4 ⁺ /FZD7 ⁺ - potentieller Tumorstammzellen	100

8 Tabellenverzeichnis

Nr.	Tabellentitel	Seite
1	Allgemeine UICC-Einteilung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches	2
2	Aktuelle chemotherapeutische Behandlungsstrategien von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches	3-4
3	HNSCC-relevante Zytokine mit ihren zugeschriebenen Funktionen	8
4	Vergleich der Eigenschaften von Gewebestammzellen und Tumorstammzellen	11
5	Verwendete Laborgeräte	27
6	Verwendete Software	28
7	Verwendete Materialien	28
8	Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medien	29
9	Zellkulturmedium und Zusätze für adhärente Zellen	30
10	Zellkulturmedium und Zusätze für Primärkulturen	30
11	Einfriermedium für Zelllinien und Primärkulturen	30
12	Verwendete Puffer und Lösungen	31
13	Verwendete Kits	31
14	Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie	32
15	Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie	32
16	Verwendete permanente HNSCC-Zelllinien	33
17	Verwendete Nasenmuschelgewebeproben	34
18	Verwendete HNSCC-Gewebeproben	34
19	Abgrenzung vitaler Zellen, Apoptose und Nekrose in Abhängigkeit von der Annexin/PI-Färbung	42
20	Aufbau des <i>Human Pluripotent Stem Cell Array Kit</i>	44
21	IC ₅₀ - und IC ₉₀ -Werte von acht HNSCC-Zelllinien unter 5-Fluorouracilbehandlung	48
22	IC ₅₀ - und IC ₉₀ -Werte von acht HNSCC-Zelllinien unter Cisplatinbehandlung	49
23	IC ₅₀ - und IC ₉₀ -Werte von acht HNSCC-Zelllinien unter Paclitaxelbehandlung	50
24	Nachweisbarkeit von Zytokinen in den untersuchten HNSCC-Zelllinienüberständen	52
25	Zytokinsekretion von permanenten HNSCC-Zelllinien nach 144 stündiger Inkubation im Wachstumsmedium (DMEM)	53
26	Expressionsprofil potentieller Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur in permanenten HNSCC-Zelllinien	61
27	Expressionsprofil potentieller Tumorstammzellmarker des Wnt-Signalwegs in permanenten HNSCC-Zelllinien	63
28	Expressionsprofil potentieller Tumorstammzellmarker embryonalen Ursprungs in permanenten HNSCC-Zelllinien	64
29	Expressionsprofil des potentiellen Tumorstammzellmarkers Oct-4 in permanenten HNSCC-Zelllinien	67
30	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman [r_s] von Oct-4 mit anderen potentiellen Tumorstammzellmarkern bei permanenten HNSCC-Zelllinien	68

Fortsetzung des Tabellenverzeichnisses auf der folgenden Seite

Nr.	Tabellentitel	Seite
31	Expressionsprofil potentieller Tumorstammzellmarker der CD-Nomenklatur in HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe	72
32	Expressionsprofil potentieller Tumorstammzellmarker des Wnt-Signalwegs an soliden HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe	74
33	Expressionsprofil potentieller Tumorstammzellmarker embryonalen Ursprungs von HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe	76
34	Expressionsprofil des potentiellen Tumorstammzellmarkers Oct-4 in HNSCC-Primärtumor- und Nasenmuschelgewebeprobe	78
35	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman [r_s] von Oct-4 mit anderen potentiellen Tumorstammzellmarkern bei soliden Tumoren	79
36	Veränderungen des Expressionsprofils der Stammzellmarker Oct-4 und FZD7 unter in-vitro-Chemotherapie am Beispiel der Zelllinie PCI-I	85

Danksagung

An dem Gelingen dieser Dissertationsarbeit haben viele verschiedene Menschen mitgewirkt, denen ich nun folgend ein Dankeschön gegenüber aussprechen möchte:

Zuerst möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg für die Möglichkeit der Promotion in Ihrer Forschungseinrichtung, der Überlassung des Dissertationsthemas sowie den vielen konstruktiven Diskussionen und Anregungen Ihrerseits herzlich bedanken.

Des Weiteren gebührt ein außerordentliches Dankeschön Herrn Dr. rer. nat. Ralph Pries, der mich während der gesamten Arbeit eng betreut und vorbildlich unterstützt hat. Ohne seine unzähligen Ratschläge sowie seinem schier endlosen Optimismus wäre eine Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein besonderes Dankschön gilt meiner Mitdotorandin Ann-Christin Pfannerstill für die sehr gute Zusammenarbeit, die moralische Unterstützung sowie die vielen angenehmen Stunden während der Labortätigkeit. Ihr technisches Wissen, Ihre produktiven Ideen und zahlreichen Hilfestellungen haben in nicht unerheblichem Umfang zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Ferner will ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Barbara Wollenberg für die freundliche Aufnahme in das Team, die gute Arbeitsatmosphäre sowie vielfältigen Unterstützungen bedanken. Besonders Frau Dr. rer. nat. Sandra Wulff, Frau Dr. rer. nat. Christine Riebe, Birgit Hüsing, Brigitte Wollmann und Franziska Fogg möchte ich für Ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung herzlich danken.

Christian Hoverath will ich zudem einen Dank für die freundschaftliche Unterstützung sowie die kritische Revision des vorläufigen Manuskriptes dieser Arbeit aussprechen.

Mein größter Dank jedoch gilt meinen Eltern, die mich in jeglichen Lebenslange immer unterstützt und mir beigestanden haben. Ohne Sie wäre ein Abschluss des Studiums sowie der vorliegenden Dissertationsarbeit nie möglich gewesen. Danke.

Curriculum Vitae

Persönliche Informationen

Name Stefan Reers
Geburtstag 06. November 1981
Geburtsort Bottrop



Hochschulstudium

10/2004 – 04/2011 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck, Abschluss: Staatsexamen
10/2008 – 03/2009 Forschungssemester im Rahmen der Promotionsarbeit
02/2010 – 01/2011 PJ-Tertiale: Anästhesiologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz; Chirurgie sowie Innere Medizin, Medizinische Kliniken II und III, UKSH, Campus Lübeck
Seit 10/2012 Postgradueller Fernstudiengang „Master of Health Business Administration“ an der Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg

Beruflicher Werdegang

Seit 10/2011 Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik II (Klinik für Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin), Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Direktor: Herr Prof. Dr. med. H. Schunkert

Qualifikationen

10/2012 Echokardiographie Grundkurs
01/2013 – 03/2013 Schrittmacher- und ICD-Sachkundenachweis
11/2013 Zusatzzertifikat Ambient Assisted Living (AAL)

Dissertation

08/2007 – 11/2013 „Einfluss einer in-vitro-Chemotherapie auf die Zytokin- und Stammzellproteinexpression von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches“, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, UK S-H, Campus Lübeck, Direktorin: Prof. Dr. med. B. Wollenberg

Publikationen

Reers S, Pfannerstill AC, Maushagen R, Rades D, Pries R, Wollenberg B: Cytokine Changes In Response To Radio-/chemotherapeutic Treatment In Head And Neck cancer, Anticancer Res. 2013 Jun;33(6):2481-9.
Reers S, Pfannerstill AC, Maushagen R, Pries R, Wollenberg B: Stem cell profiling in head and neck cancer and identification of an Oct-4 expressing subpopulation with properties of chemoresistance, Submitted for publication
Maushagen R, Reers S, Pfannerstill AC, Pries R, Wollenberg B: Regulation of Caspase mediated Apoptosis in Head and Neck Cancer, Submitted for publication
Naumann A, Reers S, Hagge AC, Pries R, Wollenberg B: Stammzellcharakteristika bei Polyposis nasi. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., 20.05. 2009- 24.05.2009, Rostock
Reers S, Hagge AC, Pries R, Wollenberg B: Die Rolle von Oct-4 und das Verhalten von Oct-4-positiven Zellen unter in-vitro-Chemotherapie in Kopf-Hals-Karzinomen. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., 12.05.2010 - 16.05.2010, Wiesbaden
Hagge AC, Reers S, Pries R, Wollenberg B: Zytokinsekretionsprofile von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches unter Radiatio-/Chemotherapie. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., 12.05. 2010- 16.05.2010, Wiesbaden