

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
(Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. C.F. Hess)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Analyse der Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren in HNO-
Tumorzellen unter Radiochemotherapie

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Georg-August-Universität zu Göttingen
der Medizinischen Fakultät

vorgelegt von
Claudia Anna Holzer

aus
Bad Mergentheim

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: PD Dr. Hendrik Wolff

Ko-Referent: Prof. Dr. Martin Canis

Drittreferent: Prof. Dr. Rainer Mausberg

Datum der mündlichen Prüfung: 13.03.2017

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Pathologie, Inzidenz und Risikofaktoren von SCCHN	1
1.2 Stadieneinteilung und Therapie von SCCHN.....	3
1.2.1 Wirkungen der Chemotherapie.....	5
1.2.2 Wirkungen der Strahlentherapie	6
1.2.3 Wirkung der kombinierten Radiochemotherapie	8
1.3 Chemokinliganden und Chemokinrezeptoren	9
1.3.1 Chemokinwirkung auf Zellen in vivo.....	11
1.3.2 Chemokinwirkung auf SCCHN.....	12
1.4 Ziel der Untersuchung	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Zellen	17
2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen	17
2.1.3 Primer	19
2.1.4 Laborkits.....	19
2.1.5 Geräte.....	20
2.1.6 Zubehör.....	20
2.1.7 Software.....	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Zellkulturen und Zellhaltung	23
2.2.2 Ausimpfen von Zellkulturen.....	23
2.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen	24
2.2.4 Bestrahlungsaufbau und -technik	25
2.2.5 Koloniebildungsversuche	25
2.2.6 Statistische Auswertung der Koloniebildungsversuche	26
2.2.7 Zellkulturansätze für RNA-Analytik	26
2.2.8 Isolierung von RNA.....	27
2.2.9 Umschreiben von RNA zu cDNA	28
2.2.10 Messung der cDNA mittels <i>Real-time</i> PCR	29
2.2.11 Statistische Auswertung der Genexpression	30

3. Ergebnisse	31
3.1 Cisplatin-Effekte.....	31
3.1.1 Cisplatin-Effekt im Koloniebildungsversuch	31
3.1.2 Cisplatin-Effekt auf die Genexpression.....	32
3.1.2.1 CXCR4- und CXCL12-Expression	32
3.1.2.2 CXCR1-, CXCL1- und CXCL3-Expression	36
3.1.2.3 CCR6- und CCL20-Expression	42
3.1.2.4 CCR7-Expression	48
3.2 Einfluss der Radiochemotherapie auf das Koloniebildungsverhalten.....	51
3.2.1 Koloniebildungsversuch BHY	51
3.2.2 Koloniebildungsversuch BW-225	52
3.2.3 Koloniebildungsversuch DF-19.....	53
3.2.4 Koloniebildungsversuch FaDuDD	54
3.2.5 Koloniebildungsversuch GR-145-I.....	55
3.2.6 Koloniebildungsversuch GR-145-II	56
3.2.7 Koloniebildungsversuch HaCat.....	57
3.2.8 Koloniebildungsversuch ZMK-1	58
3.3 Expression der Chemokinliganden und –rezeptoren unter Radiochemotherapie.....	59
3.3.1 CXCR4- und CXCL12-Expression	59
3.3.2 CXCR1-, CXCL1- und CXCL3-Expression	63
3.3.3 CCR6- und CCL20-Expression	73
3.3.4 CCR7	79
4. Diskussion	82
4.1 Cisplatin-Effekt	82
4.1.1 Cisplatin-Effekt im Koloniebildungsversuch	82
4.1.2 Cisplatin-Effekt auf die Genexpression.....	83
4.1.2.1 CXCR4- und CXCL12-Expression	83
4.1.2.2 CXCR1-, CXCL1- und CXCL3-Expression	84
4.1.2.3 CCR6- und CCL20-Expression	85
4.1.2.4 CCR7-Expression	85
4.2 Einfluss der Radiochemotherapie.....	86
4.2.1 Einfluss der Radiochemotherapie auf die Koloniebildungsversuche	86
4.2.2 Einfluss der Radiochemotherapie auf die Genexpression	87
4.2.2.1 CXCR4- und CXCL12-Expression	87
4.2.2.2 CXCR1-, CXCL1- und CXCL3-Expression	88
4.2.2.3 CCR6- und CCL20-Expression	89
4.2.2.4 CCR7-Expression	90
5. Zusammenfassung	91
6. Literaturverzeichnis	93

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei SCCHN.....	2
Tab. 2: Einteilung des Tumorstadiums nach UICC.....	3
Tab. 3: Chemokinrezeptoren mit bindenden Liganden.	11
Tab. 4: Untersuchte Chemokine und Chemokinrezeptoren.....	15
Tab. 5: Zelllinien und Herkunft.....	17
Tab. 6: Medien, Puffer und Lösungen.....	17
Tab. 7: <i>Primer</i>	19
Tab. 8: Laborkits.	19
Tab. 9: Geräte.	20
Tab. 10: Zubehör.	20
Tab. 11: Software.	22
Tab. 12: Ausgeimpfte Zellzahl pro Flasche.....	25
Tab. 13: Zusammensetzung des Mastermix zum Umschreiben von RNA zu cDNA.	28
Tab. 14: Untersuchte Chemokine und Chemokinrezeptoren.....	30
Tab. 15: Relatives Überleben der Zellen nach alleiniger Cisplatin-Therapie.	32
Tab. 16: Werte der Koloniebildungstests von BW-225.	52
Tab. 17: Werte der Koloniebildungstests von DF-19.....	53
Tab. 18: Werte der Koloniebildungstests von FaDuDD.....	54
Tab. 19: Werte der Koloniebildungstests von GR-145-I.....	55
Tab. 20: Werte der Koloniebildungstests von GR-145-II.	56
Tab. 21 Werte der Koloniebildungstests von HaCat.	57
Tab. 22: Werte der Koloniebildungstests von ZMK-1.....	58

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Therapieoptionen bei geplanter kurativer Therapie bei SCCHN.	4
Abb. 2: Strukturformel von Cisplatin.	5
Abb. 3: Darstellung der Cisplatin-Wirkung auf das Koloniebildungsverhalten.	31
Abb. 4: Expression von CXCR4 bei der Zelllinie BW-225 unter Cisplatin-Therapie.	33
Abb. 5: Expression von CXCR4 bei der Zelllinie FaDuDD unter Cisplatin-Therapie.	33
Abb. 6: Expression von CXCR4 bei der Zelllinie ZMK-1 unter Cisplatin-Therapie.	34
Abb. 7: Expression von CXCL12 bei der Zelllinie BW-225 unter Cisplatin-Therapie.	35
Abb. 8: Expression von CXCL12 bei der Zelllinie DF-19 unter Cisplatin-Therapie.	35
Abb. 9: Expression von CXCL12 bei der Zelllinie GR-145-I unter Cisplatin-Therapie.	36
Abb. 10: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie BHY unter Cisplatin-Therapie.	37
Abb. 11: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie BW-225 unter Cisplatin-Therapie.	37
Abb. 12: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie DF-19 unter Cisplatin-Therapie.	38
Abb. 13: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie FaDuDD unter Cisplatin-Therapie.	38
Abb. 14: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie GR-145-I unter Cisplatin-Therapie.	39
Abb. 15: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie GR-145-II unter Cisplatin-Therapie.	39
Abb. 16: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie HaCat unter Cisplatin-Therapie.	40
Abb. 17: Expression von CXCL3 bei der Zelllinie BHY unter Cisplatin-Therapie.	41
Abb. 18: Expression von CXCL3 bei der Zelllinie FaDuDD unter Cisplatin-Therapie.	41
Abb. 19: Expression von CXCL3 bei der Zelllinie ZMK-1 unter Cisplatin-Therapie.	42
Abb. 20: Expression von CCR6 bei der Zelllinie BHY unter Cisplatin-Therapie.	43
Abb. 21: Expression von CCR6 bei der Zelllinie GR-145-II unter Cisplatin-Therapie.	43
Abb. 22: Expression von CCL20 bei der Zelllinie BHY unter Cisplatin-Therapie.	44
Abb. 23: Expression von CCL20 bei der Zelllinie BW-225 unter Cisplatin-Therapie.	45
Abb. 24: Expression von CCL20 bei der Zelllinie DF-19 unter Cisplatin-Therapie.	45
Abb. 25: Expression von CCL20 bei der Zelllinie FaDuDD unter Cisplatin-Therapie.	46
Abb. 26: Expression von CCL20 bei der Zelllinie GR-145-I unter Cisplatin-Therapie.	46
Abb. 27: Expression von CCL20 bei der Zelllinie GR-145-II unter Cisplatin-Therapie.	47
Abb. 28: Expression von CCL20 bei der Zelllinie HaCat unter Cisplatin-Therapie.	47
Abb. 29: Expression von CCL20 bei der Zelllinie ZMK-1 unter Cisplatin-Therapie.	48
Abb. 30: Expression von CCR7 bei der Zelllinie BHY unter Cisplatin-Therapie.	49
Abb. 31: Expression von CCR7 bei der Zelllinie DF-19 unter Cisplatin-Therapie.	49
Abb. 32: Expression von CCR7 bei der Zelllinie HaCat unter Cisplatin-Therapie.	50

Abb. 33: Expression von CCR7 bei der Zelllinie ZMK-1 unter Cisplatin-Therapie.	50
Abb. 34: Koloniebildungstest BW-225.	52
Abb. 35: Koloniebildungstest DF-19.	53
Abb. 36: Koloniebildungstest FaDuDD.	54
Abb. 37: Koloniebildungstest GR-145-I.	55
Abb. 38: Koloniebildungstest GR-145-II.	56
Abb. 39: Koloniebildungstest HaCat.	57
Abb. 40: Koloniebildungstest ZMK-1.	58
Abb. 41: Darstellung der Expression von CXCR4 bei der Zelllinie BW-225.	60
Abb. 42: Darstellung der Expression von CXCR4 bei der Zelllinie FaDuDD.	60
Abb. 43: Darstellung der Expression von CXCR4 bei der Zelllinie ZMK-1.	61
Abb. 44: Darstellung der Expression von CXCL12 bei der Zelllinie BW-225.	62
Abb. 45: Darstellung der Expression von CXCL12 bei der Zelllinie DF-19.	62
Abb. 46: Darstellung der Expression von CXCL12 bei der Zelllinie GR-145-I.	63
Abb. 47: Darstellung der Expression von CXCR1 bei der Zelllinie HaCat.	64
Abb. 48: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie BHY.	65
Abb. 49: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie BW-225.	66
Abb. 50: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie DF-19.	66
Abb. 51: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie FaDuDD.	67
Abb. 52: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie GR-145-I.	67
Abb. 53: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie GR-145-II.	68
Abb. 54: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie HaCat.	68
Abb. 55: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie BHY.	69
Abb. 56: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie DF-19.	70
Abb. 57: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie FaDuDD.	70
Abb. 58: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie GR-145-I.	71
Abb. 59: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie GR-145-II.	71
Abb. 60: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie HaCat.	72
Abb. 61: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie ZMK-1.	72
Abb. 62: Darstellung der Expression von CCR6 bei der Zelllinie BHY.	73
Abb. 63: Darstellung der Expression von CCR6 bei der Zelllinie GR-145-II.	74
Abb. 64: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie BHY.	75
Abb. 65: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie BW-225.	75
Abb. 66: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie DF-19.	76

Abb. 67: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie FaDuDD.....	76
Abb. 68: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie GR-145-I.....	77
Abb. 69: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie GR-145-II.	77
Abb. 70: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie HaCat.	78
Abb. 71: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie ZMK-1.	78
Abb. 72: Darstellung der Expression von CCR7 bei der Zelllinie BHY.....	79
Abb. 73: Darstellung der Expression von CCR7 bei der Zelllinie DF-19.....	80
Abb. 74: Darstellung der Expression von CCR7 bei der Zelllinie HaCat.	80
Abb. 75: Darstellung der Expression von CCR7 bei der Zelllinie ZMK-1.....	81

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
bspw.	beispielsweise
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
cm ²	Quadratcentimeter
CP	Cisplatin
Ct	<i>cycle threshold</i>
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintraacetic acid
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Fa.	Firma
FKS	fetales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPRT1	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
IP3	Inositoltriphosphat
Kap.	Kapitel
kV	Kilovolt
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	Millimolar

n.a.	nicht analysiert
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PIP2	Phosphatidylinositol(4,5)Bisphosphonate
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RCT	Radiochemotherapie
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Radiotherapie
s	Sekunde
s.	siehe
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i>
SCCHN	Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses)
sog.	sogenannt
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TUBB	<i>tubulin beta class I</i>
u.a.	unter anderem
UBC	Ubiquitin C
UK	United Kingdom
upm	Umdrehungen pro Minute
µl	Mikroliter
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
°C	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1 Pathologie, Inzidenz und Risikofaktoren von SCCHN

Die SCCHN (*squamous cell carcinoma of the head and neck*) umfassen eine Gruppe maligner Tumoren im Hals-Kopf-Bereich, insbesondere im Bereich der Mundhöhle, des Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx, Larynx und der Trachea. Diese bestehen zu über 90% aus Plattenepithelzellen und werden daher als SCCHN zusammengefasst.

In Deutschland stellen sie etwa 5% aller bösartigen Neubildungen im Kopf- und Halsbereich dar; die 5-Jahres-Prävalenz liegt bei 35.000 Erstdiagnosen. Weltweit gibt es ungefähr 500.000 Neuerkrankungen pro Jahr, wobei Männer fünfmal häufiger betroffen sind als Frauen (Krebs in Deutschland 2010).

Hauptursache für eine solche maligne Entartung stellen immer noch das Tabakrauchen und der Alkoholkonsum, vor allem in Kombination, dar (Hakenwerth et al. 2011). Weitere Risikofaktoren sind mangelnde Mundhygiene, schlecht sitzende Zahnprothesen mit resultierender dauerhafter Reizung der Schleimhaut, Asbest-Exposition und eine Infektion mit humanen Papilloma Viren (HPV) oder Epstein-Barr-Viren (EBV). Die Infektion mit diesen Viren lässt die Inzidenz von SCCHN ansteigen, bietet aber auch relativ hohe Heilungschancen (Brockstein 2011).

Auch auf Genebene kann man bei SCCHN spezielle Sequenzen und Mutationen nachweisen, die zur Entstehung beitragen können. Insbesondere die Gene *iRNA499*, *TNF α* , *TNF β* , *NFKB1*, *NFKBIA*, *CRYAB*, *OGG1*, *CYP1B1* und *GSTM1* können zu einem erhöhten Risiko für SCCHN führen. (Brunotto et al. 2014).

Die Diagnose erweist sich als besonders schwierig, da sich die Tumoren auch in fortgeschrittenen Stadien mit wenigen Symptomen präsentieren. Dadurch können diese Tumoren oft erst in späten Stadien diagnostiziert werden. Als Frühsymptome treten Schluckbeschwerden oder Heiserkeit auf.

Die Metastasierung von SCCHN erfolgt hauptsächlich lymphogen; hämatogene Metastasierung findet sich nur bei 20-30% aller Patienten, wobei dann besonders Lunge, Leber und Knochen betroffen sind.

Für Männer beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei dieser Tumorart 36-45%, bei Frauen liegt sie bei 50-63% (Krebs in Deutschland 2012). Dabei hängt die Überlebenswahrscheinlichkeit zu einem großen Teil von der fortschreitenden Ausbreitung des Karzinoms ab (s. Tab. 1).

Tab. 1: 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei SCCHN

	5-Jahres-Überleben (%)
Lokalisierte Tumoren (Stadium I und II)	60-90
Fortgeschrittene Tumoren (Stadium III und IV)	<30

(Lefebvre 2005)

1.2 Stadieneinteilung und Therapie von SCCHN

Die Therapie von SCCHN richtet sich hauptsächlich nach dem jeweiligen Tumorstadium. Die Einteilung wird nach der TNM-Klassifikation und der UICC (*Union for International Cancer Control*) vorgenommen (s. Tab. 2).

Tab. 2: Einteilung des Tumorstadiums nach UICC

Stadium I	T 1	N 0	M 0	RT oder OP
Stadium II	T 2	N 0	M 0	
Stadium III	T 3	N 0	M 0	R 0: adjuvante RT
	T 1-3	N 1	M 0	R 1: adjuvante RCT
Stadium IV A	T 1-3	N 2	M 0	inoperabel: RCT oder RT+Cetuximab
	T 4a	N 0-2	M 0	
Stadium IV B	T 4b	jedes N	M 0	
	jedes T	N 3	M 0	
Stadium IV C	jedes T	jedes N	M 1	RCT oder RT+Cetuximab
Tumorprogress				CT oder CT+Cetuximab

T: Tumorgröße T 1-3 zunehmende Tumorgröße, je nach Primärtumor

T 4 Infiltration in Nachbarstrukturen

4a mittelgradig fortgeschritten

4b deutlich fortgeschritten

N: Lymphknotenbefall N 0 kein Lymphknotenbefall

N1-3 zunehmender Lymphknotenbefall

M: Metastasen M 0 keine bekannten Fernmetastasen

M 1 Fernmetastasen

R: Tumorresektion R 0 tumorfreie Ränder

R 1 mikroskopischer Tumorrest

RT=Radiotherapie, CT=Chemotherapie, RCT=Radiochemotherapie, OP=chirurgische Therapie

(Grégoire et al. 2010)

Grundlage der Therapie sind die Chirurgie und die Strahlentherapie („Stahl und Strahl“), bei höheren Stadien aber auch die Chemotherapie bzw. eine Radiochemotherapie oder eine Kombination der drei verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten (Siddiqui et al. 2011).

Weitere Aspekte wie der Allgemeinzustand und eventuell vorangegangene Therapieversuche oder Begleiterkrankungen des Patienten sind bei der Therapieplanung zu beachten, um für den Patienten eine maximale Lebensqualität zu erreichen.

Kleine Tumoren (maximal Stadium II) können allein operativ bzw. mittels Radiotherapie behandelt werden, wobei beide Therapieoptionen bezüglich der Heilungschancen als gleichwertig anzusehen sind (Lefebvre 2005). Bei lokal weit fortgeschrittenem, inoperablem Befund ist eine kombinierte Radiochemotherapie indiziert, die immer noch eine kurative Therapieaussicht bieten kann (Urba 1999; Tschiesner et al. 2012; Brockstein 2011).

Liegt eine palliative Situation vor, kommt eine alleinige Chemotherapie zum Einsatz.

Bei der chirurgischen Therapie wird eine R0-Resektion, also eine vollständige makro- und mikroskopische Tumorentfernung, angestrebt. Häufig wird dabei zusätzlich eine sogenannte *Neck-Dissection*, eine radikale Ausräumung aller Lymphknoten im Halsbereich, nötig. Diese wird durchgeführt, um gesicherte Lymphknotenmetastasen oder vermutete Mikrometastasen komplett zu entfernen und damit eine weitere Streuung des Tumors zu verhindern (St John et al. 2006).

Besonders wichtig bei der Therapie von SCCHN-Tumoren ist die Funktionserhaltung umliegender Strukturen. da wichtige Organe hier sehr eng topografisch verbunden sind.

Insbesondere bei der Kombination der Strahlen- mit der Chemotherapie kommt es bei fortgeschrittenen inoperablen Tumoren zu guten Ergebnissen. In den folgenden Abschnitten soll nun genauer auf die Wirkungen der beiden Therapien eingegangen werden.

Inzwischen wurden auch neuartige Biologicals, wie die EGFR-Antikörpertherapie mit Cetuximab, zur Therapie der lokal fortgeschrittenen, metastasierten SCCHN-Tumoren und der Rezidive zugelassen (Christy und Bojan 2013).

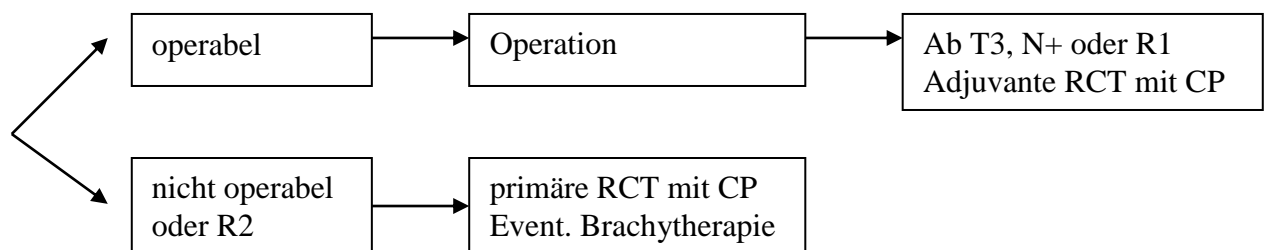


Abb. 1: Therapieoptionen bei geplanter kurativer Therapie bei SCCHN
T3=Tumorgröße, N+=Lymphknotenbefall, R1=mikroskopischer Tumorrest,
R2=makroskopischer Tumorrest
RCT= Radiochemotherapie, CP=Cisplatin

1.2.1 Wirkungen der Chemotherapie

Eine alleinige Chemotherapie ist zurzeit nur bei einer palliativen Situation die Therapie der Wahl. Dabei ist die Kombinationstherapie aus Cisplatin und 5-Fluoruracil oder einem Taxan einer Monotherapie überlegen (Lefebvre 2005). Jedoch kann bei dieser Therapie nur ein minimaler Gewinn an Überlebenszeit beobachtet werden, dafür aber ein enormer Anstieg der Lebensqualität (Brockstein 2011).

Weitere Chemotherapeutika, die in der palliativen Behandlung von SCCHN zum Einsatz kommen, sind Carboplatin, Methotrexat, Etoposid, Anthrazykline und Bleomycin. Neuere Substanzen wie Gemcitabin, Topotecan, Capecitabin, Oxaliplatin und EGF-R-Inhibitoren (Epidermal-Growth-Factor-Rezeptoren) sind in der Wirkung vergleichbar (Kua et al. 2013; de Mello et al. 2014).

Bei der Wirkung von Zytostatika gibt es unterschiedliche Ansatzpunkte: Schäden entstehen durch die Bildung eines Platin-DNA-Addukts, durch Cross-Linking der DNA, Bindung an die DNA, Übertragung von Alkylgruppen und andere Vorgänge, die letztendlich zu einer Hemmung der Replikationsfähigkeit der DNA und DNA-Strangbrüchen führt und zusätzlich direkt toxische Wirkung zeigt.

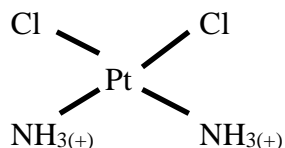


Abb. 2: Strukturformel von Cisplatin
(Synonym: cis-Diammindichloroplatin(II), $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$)
(Ernst 2010)

Cisplatin und Carboplatin, die häufig in der Therapie von SCCHN eingesetzt werden und deren Wirkungsstärke in etwa vergleichbar ist, gehören zur Gruppe der Platinanaloga (Gasparini et al. 1993). Cisplatin zählt heutzutage zu den Standardchemotherapeutika bei SCCHN in fortgeschrittenen Stadien (Lefebvre 2005).

Cisplatin besitzt Chlorliganden, die durch eine Konzentrationsdifferenz im umgebenden Gewebe durch Wassermoleküle ersetzt werden. Dadurch entsteht ein stark elektrophiler Aquakomplex, der die aktivierte Form der Verbindung darstellt. Durch die hohe Elektrophilie reagiert Cisplatin vor allem mit den DNA-Basen Guanin und Adenin.

Seine Wirkung entfaltet Cisplatin durch die Hemmung der DNA-Replikation, die durch Querverknüpfungen der DNA-Stränge (Intrastrang- und Interstrangquervernetzung) und Punktmutationen hervorgerufen wird. Des Weiteren führt Cisplatin zu einer Hemmung der DNA-Reparatur und der Telomeraseaktivität. Diese Vorgänge bewirken, dass die Zelle letztendlich die Apoptose, also den programmierten Zelltod, einleitet (Wild 2001).

Cisplatin bietet einen wichtigen Vorteil, da es, abgesehen von seinem emetogenen Potential, zu relativ geringen frühen und späten Nebenwirkungen führt und deswegen gerade bei Patienten mit fortgeschrittenem SCCHN, die einer palliativen Therapie zugeführt werden, eine verhältnismäßig gute Lebensqualität gewährleisten kann (Wolff et al. 2009). Weitere unerwünschte Anwendungswirkungen sind Schädigungen des Innenohrs und nephrotoxische Effekte, weswegen bei einer Cisplatin-haltigen Therapie gleichzeitig eine forcierte Diurese stattfinden sollte.

1.2.2 Wirkungen der Strahlentherapie

Eine Bestrahlung kann bei lokal begrenztem Hals-Kopf-Tumor ohne das Vorliegen von Metastasen als primäre und einzige Therapie durchgeführt werden. Zusätzlich wird die Radiotherapie prä- oder postoperativ zusätzlich zur chirurgischen Therapie eingesetzt.

Präoperativ durchgeführt wird die Strahlentherapie bei Tumoren, deren R0-Resektion nicht sicher gewährleistet werden kann oder bei ungünstiger Tumorage mit zu erwartenden funktionellen Beeinträchtigungen bei R0-Resektion. In solchen Situationen soll eine Radiotherapie zum *Down-Staging*, also zu einer Minderung des Tumorstadiums, führen.

Die postoperative Bestrahlung wird zur Sicherung der Tumorkontrolle bei mikro- und/ oder makroskopischen Resten, bei lokal sehr ausgedehnten Tumoren oder Lymphknotenmetastasen eingesetzt (Bissada et al. 2012; Qian et al. 2014).

Je nach Ausgangssituation wird die Gesamtdosis der Bestrahlung festgelegt; bei vorliegender R0-Situation (kein mikroskopischer oder makroskopischer Tumorrest, Exzision im Gesunden und Ganzen) wird eine Dosis von 50 Gy, bei R1-Situation (mikroskopischer Tumorrest) 60 Gy und bei einer R2-Situation (makroskopischer Tumorrest) 70 Gy gewählt. Zusätzlich sind die Höhe der

Gesamtdosis und deren Wirkung abhängig von Histologie, Tumorgröße und Sauerstoffversorgung des Tumors (Dragovic et al. 2011).

Durch die ionisierenden Strahlen werden DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche induziert. Einzel-Strangbrüche können von Reparaturenzymen der Zelle behoben werden, da sie auch bei gesunder, nicht behandelter DNA vorkommen; treten jedoch mehrere Brüche z.B. nach Bestrahlung auf, kann es zu fehlerhaften Reparaturen kommen (Dewey et al. 1995; Rothkamm und Löbrich 2002; Rothkamm und Löbrich 2003). Des Weiteren führt die Bestrahlung zu Basenschäden und zur Bildung von hochreaktiven Radikalen, die wiederum die DNA durch Bildung von alkali-labile-Stellen schädigen. Besonders empfindlich sind Zellen, die sich gerade in der Mitose- oder der G2-Phase des Zellzyklus befinden. Werden die Zellen in dieser Phase abgetötet, werden andere Zellen aus resistenteren Phasen rekrutiert und können bei der nächsten Bestrahlung geschädigt werden (*Redistribution*) (Dempke 2006).

Bei Schäden, die von den Reperaturenzymen der Zelle nicht mehr behoben werden können, kann eine Zelle das Protein p53 phosphorylieren und damit ihren eigenen programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten. P53 hat zusätzlich Einfluss auf das Chromatin, das die Lagerungsform der DNA mit Histonen im Zellkern darstellt. Durch ein verändertes p53 kommt es zu einer abgeänderten Chromatin-Lagerung und damit zu einer leichteren Anfälligkeit der DNA gegenüber der Strahlung (Dewey et al 1995; Böhnke et al. 2004; Eriksson und Stigbrand 2010).

Weiterhin kann die Bestrahlung zu einem Mitose-assoziierten Zelltod führen, wobei es durch die Strahlen zu Chromosomenschäden kommt und die Zellen die Mitose nicht beenden können. Diese Art von Zelltod ist auch die Hauptursache für die Entstehung von Nebenwirkungen. Dabei werden die Strahlenschäden, die den Untergang von Tumorzellen bewirken sollen, auch im normalen, gesunden Gewebe beobachtet. Die Unterteilung dieser unerwünschten Wirkungen erfolgt zwischen akuten Nebenwirkungen, die innerhalb der ersten sechs Wochen auftreten und sich meist vollständig zurückbilden, und häufig irreversiblen Spätfolgen.

Akute Nebenwirkungen können durch die starke Strahlensensibilität von schnell proliferierenden Geweben wie beispielsweise Schleimhäuten im Mund- und Rachenbereich herrühren. Dadurch kann es zu, durch ein Ödem verursachte, Schluckbeschwerden kommen, die eine parenterale Ernährung erforderlich

machen. Weiterhin kann es zu Hautbeschwerden, Mukositis und resultierender Soorbesiedlung kommen.

Als Spätfolge, die teilweise eine Latenz von Jahren haben können, kann sich das Geschmackempfinden ändern und z.T. bis zur Geschmacklosigkeit (Dysgeusie) führen. Spätfolgen sind meist irreversibel, da hierbei die Stammzellen der langsam proliferierenden Gewebe betroffen sind (Dempke 2006).

Weitere häufige therapieassoziierte Beschwerden sind Mundtrockenheit (Xerostomie) bei 50% aller bestrahlten Patienten, Zahnschädigungen, Verhärtungen des Subkutangewebes (Fibrose), gestörter Lymphabfluss mit resultierendem Lymphödem und Erythembildung (Yang et al. 2013).

Die Fähigkeit der Zellen, sich nach einer Bestrahlung mit subletaler Dosis wieder zu erholen, ist bei gesundem Gewebe deutlich besser als bei Tumorzellen. Um diesen Nebenwirkungen vorzubeugen, wird im klinischen Alltag eine fraktionierte Bestrahlung durchgeführt; in der Regel fünf Fraktionen pro Woche. Dadurch werden gleichzeitig die Zellen, die aus den resistenteren Phasen in die Mitose- oder G2-Phase nachgerückt sind, geschädigt und es kommt zur Schrumpfung des Tumors (Marples et al. 2004). Dieses Schrumpfen bewirkt wiederum eine bessere Oxygenierung der Tumorzellen, was wiederum eine höhere Strahlensensibilität hervorruft.

1.2.3 Wirkung der kombinierten Radiochemotherapie

Die kombinierte Therapie aus Bestrahlung mit 60-75 Gy (Bestrahlung des Primärtumors und des Lymphabflussgebietes) und zusätzlicher Gabe von Cisplatin (6 mg/d) gilt heutzutage als Standardtherapie in der Behandlung von SCCHN (Lefebvre 2005).

Cisplatin-Schäden entstehen durch die Bildung von Platin-DNA-Addukten oder *Cross-Links* mit der DNA (s. Kapp 1.2.1), wogegen strahleninduzierte Schäden neben DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB: *doublestrand breaks*) auch Einzelstrangbrüche (SSB: *single-strand breaks*), Basenschäden und alkali-labile Stellen umfassen (s. Kapp 1.2.2).

Bei der Kombination der beiden Therapien kommt es gehäuft zu Cisplatin- und strahlenbedingten DNA-Schäden in enger räumlicher Nähe, die einer Reparatur weniger zugänglich sind (Rave-Fränk et al. 2002).

Durch die Behandlung mit einem Zytostatikum wie Cisplatin kann eine Radiosensibilisierung der Zellen erreicht werden. Dadurch wird der Einsatz einer simultanen Radiochemotherapie besonders effektiv und führt zu einer deutlich höheren lokalen Tumorkontrolle und damit zu besseren Überlebensraten. Des Weiteren werden durch die synergistische Wirkung von Cisplatin und einer Radiotherapie eine kürzere Behandlungsdauer und eine Reduktion von Mikrometastasen erreicht. Allerdings ist bei der kombinierten Therapie auch ein erhöhtes Nebenwirkungsrisiko durch das vermehrte Ansprechen der Zellen, vor allem der schweren Akutnebenwirkungen, zu erwarten (Schmoll et al. 1997; Bernier et al. 2004; Palacios et al. 2013).

Insgesamt ergibt sich hieraus eine im Vergleich zu der alleinigen Radiotherapie bei der kombinierten Therapie eine deutliche Verbesserung der lokoregionalen Kontrolle sowie des krankheitsfreien Überlebens, jedoch keine oder eine nur schwache Verbesserung des Gesamtüberlebens (Bernier et al. 2004; Cooper et al. 2004; Huguenin et al. 2004).

Interessanterweise weisen Patienten, die eine Radiochemotherapie erhalten und mit hochgradigen Nebenwirkungen darauf reagieren, eine bessere Prognose als Patienten mit schwachen unerwünschten Anwendungswirkungen auf, da die Wirkung der Therapie auf das gesunde Gewebe der auf das Tumorgewebe entspricht (Wolff et al. 2010; Wolff et al. 2011a).

1.3 Chemokinliganden und Chemokinrezeptoren

Chemokine stellen eine Untergruppe der Zytokine dar. Sie sind kleine Signalproteine, die aus 75-125 Aminosäuren bestehen und eine Molmasse zwischen 8 bis 14 kDa aufweisen. Inzwischen konnten über 50 Chemokinliganden nachgewiesen werden, die an über 20 verschiedene Rezeptoren binden (Zlotnik und Yoshie 2012).

Durch einen Konzentrationsgradienten der Chemokine können Zellbewegungen, die so genannte Chemotaxis, ausgelöst werden, weswegen Chemokine eine starke Beteiligung an der Organentwicklung, Angiogenese und der Migration von Immunzellen innehaben (Siegenthaler und Blum 2006; Gerber et al. 2009).

Die Bildung der Chemokine erfolgt hauptsächlich durch die gleichen Zellen, auf die sie später auch wirken, also Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, Thrombozyten, T-Zellen, Stromazellen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen. Die Chemokine werden durch die Anzahl und die Position der Cysteinreste am Aminoterminus unterteilt. Dabei können vier Familien unterschieden werden:

- CC-Familie: die ersten beiden Cysteine liegen direkt hintereinander
- CXC-Familie: zwischen den ersten beiden Cysteinen liegt eine andere Aminosäure
- CX3C-Familie: zwischen den ersten beiden Cysteinen liegen drei andere Aminosäuren
- C-Familie: es liegt nur ein Cysteinrest am Aminoterminus vor (Zlotnik und Yoshie 2012).

Bei den ersten drei Chemokin-Familien liegen jeweils zwei, bei der vierten nur eine Disulfidbrücke vor. Parallel zu den Chemokin-Liganden werden auch die Rezeptoren in gleicher Weise eingeteilt.

Des Weiteren kann zwischen inflammatorischen (induzierbaren) und homöostatischen (konstitutive) Chemokinen unterschieden werden und einer zusätzlichen Gruppe, bei der die Chemokine keiner der oben genannten Gruppen zugeordnet werden konnten, häufig aber beide Eigenschaften aufweisen (Zlotnik und Yoshie 2012).

Tab. 3: Chemokinrezeptoren mit bindenden Liganden

Rezeptor	Ligand	Rezeptor	Ligand
CXCR1	CXCL6, CXCL8	CCR1	CCL3, CCL3L1, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL16, CCL23
CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8	CCR2	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CCL16
CXCR3	CXCL9, CXCL10, CXCL11	CCR3	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26, CCL28
CXCR4	CXCL12	CCR4	CCL17, CCL21
CXCR5	CXCL13	CCR5	CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL4L1, CCL5, CCL8
CXCR6	CXCL16	CCR6	CCL20
CXCR7	CXCL11, CXCL12	CCR7	CCL19, CCL21
XCR1	XCL1, XCL2	CCR8	CCL1
CX3CR1	CX3CL1	CCR9	CCL25
		CCR10	CCL27, CCL28

(Zlotnik und Yoshie 2012)

1.3.1 Chemokinwirkung auf Zellen *in vivo*

Inflammatorische Chemokine werden bei Entzündungen stärker exprimiert und unterstützen das Einwandern von Lymphozyten in die Lymphknoten, während die Gruppe der homöostatischen Chemokine bei der Erhaltung und der Entwicklung von Gewebe regulierend eingreifen. Zusätzlich zu der Funktion als Lymphozytenaktivatoren spielen Chemokine eine wichtige Rolle bei Wachstum und Differenzierung von Lymphozyten (Hedrick und Zlotnik 1996), der T-Zell-Entwicklung, Tumorwachstum und –metastasierung sowie der Angiogenese (Rossi und Zlotnik 2000; Zlotnik 2006a).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Zytokinen der CC- und der CXC-Familie untersucht, wobei die Chemokine der CC-Familie vor allem auf Neutrophile und T-Zellen, die der CXC-Familie auf Monozyten, Eosinophile, Basophile und T-Zellen wirken.

Die Wirkung der Chemokine wird über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind 7-transmembranäre Rezeptoren, d.h. sie besitzen eine intrazelluläre Domäne, an der sich GTP-bindende Proteine, die sog. G-Proteine, befinden und eine extrazelluläre Domäne, an der das Chemokin als Ligand binden kann. Kommt es zur Bindung eines Liganden an den Rezeptor werden verschiedene Schritte eingeleitet.

Das G-Protein besteht aus drei Untereinheiten (α , β und γ), wobei die α -Untereinheit Guanosindiphosphat (GDP) und Guanosintriphosphat (GTP) binden kann. Im inaktiven Zustand, also bei fehlender Ligandenbindung, ist GDP an die α -Untereinheit gebunden. Bei der Bindung eines Chemokins wird das gebundene GDP durch das energiereichere GTP ersetzt, woraufhin das heterotrimere G-Protein in eine α -Untereinheit und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert. Durch die gebildeten Untereinheiten, die als *Second Messenger* dienen, werden weitere Proteine beeinflusst. Phospholipase C (PLC) wird aktiviert und spaltet die Phosphatidylinositol(4,5)Bisphosphonate (PIP₂) in zwei *Second Messenger*: Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃). DAG aktiviert wiederum Proteinkinase C (PKC), während IP₃ die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern triggert. Diese Vorgänge lösen ihrerseits wieder verschiedene Signalkaskaden aus, die letztendlich zu Reaktionen wie Chemotaxis, Degranulation und Zelladhäsion führen.

Nach einer gewissen Zeit wird das an die α -Untereinheit gebundene GTP durch dessen intrinsische GTPase-Aktivität zu GDP und Phosphat gespalten, wodurch es zu einer erneuten Zusammenlagerung der α - mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit kommt und die Signalkaskade dadurch beendet wird (Mellado et al. 2001; Shahrara et al. 2003; Soriano et al. 2003; Wong und Fish 2003).

1.3.2 Chemokinwirkung auf SCCHN

Da Chemokine u.a. an der Zellbewegung beteiligt sind, lag die Idee nahe, dass Chemokine Einfluss auf die Metastasierung, Wachstum und Neoangiogenese von Tumoren haben könnten. Verschiedenste Studien wurden daraufhin angefertigt, und es konnte festgestellt werden, dass Tumorzellen eine bestimmte Chemokin-/Chemokinrezeptorexpression, die von der physiologischen Expression abweicht, aufweisen. Dieses spezielle Expressionsmuster könnte Hinweise auf die

Schnelligkeit des Wachstums und den Metastasierungsweg des Primärtumors geben (Kakinuma und Hwang 2006; Zlotnik 2006b; Raman et al. 2007).

Bei SCCHN konnten v.a. inflammatorische Chemokine nachgewiesen werden, die wiederum eine Beteiligung an Wachstum und Überleben sowie an einer veränderten Empfindlichkeit gegenüber Zytostatika haben (Wang et al. 2009).

In dieser Arbeit wurden Chemokine und Chemokinrezeptoren untersucht, die sich bereits in früheren Arbeiten als relevant für Wachstum, Metastasierung und Prognose von SCCHN herausgestellt haben (Abiko et al. 2003; Almofti et al. 2004; Delilbasi et al. 2004; Wang et al. 2005a; Ishikawa et al. 2006; Miyazaki et al. 2006; Muller et al. 2006; Tsuzuki et al. 2006; Yeudall und Miyazaki 2007; Chang et al. 2008; Ferreira et al. 2008; Khademi 2008; Oliveira-Neto et al. 2008; Tan et al. 2008; Wang et al. 2008; Wen et al. 2008; Michiels et al. 2009) und weiterhin eine Veränderung ihrer Expression nach Radio- bzw. Chemotherapie festgestellt werden konnte (Moriconi et al. 2008, Wolff et al. 2011b). Diese werden nun im Folgenden genauer erläutert:

CXCR4 und CXCL12

Insbesondere CXCR4 mit seinem Liganden CXCL12 spielt bei der Tumorstreuung, bei Tumorwachstum und –differenzierung eine wichtige Rolle (Raman et al. 2007; Lugade et al. 2008). CXCL12 ist besonders stark in Lunge, Leber, Knochenmark und vor allem Lymphknoten exprimiert. Alle genannten Strukturen sind auch typische Metastasierungsorte für die verschiedensten Krebsarten (Zlotnik 2006b), wobei insbesondere CXCR4 mit seinem Liganden CXCL12 die Metastasierung von SCCHN zu fördern scheinen (Almofti et al. 2004; Samara et al. 2004; Ishikawa et al. 2006). Bei Tumoren an der Zunge konnten Delilbasi et al. eine starke Beteiligung von CXCR4 insbesondere bei der Streuung in Lymphknoten beobachten (Delilbasi et al. 2004). Während bei gesunder Schleimhaut im HNO-Bereich keine oder eine nur leichte Expression von CXCR4 nachgewiesen werden konnte, wurde bei dem Primärtumor sowie den Lymphknotenmetastasen eine deutlich stärkere Expression von CXCR4 und CXCL12 festgestellt (Delilbasi et al. 2004, Oliveira-Neto et al. 2008).

CXCR1 und CXCL1 und CXCL3

Eine CXCL1-Expression bei SCCHN konnte von Michiels et al. nachgewiesen werden (Michiels et al. 2009). CXCL1 und CXCL3 sind besonders stark an der Neoangiogenese beteiligt und somit notwendig für das Tumorwachstum (Raman et al. 2007).

Der zugehörige Rezeptor CXCR1 ist in letzter Zeit zunehmend bei diversen anderen Krebsarten erforscht worden. Eine erhöhte CXCR1-Expression ist bei Patienten mit Pankreas-Karzinom und papillären Schilddrüsen-Karzinom mit erhöhter lymphatischen Metastasierung und erniedrigtem Gesamtüberleben assoziiert. (Chen et al. 2014; Tang et al. 2014). Ebenso beim Nierenzellkarzinom, Malignem Melanom und Magen-Karzinom konnte ein Einfluss von CXCR1 auf den Tumorprogress beobachtet werden (Singh et al. 2009; Giuliano et al. 2014; Li et al. 2014). Bei Li et al. konnten durch eine gezielte CXCR1-Blockade beim hepatozellulären Karzinom die Nebenwirkungen einer Cisplatin-Therapie verringert und gleichzeitig die Therapieeffektivität gesteigert werden (Li et al. 2015). Bisher gibt es nur wenige Daten von CXCR1 bei SCCHN, weswegen nun geprüft werden soll, welchen Einfluss CXCR1 auf SCCHN ausübt.

CCR6 und CCL20

CCL20 könnte als Reaktion auf bakterielle Infektionen im Mund-Rachen-Raum vermehrt exprimiert werden und somit auch in die Tumorregulation von SCCHN eingreifen und damit eine Rolle bei schlechter Mundhygiene als Risikofaktor für SCCHN spielen (Abiko et al. 2003). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die CCL20-Expression mit fortschreitendem Tumorstatus ansteigt und damit die Prognose für den Patienten verschlechtert (Chang et al. 2008). Für den zugehörige Rezeptor CCR6 konnte eine Herabregulierung bei Metastasierung von SCCHN festgestellt werden (Wang et al. 2004).

CCR7

Wie beschrieben (Kap. 1.3.1), werden bestimmte Chemokinrezeptoren konstitutiv von Lymphknoten exprimiert. Exakt diese Rezeptoren konnten auch in SCCHN nachgewiesen werden, wobei CCR7 besonders stark exprimiert wurde (Muller et al. 2006; Raman et al. 2007).

Vor allem die CCR7-Aktivierung durch CCL19 und CCL21 korreliert stark mit Tumorwachstum, weswegen laut Wang et al. eine CCR7-Blockade die Zytostatika-Resistenz von Tumorzellen herabsetzen könnte und somit neue Therapieansätze ermöglicht würden (Wang et al. 2008). Eine starke CCR7-Expression korreliert außerdem direkt mit einer erhöhten Rezidivrate, Lymphknotenmetastasen und einer deutlich eingeschränkten Lebenserwartung durch den Tumor (Tsuzuki et al. 2006).

Des Weiteren konnte von Wang et al. eine Herabregulierung der CCR6-Expression und eine Hochregulation der CCR7-Expression in Metastasen sowie im Tumorgewebe nachgewiesen werden (Wang et al. 2004). Diese Hochregulierung von CCR7 führt zu einer Auslösung von invasiven und wachstumsfördernder Prozesse im Tumorgewebe (Wang et al. 2005b).

Tab. 4: Untersuchte Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine	Synonyme	Vollständiger Name	Rezeptor	Gene
CCL20	MIP3- α , LARC, Exodus-1, Ck β 11	<i>macrophage inflammatory protein 3 alpha</i>	CCR6	Scya20
CXCL1	GRO α , SCYB1, GRO1, NAP-3	<i>growth-related oncogene alpha</i>	CXCR1, 2	Scyb1
CXCL3	GRO γ , SCYB3, GRO3, MIP-2 β	<i>growth-related oncogene gamma</i>	CXCR1, 2	Scyb3
CXCL12	SDF-1, SCYB12, PBSF	<i>stromal cell-derived factor 1</i>	CXCR4	Scyb12
			CCR7	

(Wolff et al. 2011b)

1.4 Ziel der Untersuchung

Fast die Hälfte aller Patienten mit SCCHN erleidet einen Rückfall (Brockstein 2011) und trotz aller erreichten Fortschritte beträgt die mittlere Überlebenszeit bei fortgeschrittenen SCCHN nur 23 Monate (Hauswald et al. 2011), weswegen eine Suche nach weiteren Therapieoptionen unerlässlich ist.

Eine Veränderung der Expression der Chemokinliganden durch Bestrahlung konnte in verschiedensten Studien nachgewiesen werden (Johnston et al. 2002; Linard et al. 2004; Müller und Meineke 2007; Gremy et al. 2008; Lugade et al. 2008; Matsumura et al. 2008; Moriconi et al. 2008; Ao et al. 2009; Facoetti et al. 2009; Sanzari et al. 2009; Mihaescu et al. 2010), während eine Veränderung der Expression der Chemokinrezeptoren bislang in nur wenigen Studien untersucht wurde (Johnston et al. 2002; Malik et al. 2010). Im Hinblick auf die Veränderung der Expression bestimmter Chemokine und ihrer Rezeptoren in verschiedenen Zelllinien in konnten von Wolff et al. Ergebnisse bezüglich einer alleinigen Radiotherapie erbracht werden (Wolff et al. 2011b). Ausgehend von diesen Ergebnissen soll das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit sein, die Genexpression bei menschlichen SCCHN-Zellen *in vitro* unter der kombinierten Radiochemotherapie zu analysieren. Als sekundäres Ziel soll geklärt werden, welchen Einfluss die kombinierte Therapie auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Tumorzellen hat.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Bei den Versuchsreihen wurden nur Zelllinien untersucht, die die entsprechenden Chemokine konstitutiv exprimieren.

Tab. 5: Zelllinien und Herkunft

Zelllinie	Erhalten von	Nährlösung	Herkunft
BHY	DSMZ ¹	DMEM	SCC (Tiefer Alveolus)
BW-225	RT-Göttingen ²	DMEM+HAMsF12 1:1	SCC (Oropharynx)
DF-19	RT-Göttingen ²	DMEM	Dermale Fibroblasten
FaDuDD	RT-Dresden ³	DMEM	SCC (Pharynx)
GR-145-I	RT-Göttingen ²	DMEM+HAMsF12 1:1	SCC (Oropharynx)
GR-145-II	RT-Göttingen ²	DMEM+HAMsF12 1:1	SCC (Oropharynx)
HaCat	DKFZ ⁴	DMEM	Epidermale Keratinozyten
ZMK-1	RT-Göttingen ²	DMEM+HAMsF12 1:1	SCC (Oropharynx)

1. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
2. Universitätsmedizin Göttingen, Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie, Göttingen, Deutschland
3. Zentrum für Radioonkologie, medizinische Strahlenforschung in der Onkologie, OncoRay, medizinische Fakultät Cal-Gustav-Carus, Technische Universität Dresden, Deutschland
4. Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland

2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

Die verwendeten Medien, Puffer und Lösungen sind nachfolgend aufgeführt und wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt und sterilfiltriert.

Tab. 6: Medien, Puffer und Lösungen

Cisplatin P4394 CAS-Nr.: 15663-27-1 EC-Nr.: 239-733-8	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ohne Phenolrot): Nutrient Mixture F-12=1:1) Katalog-Nr.: D2902	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

EDTA Titriplex III Katalog-Nr.: 1.08418.0250	Merck	Darmstadt, Deutschland
EGF		
Ethanol 100%	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99,9% vergällt	DeRaSo	Dassel-Lauenberg, Deutschland
Ethanolamin	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Fetales Kälber Serum, Katalog-Nr.: S0115	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Glutamin	Merck	Darmstadt, Deutschland
HCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
Hydrocortison		
Insulin Artikel-Nr.: I-6634	Sigma	Taufkirchen, Deutschland
Kristallviolett	Sigma	Taufkirchen, Deutschland
Methanol Katalog-Nr.: 106009	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaCl 0,9%	Braun	Melsungen, Deutschland
Phosphoethanolamin	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺ , low endotoxin)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
RPMI (ohne Phenolrot) Katalog-Nr.: 1640	Biochrom	Berlin, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
SuperScript-II-Reverse Transkriptase	Invitrogen	Carlsbad, USA
SybrGreen [®]	LTF	Wasserburg, Deutschland
Trypanblau Solution 0,4%	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Trypsin Katalog-Nr.: L2103	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA solution Katalog-Nr.: L2153	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland

RPMI wurde zusätzlich mit Vitaminen und Aminosäuren sowie Wachstumsfaktoren versetzt.

Das Nährmedium DMEM enthält essentielle und nicht essentielle Aminosäuren

Die Nährlösungen wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt und vor Zugabe zu den Zellen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

2.1.3 Primer

Tab. 7: *Primer*

Gen	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	AL (bp)	Quelle
CCL20	TGCTGTACCAA GAGTTTGCTC	CGCACACAGAC AACTTTTTCTTT	220	PrimerBank (http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html)
CXCL1	CTTGCCTCAATC CTGCATC	CCTTCTGGTCAG TTGGATTTG	82	Bachmeier et al. (2008)
CXCL3	GCAGGGAATTC ACCTCAAGA	GGTGCTCCCCTT GTTCAGTA	172	Kato et al. (2009)
CXCL12	GGTCGTGGTCG TGCTGGT	CGGGCTACAAT CTGAAGGG	174	Zhou et al. (2008)
CCR6	CTCCAGGCTATT TGTACCGATTG	CACTGCCCAGA ATGGGAGAG	181	PrimerBank (http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html)
CCR7	GGGCACAGCCT TCCTGTG	CCACCACCAGC ACGCTTT	82	Deutsch et al. (2008)
CXCR1	GCAGCTCCTACT GTTGGACACA	CATGTCCTCTTC AGTTTCAGCAA	75	Deutsch et al. (2008)
CXCR4	TACACCGAGGA AATGGGCTCA	AGATGATGGAG TAGATGGTGGG	112	PrimerBank (http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html)
HPRT1	TGACACTGGCA AAACAATGCA	GGTCCTTTTCAC CAGCAAGCT	93	Calcagno et al. (2006)
UBC	CGGTGAACGCC GATGATTAT	ATCTGCATTGTC AAGTGACGA	123	Cicinnati et al. (2008)

2.1.4 Laborkits

Tab. 8: Laborkits

RNeasy Plus Mini Kit 250 Katalog-Nr: 74136	Qiagen	Hilden, Deutschland
---	--------	---------------------

2.1.5 Geräte

Tab. 9: Geräte

Airflow Sterile Werkbank	Heraeus	Hanau, Deutschland
Bio Photometer PC-online v1.00 Software + Gerät	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Brutschrank, (37 °C, 5% CO ₂), CO ₂ -Inkubator Function Line BB16	Heraeus	Hanau, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C VIP Series	Sanyo	
Mastercycler gradient	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Messzelle (LabelGuard™)	Implen	München, Deutschland
Mikroskop Standard 18	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Neubauer improved Zählkammer	Marienfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland
PCR TaqMan 7900 HAT (SerienNR: 100325)	Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy accu	Integra Biosciences	Chur, Schweiz
Qiacube	Qiagen	Hilden, Deutschland
Reinstwassersystem Arium 611VF	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Röntgenröhre Gulmay Medical RS225	Gulmay medical ltd	UK
Sterile Werkbank, Lamin Air	Heraeus	Hanau, Deutschland
Sterilisator	Memmert	Schwabach, Deutschland
Stereomikroskop	Zeiss	Göttingen, Deutschland
stickstofftank	Chronos messer	Griesheim, Deutschland
Thermomixer comfort 5436	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Trockenschrank	Memmert	Schwabach, Deutschland
Vortexer MS1 Minishaker	IKA	Taquara, Brasilien
Waage: TE Precison Balance TE 612	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Wärmebad	GFL	Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R, Katalog-Nr. 75003060	Heraeus	Hanau, Deutschland
Zentrifuge ministar	VWR	Darmstadt, Deutschland

2.1.6 Zubehör

Tab. 10: Zubehör

10-ml-Röhren, Nr.: 62.554.205	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
50-ml-Röhren, Nr.: 62.547.004	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
8er Cups, optically clear	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
8er Deckel, optically clear	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Combitips: 1 ml, 0,5 ml und 0,1 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

CryoRöhrchen	Nunc	
Deckgläser, Artikel-Nr. 3700000	LO-Laboroptik GmbH	Friedrichsdorf, Deutschland
E-Cups safe-lock: 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorfpipette 100-1000 µl mit Spitzen	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorfpipette 20-200 µl mit Spitzen	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf safe-lock-tubes 0,5 ml Bestell-Nr. 0030121023	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf safe-lock-tubes 2,0 ml Bestell-Nr. 0030120094	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Falcon Röhrchen: 15 ml	Greiner Bio- One	Frickenhausen, Deutschland
Falcon Röhrchen: 50 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Filtertips: 1000 µl	Qiagen	Hilden, Deutschland
Gewebekulturflaschen: 25 cm ² , 40 ml mit Filterkappen, Nr.: 152094	Nunc	Roskilde, Dänemark
Gewebekulturflaschen: 75 cm ² , 250 ml mit Filterkappen, Nr. 658175	Greiner Bio- One	Frickenhausen, Deutschland
Kodan® Tinktur forte farblos, Artikel-Nr.: 104005	Schülke & Mayr GmbH	Norderstedt, Deutschland
Kryoröhrchen 2 ml, Nr.: 9401233	Schütt	Göttingen, Deutschland
Objektträger, Artikel-Nr.: VA11310004FKB	Waldemar Knittel GmbH	Braunschweig, Deutschland
Optically clear adhesive seal sheets	Thermos scientific	UK
Parafilm pechiney plastic packaging	Greiner Bio- One	Frickenhausen, Deutschland
Pasteur-Pipetten, Katalog-Nr.: 747715	Brand	Wertheim, Deutschland
PCR 384 well plate TF-0384	Thermo scientific	UK
Pipetten steril: 2 ml, 10 ml und 25 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze: 200 µl	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
RNase Zap R2020250 ml	Sigma	
Rotor adapters	Qiagen	Hilden, Deutschland
Sample Tube RB: 2 ml, Katalog-Nr.: 990381	Qiagen	Hilden, Deutschland

Shaker adapter Microzentrifugen Tubes: 2 ml	Qiagen	Hilden, Deutschland
Sterilfilter Filtropur L 0.2 LS, Bestell-Nr.: 83.1827.001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter Minisart 2000, Nr.: 17805	Sartorius	Göttingen
Zählkammer Neubauer improved: 0,0025 mm ²	Brand	Wertheim, Deutschland

2.1.7 Software

Tab. 11: Software

Statistica, Version 2013	StatSoft (Europe) GmbH	Hamburg, Deutschland
Word, Version 2013	Microsoft	Redmond, USA
Excel, Version 2013	Microsoft	Redmond, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturen und Zellhaltung

Um die Zellen in Kultur zu halten, wurden sie in 25- bzw. 75-cm²-Gewebekulturflaschen bei 37 °C im Brutschrank in einer 5%-Kohlenstoffdioxid-Atmosphäre inkubiert.

Jegliches Arbeiten mit den Zellen wurde unter dem *Airflow* steril durchgeführt um eine Kontamination der Kulturen zu vermeiden.

Dabei wurden für die Zelllinien ZMK-1, GR-145-I und -II sowie für BW-225 eine Nährlösung aus 450 ml RPMI und DMEM mit einem 1:1-Verhältnis, FKS, Glutamin, Insulin, Hydrocortison, EGF, Ethanolamin und Phosphoethanolamin benutzt.

Für die Zelllinien BHY, FaDuDD und HaCat wurde eine Nährlösung aus DMEM, FKS und Glutamin und für die Fibroblasten DF-19 wurde eine Nährlösung, bestehend aus DMEM und nicht aktiviertem FKS, hergestellt.

2.2.2 Ausimpfen von Zellkulturen

Beim Umsetzen der Zellen zur Erhaltungskultur wurde zunächst die Nährlösung aus der Gewebekulturflasche mit den Zellen vorsichtig entfernt und dann die Zellen gespült. Dabei wurde 2 ml PBS zu den Zellen gegeben, dieses kurz über den Zellrasen geschwenkt und danach wieder entfernt. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt und danach das restliche PBS mit der Pipette aufgenommen und verworfen. Dieser Vorgang ist wichtig, um Nährlösungsreste vollständig zu entfernen, da es sonst zu einer Inaktivierung des Trypsins durch das in dem Nährmedium enthaltene FKS gekommen wäre. Dies wurde bei allen Zelllinien außer bei der Linie HaCat identisch durchgeführt.

Bei der Zellreihe HaCat wurde nach dem Abgießen der Nährlösung die Flasche mit 2 ml EDTA gespült und dann wiederum mit 2 ml EDTA für zwei bis drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das EDTA abgeleert und die restliche Flüssigkeit mit der Pipette abgenommen.

Bei allen Zellreihen wurde nach Entfernung des PBS bzw. des EDTAs 2 ml Trypsin in EDTA in PBS zum Ablösen der adhären wachsenden Zellen vom Flaschengrund in die Flasche pipettiert. Unter dem Mikroskop wurde die vollständige Ablösung der Zellen kontrolliert, die Wirkung des Trypsins mit 10 ml der jeweiligen Nährlösung neutralisiert und die Zellsuspension mit einer 2-ml-Pipette vorsichtig durchmischt, um eine Vereinzelung der Zellen zu erwirken. Danach wurde mit Hilfe zweier Neubauer-Zählkammern der Mittelwert

der vitalen Zellen ausgezählt. Dabei entspricht die Zellzahl aus zwei ausgezählten Quadraten die Anzahl der Zellen $\times 10^4$ in 1 ml Zellsuspension.

Daraufhin wurden die Zellsuspension auf 10^4 verdünnt und von dieser verdünnten Stammlösung 0,25 ml und 0,5 ml in je eine 25-cm²-Gewebekulturflasche mit je 5 ml auf 37 °C erwärmte Nährlösung gegeben. Diese wurden wiederum im Brutschrank bei 37 °C gelagert.

2.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die in flüssigen Stickstoff eingefrorenen Kryoröhrchen mit den aufzutauenden Zellen wurden vorsichtig in das 37 °C warme Wasserbad gehalten und leicht bewegt. Sobald sich ein Flüssigkeitsfilm zwischen der Ampullenwand und dem Eisblock gebildet hatte, wurde dieser sofort in die mit 5 ml der zu den Zellen gehörigen Nährlösung vorbereitete Gewebekulturflasche geschüttet. Danach wurde die Gewebekulturflasche leicht geschwenkt, um ein möglichst schnelles Auflösen des Eisblocks zu gewährleisten. Nach zwei bis drei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und, sobald sich zwei Drittel der Zellen an den Boden der Flasche angeheftet hatten, der Überstand in eine neue Flasche gegeben. Zu der Flasche mit den bereits angehefteten Zellen wurde wiederum 5 ml der jeweiligen Nährlösung pipettiert; bei der Flasche mit den Zellen aus dem Überstand wurde die Nährlösung nach 24 h gewechselt.

Zum Einfrieren der Zellen wurde zunächst die zugehörige Nährlösung der Zelllinien mit 8 % DMSO versetzt und auf Eis gelagert. Das DMSO soll ein Platzen der Zellen beim Einfrieren verhindern, indem es die Bildung von Kristallen hemmt.

Wie beim Aufteilen der Zellen wurden die Gewebekulturflaschen mit den Zellen zunächst mit PBS bzw. EDTA (HaCat) zweimal gespült und dann, wie oben beschrieben, mit Trypsin von der Flaschenunterseite gelöst. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl der Zellen ausgezählt und die Zellsuspension bei 1200 upm für zehn Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren verworfen und das Röhrchen mit dem Zellpellet wurde für zwei Minuten aufs Eis gestellt. Danach wurde zu dem Pellet in dem Röhrchen langsam so viel von der kalt gestellten Nährlösung mit 8% DMSO gegeben, bis die Zellkonzentration 500.000 bis 2 Millionen Zellen pro ml betrug. Danach wurde die Zellsuspension gemischt und in die vorher im Eisschrank kalt gelagerten, sterilisierten Kryoröhrchen gefüllt. Diese wurden sofort nach dem Befüllen geschlossen und in einem gefütterten, vorher ebenfalls gekühlten Umschlag für zwei bis drei Stunden bei -20 °C

eingefroren; über Nacht wurden die Proben im Flüssigstickstoffbehälter in der Gasphase und danach in der flüssigen Phase bis zum nächsten Gebrauch aufbewahrt.

2.2.4 Bestrahlungsaufbau und -technik

Zur Bestrahlung der ausgeimpften Zellen wurde eine Röntgenröhre der Firma Gulmay benutzt. Diese arbeitet mit einer Röhrenspannung von 200 kV und einer Stromstärke von 20 mA. Die eingesetzte Bestrahlungsdosis ist bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

2.2.5 Koloniebildungsversuche

Um die Reaktion der verschiedenen Zelllinien auf die kombinierte Radio- und Chemotherapie im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung darzustellen, wurden sogenannte Dosis-Effekt-Kurven (Syn.: Überlebenskurven, Colony forming assays, Koloniebildungstests) durchgeführt. Eine bestimmte Anzahl an Zellen wurden 24 Stunden vor der Bestrahlung ausgeimpft. Dabei wurden folgende Zellzahlen für die Beimpfung der Flaschen eingesetzt, wobei pro Versuch für jede Bestrahlungsdosis zwei Flaschen genommen wurden:

Tab. 12: Ausgeimpfte Zellzahl pro Flasche

Bestrahlung [Gy]	0	1	2	3	4	6
Ausgeimpfte Zellzahl für DF-19, GR146 I, GR145 II	500	500	1000	1500	2000	3000
Ausgeimpfte Zellzahl für HaCat, ZMK-1, BW-225, FaDuDD	1000	1000	2000	3000	4000	6000

Bei der Zelllinie BHY war trotz Einsatz höherer Zellzahlen keine Koloniebildung zu beobachten.

Die Zellen wurden von der Erhaltungskultur, wie in Kap. 2.2.2 beschrieben, mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst, gezählt, verdünnt und die jeweilige Zellzahl mit jeweils 5 ml der zugehörigen Nährlösungen in die Gewebekulturflaschen pipettiert. Es wurden pro Bestrahlungszeitpunkt zwei Flaschen mit der oben genannten Zellzahl beimpft und für 22 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde bei der Hälfte der Flaschen jeweils 2,5 mM in PBS gelöstes Cisplatin in die Nährlösung gegeben. Danach wurden die Flaschen für weitere zwei Stunden inkubiert. Danach, also 24 Stunden nach Ausimpfung der Zellen, wurden alle Flaschen mit der jeweiligen Dosis bestrahlt (s. Tab. 12). Sofort nach der

Bestrahlung wurde die Nährlösung bei allen Flaschen erneuert, um ein Weiterwirken des Cisplatins zu verhindern bzw. eine Vergleichbarkeit der Koloniebildung zu gewährleisten.

Nach der Behandlung der Zellen wurden die Flaschen bei 37 °C inkubiert und das Nährmedium spätestens alle drei Tage gewechselt.

Nach sieben bis zehn Tagen wurden die Zellen mit je 4 ml 70% igem Alkohol für 20 Minuten fixiert. Danach wurde der Alkohol abgeschüttet und die Flaschen im Trockenschrank bei 50 °C getrocknet. Anschließend wurden die Kolonien mit Kristallviolett angefärbt. Dafür wurde für eine Flasche eine Lösung aus 1 ml absolutem Alkohol, 4 ml destilliertem Wasser und 0,025 ml Kristallviolett-Lösung hergestellt. Die Färbelösung wurde vorsichtig auf den Flaschenboden gegeben und für 20 Minuten inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Flaschen zweimal mit Wasser gespült und anschließend im Wärmeschrank bei 50 °C getrocknet.

Die nun angefärbten und fixierten Kolonien wurden unter dem Stereomikroskop auf einer angefertigten Schablone ausgezählt. Dabei wurden alle Kolonien, die aus 50 Zellen oder mehr bestehen als Klon gewertet und in die Überlebenskurven einbezogen. Alle Versuche wurden mehrmals wiederholt, sodass für jeden Messpunkt wenigstens zwölf Messungen durchgeführt wurden.

2.2.6 Statistische Auswertung der Koloniebildungsversuche

Im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit werden die Daten der Koloniebildungsversuche dargestellt. Dazu wurden die ausgezählten Kolonien auf die Anzahl der zuvor ausgeimpften Zellen bezogen. Aus diesen Werten wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung ermittelt und halblogarithmisch als Funktion der Strahlendosis in einem Diagramm dargestellt. Dies geschah für die Proben mit alleiniger Radiotherapie sowie für die Proben mit kombinierter Radiochemotherapie.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test. Ein p-Wert von kleiner 0,05 wurde dabei als signifikant angenommen.

2.2.7 Zellkulturansätze für RNA-Analytik

Um cDNA für die Messung der Genexpression mittels *Real-time* PCR zu gewinnen, musste zunächst die RNA der behandelten Zellen extrahiert werden.

Um den alleinigen Effekt der Chemotherapie mit Cisplatin beziehungsweise den Effekt der kombinierten Strahlen- und Chemotherapie darzustellen, wurden zunächst eine Million Zellen in 5 ml der jeweiligen Nährlösung in Gewebekulturflaschen ausgebracht. Es wurden pro Zelllinie je neun Flaschen mit je einer Million Zellen angesetzt und nach 22 h Inkubation bei

37 °C wurde in alle Flaschen 2,5 mM Cisplatin gegeben. Nach weiterer Inkubation für 2 h bei 37 °C wurden sechs dieser Ansätze mit 2 Gray bestrahlt, drei dienten als Kontrollen. Unmittelbar nach erfolgter Bestrahlung wurde die Nährlösung in allen neun Proben gewechselt, um die Einwirkzeit des Cisplatin zu beenden. Die bestrahlten Proben wurden dann entweder für 1, 3, 6, 12, 24 oder 48 h weiter bei 37 °C inkubiert. Diese Zeitpunkte hatten sich in der Vorarbeit von Wolff et al. als relevant herausgestellt. Für die drei Kontroll-Ansätze ohne Bestrahlung wurden Inkubationszeiten von 0, 24 und 48 h gewählt (Wolff et al. 2011b). Nach dem Wechseln der Nährlösung wurde sofort mit der Aufarbeitung der Zellen begonnen. Nach Ende der definierten Inkubationszeiten wurden RNA aus den Zellen gerntet, um den Expressionszustand interessierender Kandidatengene zu messen. Dazu wurde zunächst der Überstand von den Zellen abgenommen und die am Boden der Kulturflasche haftenden Zellen mit 1,5 ml Trypsin abgelöst. Nach sieben Minuten Inkubation wurden 7 ml Nährlösung zur Neutralisierung des Trypsins zugegeben. Diese Zellsuspension wurde nun in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Die Gewebekulturflasche wurde mit 5 ml PBS ausgespült und zur Zellsuspension im Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden 10 min bei 1500 upm abzentrifugiert. Nach dieser ersten Zentrifugation wurde der Überstand im Röhrchen verworfen, anschließend die Zellen, die sich im Pellet befanden, mit 5 ml PBS vorsichtig aufgewirbelt und dann erneut für 10 min bei 1500 upm abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt, um mögliche andere Zusätze zu entfernen.

Danach wurde der Überstand mit der Pipette abgenommen und 350 µl RLT-Puffer aus dem RNeasy Mini Plus Kit der Firma Qiagen mit 1%-Mercaptoethanol zu dem Zellpellet pipettiert. Nach fünf Minuten mit geschlossenem Deckel wurde die Suspension kräftig mit der Pipette gemischt, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nach zwei Minuten bei -80 °C eingefroren.

2.2.8 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte unter RNase freien Bedingungen, um eine enzymatische Degradation der RNA zu vermeiden. Dazu wurden konsequent RNase-freie Reagenzien und Plastikmaterialien verwendet. Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut. Mit Hilfe des RNeasy Plus mini Kit (Fa. Qiagen) und dem QiaCUBE-Roboter erfolgte die RNA-Isolation nach dem Herstellerprotokoll. Nach der RNA-Isolation wurde die RNA-Konzentration mit einem Biophotometer (Fa. Eppendorf) bei 260 nm spektrophotometrisch gemessen, dabei wurde eine Messzelle (LabelGuard™, Fa. Implen), die für den Mikroliter-Bereich konzipiert wurde, verwendet.

Zur Abschätzung der Reinheit der RNA bzw. einer Verunreinigung mit Proteinen wurde ein Quotient aus OD_{260}/OD_{280} gebildet. Dabei liegt das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren bei 260 nm; für Proteine bei 280 nm. Eine gute Qualität der RNA-Probe liegt bei einem Quotient zwischen 1,8 und 2,2 vor. Die isolierte RNA wurde wieder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.9 Umschreiben von RNA zu cDNA

Um die Genexpression der verschiedenen Chemokine und deren Rezeptoren zu messen, musste die isolierte RNA zu cDNA umgeschrieben werden. Auch das Umschreiben der RNA geschah unter RNase-freien Kautelen. Der Arbeitsplatz wurde mit RNase-Zap, einer RNase-inaktivierenden Lösung, behandelt. Zunächst wurde $1\text{ }\mu\text{g}$ Gesamt-RNA mit 2 ng ($0,1\text{ units}$) eines *Random-Primers* aus sechs Basenpaaren jedweder Basenkombination versetzt. Diese *Primer* wurden verwendet um in der Probe vorhandene RNA in cDNA umzuschreiben.

Das Volumen aus RNA und *Random-Primer* wurde mit RNase-freiem Wasser auf $18,5\text{ }\mu\text{l}$ ergänzt. Danach wurde die Platte abzentrifugiert und im Thermocycler platziert, in dem die RNA für 10 min bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert wurde; danach wurde die Platte sofort auf Eis gelegt. Dadurch wurde die *Primer*-Anlagerung gegenüber der Ausbildung von RNA-Tertiärstrukturen begünstigt.

Jeweils $11,75\text{ }\mu\text{l}$ des vorbereiteten Mastermix, bestehend aus den in Tab. 13 aufgeführten Bestandteilen, wurden zu der denaturierten RNA gegeben. Danach wurde die Platte erneut im Cycler platziert und 60 min bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur reversen Transkription inkubiert.

Letztendlich wurden die Proben mit TE-Puffer auf 2 ng/ml cDNA (bezogen auf die Konzentration der eingesetzten RNA) eingestellt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Mit diesen Proben wurden die quantitativen *Real-time* PCR-Messungen durchgeführt.

Tab. 13: Zusammensetzung des Mastermix zum Umschreiben von RNA zu cDNA

Inhaltsstoffe	für 1 Probe (μl)
5xRT-Puffer	6,0
0.1 MDTT	2,5
Wasser, RNase-frei	1,5
10 mM dNTPs	1,0
RNase Inhibitor	0,5
SuperScript-II-Reverse Transkriptase	0,25
	11,75

2.2.10 Messung der cDNA mittels *Real-time* PCR

Bei der *Real-time* PCR wird die Zunahme von durch *Primerpaare* definierten Sequenzbereichen während der Elongationszyklen gemessen. In meinen Messungen habe ich als Nachweisreagenz den Fluoreszenzfarbstoff *SYBR-Green* verwendet. Dieses zeigt praktisch nur bei Einlagerung in doppelsträngige DNA ein Signal, welches proportional zur Menge der amplifizierten Produkte ist.

Die Auswertung erfolgt in einem Bereich mit linearer Beziehung zwischen der Zahl der PCR-Zyklen und der logarithmisch aufgetragenen Signalstärke. Für alle zu vergleichenden Proben wird ein einheitlicher Signalstärke-Wert definiert. Für das Erreichen dieses Wertes wird für jede Probe die Anzahl der nötigen PCR-Zyklen, der so genannte Ct-Wert (*cycle threshold*), bestimmt. Je mehr RNA-Transkripte eines Gens ursprünglich in der Probe vorhanden waren, desto kleiner ist Ct-Wert und umgekehrt.

Bei der Verwendung von *SYBR-Green* als Nachweisreagenz beruht die Spezifität der *Real-time* PCR einzig auf dem jeweiligen *Primerpaar*. Dazu wurde die Eindeutigkeit der Amplifikation über ein Agarosegel kontrolliert. Weiterhin musste die Amplifikationseffizienz eines *Primerpaares* mindestens 90% betragen. Diese Qualitätskontrollen waren bereits in den experimentellen Versuchen von Wolff et al. durchgeführt worden (Wolff et al. 2011b).

Die *Real-time* PCR erfolgte immer in Doppelbestimmung mit 7 µl eines Reaktionsmixes und 3 µl der cDNA-Probe. Der Reaktionsmix bestand – mit Ausnahme des Nachweises für die CCR7-Transkripte – aus 1,8 µl RNase-freiem Wasser, 0,2 µl des jeweiligen *Primerpaares* in einer 1:10 Verdünnung und 5 µl eines *SYBR-Green*-haltigen Mastermixes. Für das Gen CCR7 wurde folgende Zusammensetzung gewählt: 5 µl Mastermix, 1 µl eines kommerziellen *Primerpaares* (Fa. Qiagen) und 1 µl RNase-freies Wasser. Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit wurden für jedes Gen alle Proben zusammen auf einer Platte pipettiert. Nach Befüllung wurde die Platte mit einer Fluoreszenzlicht-durchlässigen Folie (*optically clear*) fest verschlossen, damit die Proben während der Messung nicht verdampfen und die Platte wiederum bei 1000 upm abzentrifugiert. Abschließend wurde die Platte im Messgerät TaqMan 7900HT (Fa. Applied Biosystems) platziert, wobei folgende Zyklen durchlaufen wurden: 2 min bei 95 °C zur initialen Aktivierung der durch Antikörper geblockten Polymerase. Danach wurden 45 beziehungsweise bei zu erwartenden höheren Ct-Werten 55 Zyklen durchlaufen, um die gewünschte DNA-Sequenz, die 50 – 150 Basenpaare umfasst, zu vervielfältigen. Diese Zyklen setzten sich aus 15 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s *Primeranlagerung* bei 60 °C und 40 s Kettenverlängerung bei 72 °C zusammen.

Während dem letzten Schritt, dem Schritt der Elongation, erfolgte jeweils die Fluoreszenzdetektion. Bei der abschließenden Messung der Schmelzkurve wurden die Proben für 15 s auf 95 °C erhitzt, dann für 15 s auf 60 °C heruntergekühlt und anschließend langsam (*minimale ramp rate*: 2%) wieder auf 95 °C gebracht. Dabei wurde wieder die Signalstärke des *SYBR-Green*-Fluoreszenzfarbstoffes gemessen. Damit wurde die Spezifität der Reaktion für jede Probe überprüft. Zur Überprüfung des Reaktionsmixes wurde auf jeder Messplatte eine Eichgerade mit stets demselben Pool aus cDNA mitgeführt.

Nach Austestung, welche Chemokinliganden und -rezeptoren in den Zelllinien BHY, BW-225, DF-19, FaDuDD, GR-146-I, GR-145-II, HaCat und ZMK-1 nennenswert exprimiert sind (Wolff et al. 2011b) wurde die Expression folgender Gene in meiner Studie untersucht (Tab 14).

Tab. 14: Untersuchte Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptor	Chemokinliganden
CXCR4	CXCL12
CXCR1	CXCL1 und CXCL3
CCR6	CCL20
CXCR4	CXCL12
CCR7	

Unter der kombinierten Radiochemotherapie kam es bei einigen Zelllinien zum starken Zellsterben, wodurch auch die Menge an RNA stark abfiel. Es wurden Ct-Werte bis maximal 45 Zyklen berücksichtigt, sofern die Schmelzkurve noch auf das gewünschte spezifische Produkt schließen ließ.

Des Weiteren wurde die Expressionsstärke von HPRT1, TBP und TUBB als Referenzgene gemessen und aus diesen drei ein gewichtetes Mittel gebildet, worauf dann der Expressionszustand jedes der Zielgene bezogen wurde.

2.2.11 Statistische Auswertung der Genexpression

Die im Ergebnisteil aufgeführten Diagramme zeigen nun die jeweiligen Zelllinien und deren Expression der Chemokine unter Radiochemotherapie im zeitlichen Verlauf. Alle gemessenen Werte wurden auf die Werte der oben genannten Referenzgene normiert.

Eine Änderung der Expression eines Gens wurde als signifikant angesehen, wenn eine Veränderung der Expression um den Faktor zwei festgestellt werden konnte.

3. Ergebnisse

3.1 Cisplatin-Effekte

In diesem Kapitel wird nun der Cisplatin-Effekt der verschiedenen Zellreihen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen im Koloniebildungsversuch dargestellt.

Eine signifikante Veränderung des Überlebens wurde mit gepaarten T-Test bestimmt und in den folgenden Grafiken mit Sternen gekennzeichnet.

3.1.1 Cisplatin-Effekt im Koloniebildungsversuch

Betrachtet man den reinen Cisplatin-Effekt auf die verschiedenen Zellreihen erkennt man, dass die Zelllinien unterschiedlich stark auf die Behandlung mit Cisplatin reagieren. Dabei wurde der Wert 1 als Überleben der Zellreihen ohne Therapie festgelegt. Bei allen Zellreihen wurde eine deutliche Verringerung der Zellkolonien erkennbar, die sich als signifikant darstellte. Die Normalgewebszellreihen HaCat und DF-19 zeigten dabei die geringste Reaktion auf die Cisplatin-Therapie; bei den Tumorzellreihen FaDuDD und ZMK-1 war das Überleben am deutlichsten vermindert.

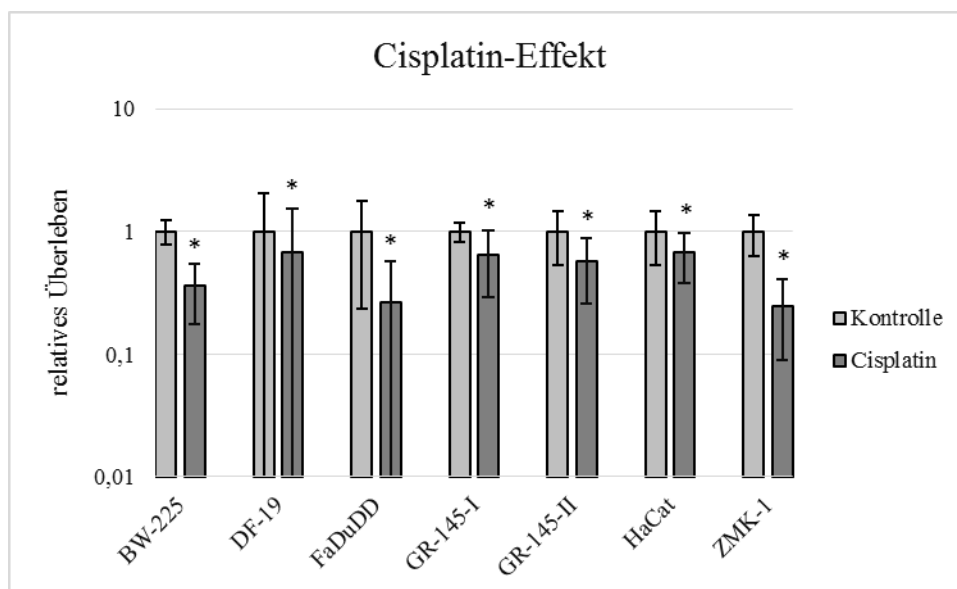


Abb. 3: Darstellung der Cisplatin-Wirkung auf das Koloniebildungsverhalten
 Wirkung von Cisplatin (2,5 mM) auf die verschiedenen Zellreihen nach zweistündiger Inkubation,
 Ausimpfung und Bebrütung der Zellen
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

Tab. 15: Relatives Überleben der Zellen nach alleiniger Cisplatin-Therapie

	Kontrolle	SD-Kontrolle	Cisplatin	SD-Cisplatin	t-Wert	p-Wert
BW-225	1,000	0,222	0,358	0,181	5,903	0,0001027
DF-19	1,000	1,066	0,676	0,842	4,593	0,0007741
FaDuDD	1,000	0,765	0,262	0,309	5,547	0,0001735
GR-145-I	1,000	0,189	0,650	0,360	5,516	0,0001819
GR-145-II	1,000	0,466	0,565	0,309	7,727	0,0000091
HaCat	1,000	0,464	0,673	0,297	4,929	0,0004501
ZMK-1	1,000	0,368	0,248	0,158	11,297	0,0000002

Kontrolle: relatives mittleres Überleben der Kontrolle, SD-Kontrolle: Standardabweichung des Überlebens der Kontrolle, Cisplatin: relatives mittleres Überleben der Zellen nach zweistündiger Inkubation mit 2,5 mM Cisplatin, SD-Cisplatin: Standardabweichung des Überlebens der Zellen nach zweistündiger Inkubation mit 2,5 mM Cisplatin

3.1.2 Cisplatin-Effekt auf die Genexpression

Im folgenden Kapitel werden die Wirkungen der Cisplatin-Therapie auf die Genexpression dargestellt. Wie in Kap. 2.2.10 erklärt, stellt der Zeitpunkt 0 h den Zeitpunkt der Bestrahlung dar, zu diesem Zeitpunkt erfolgte bereits die zweistündige Inkubation mit 2,5 mM Cisplatin. Bei den folgenden Darstellungen entspricht also der Zeitpunkt 0 h der ersten aufgearbeiteten Probe. Eine Veränderung dieses Wertes ist dementsprechend als Effekt der Cisplatin-Therapie im Vergleich zur unbehandelten Probe zu verstehen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der unterschiedlichen Chemokinexpressionen der verschiedenen Zellreihen dargestellt.

3.1.2.1 CXCR4- und CXCL12-Expression

CXCR4

CXCR4 wurde nach alleiniger Cisplatin-Therapie von den Zelllinien ZMK-1, FaDuDD und BW-225 exprimiert. Bei allen drei Zellreihen konnte eine signifikante Expressionssteigerung auf z.T. über das 10-fache des Normwertes beobachtet werden. Bei BW-225 konnte zudem eine Zunahme der Expression mit fortschreitender Zeit festgestellt werden, während bei ZMK-1 eine tendenziell gegenläufige Expression zu beobachten war. Bei der Zelllinie FaDuDD konnte zunächst eine Zunahme der Expression, nach 24 h eine leichte Abnahme und nach 48 h wieder ein erneuter Anstieg der Expression dargestellt werden. Jedoch blieb auch bei dieser Zelllinie die Expression die gesamte Zeit über der der Kontrollgruppe.

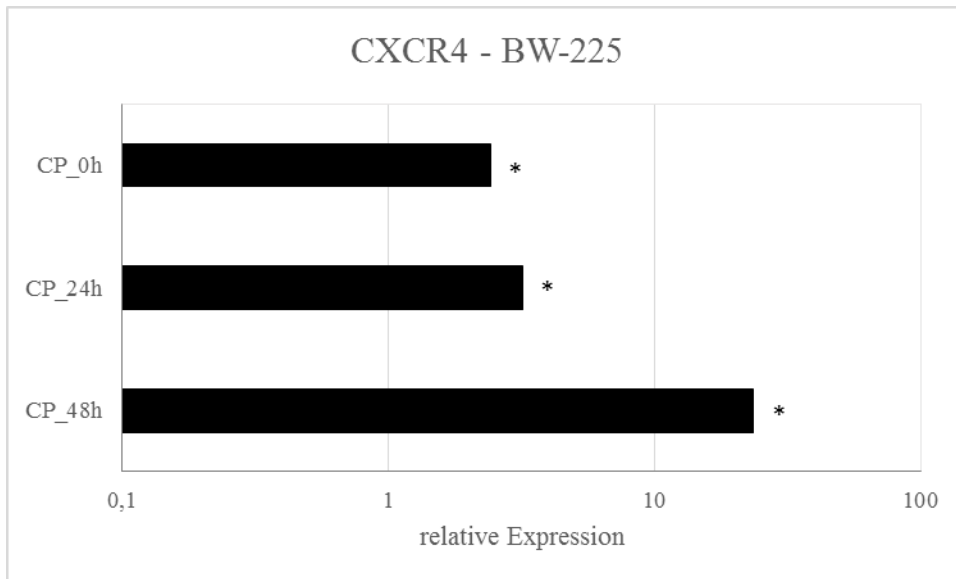


Abb. 4: Expression von CXCR4 bei der Zelllinie BW-225 unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

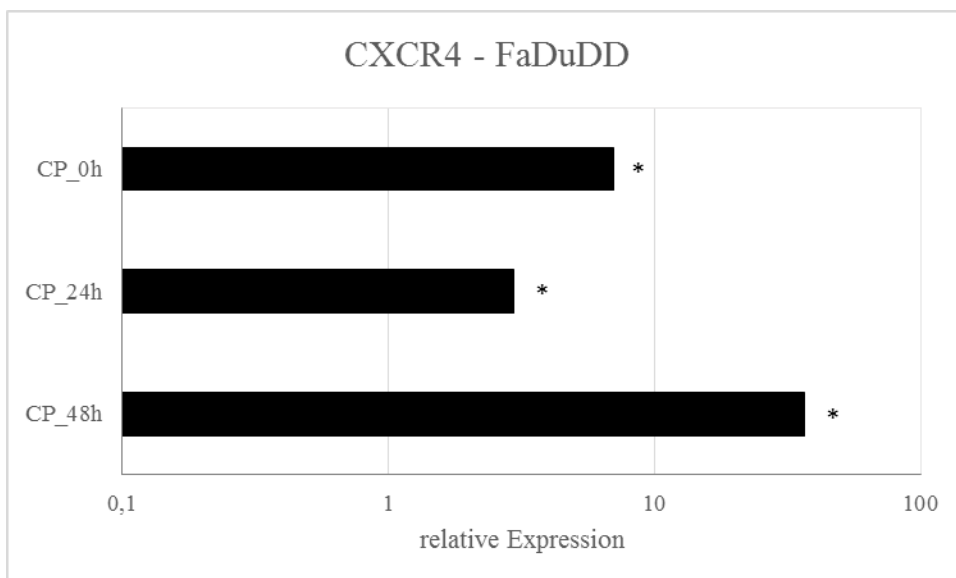


Abb. 5: Expression von CXCR4 bei der Zelllinie FaDuDD unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

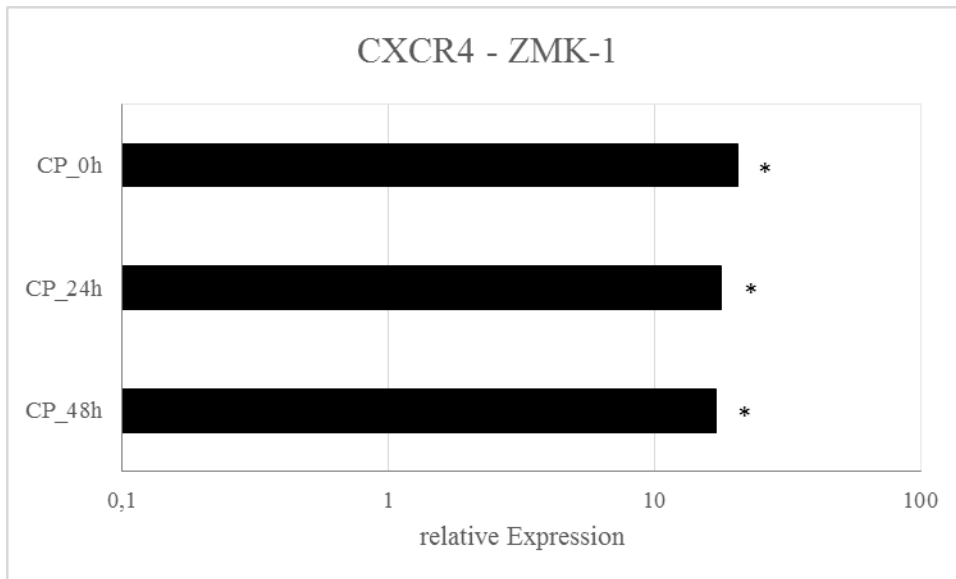


Abb. 6: Expression von CXCR4 bei der Zelllinie ZMK-1 unter Cisplatin-Therapie
*Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle*

CXCL12

Auch CXCL12 wurde von drei Zelllinien unter alleiniger Cisplatin-Behandlung exprimiert. Bei der Zelllinie DF-19 kam es zur keiner signifikanten Expressionsänderung; bei GR-145-I und BW-225 war jeweils der 0h-Wert signifikant verschieden, wobei es bei GR-145-I zu einer Expressionssteigerung und bei BW-225 zu einer Expressionsminderung kam. Eine zeitliche Dynamik war weder bei DF-19 noch bei BW-225 zu finden.

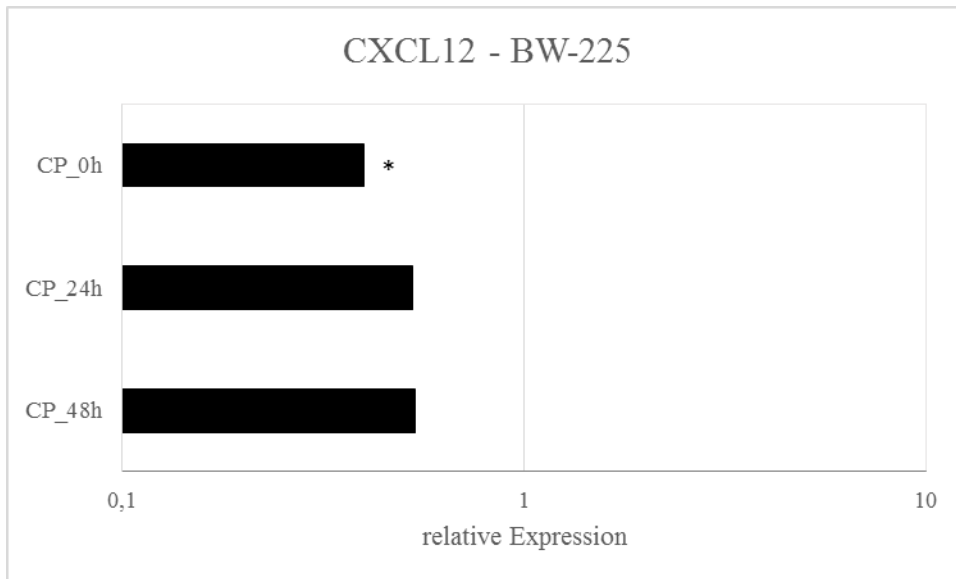


Abb. 7: Expression von CXCL12 bei der Zelllinie BW-225 unter Cisplatin-Therapie
*Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle*

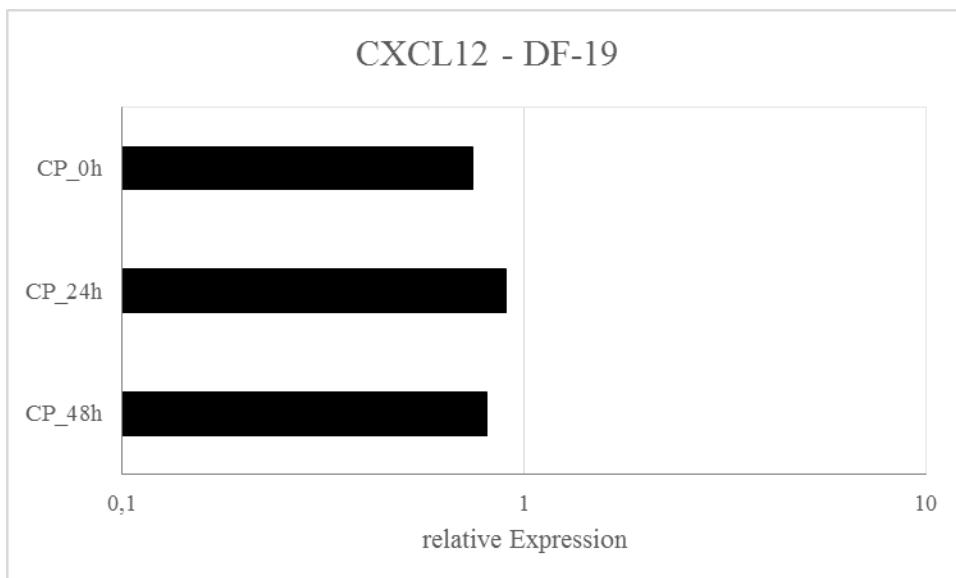


Abb. 8: Expression von CXCL12 bei der Zelllinie DF-19 unter Cisplatin-Therapie
*Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle*

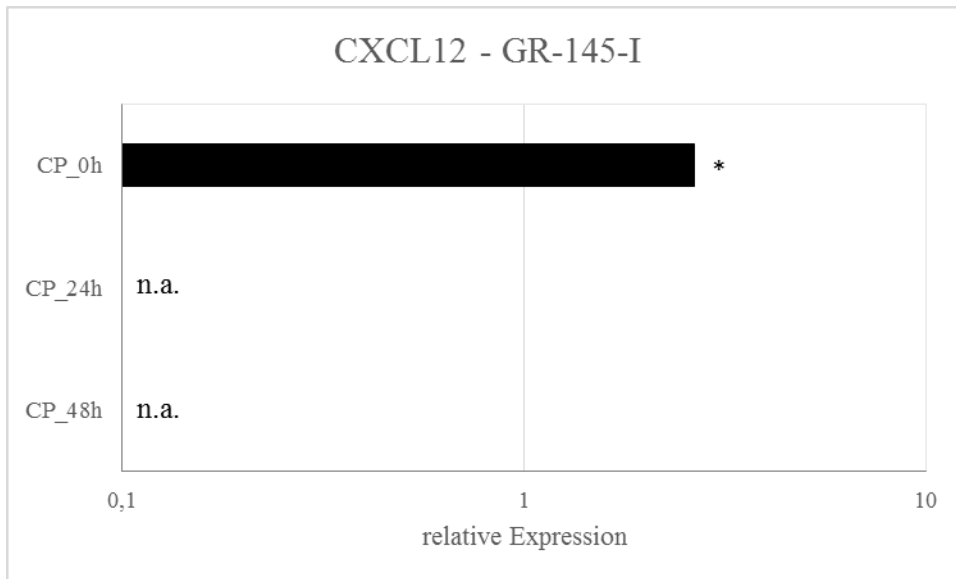


Abb. 9: Expression von CXCL12 bei der Zelllinie GR-145-I unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

3.1.2.2 CXCR1-, CXCL1- und CXCL3-Expression

CXCR1

Die Expression von CXCR1 unter Behandlung mit Cisplatin konnte bei keiner Zelllinie gemessen werden.

CXCL1

CXCL1 wird von allen Zelllinien außer von ZMK-1 exprimiert. Bei den Zelllinien HaCat und BW-225 ist eine signifikante Expressionssteigerung im zeitlichen Verlauf zunehmend erkennbar. Bei den Zelllinien DF-19, BHY, GR-145-I und FaDuDD ist ebenfalls eine signifikante Steigerung der Expression von CXCL1 zu beobachten, die bei diesen Zellreihen jedoch parabelförmig verläuft und ihren Höhepunkt bei 24 h zeigt. GR-145-II zeigt wie die anderen Zelllinien eine Expressionssteigerung, jedoch zeigt diese über den zeitlichen Verlauf eine zunächst verminderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

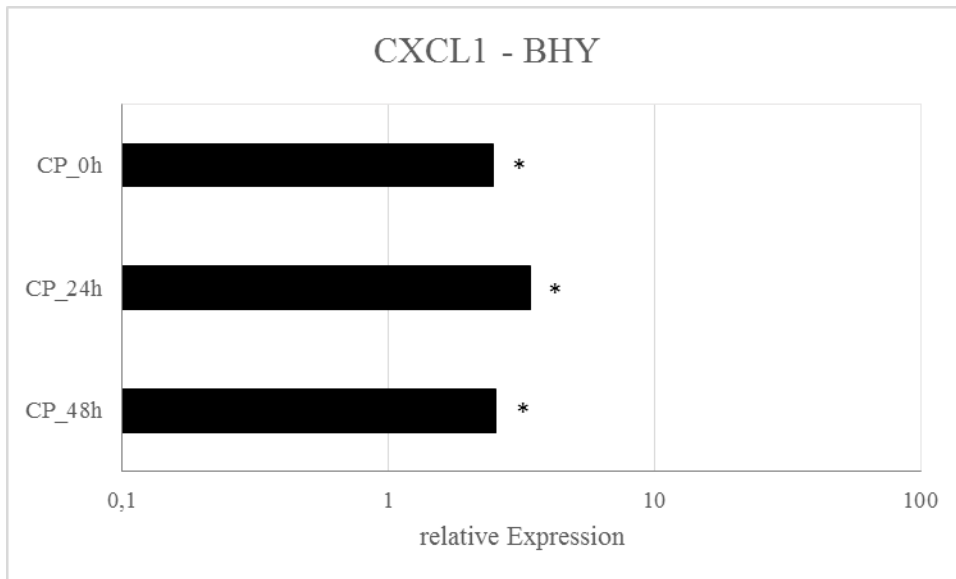


Abb. 10: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie BHY unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

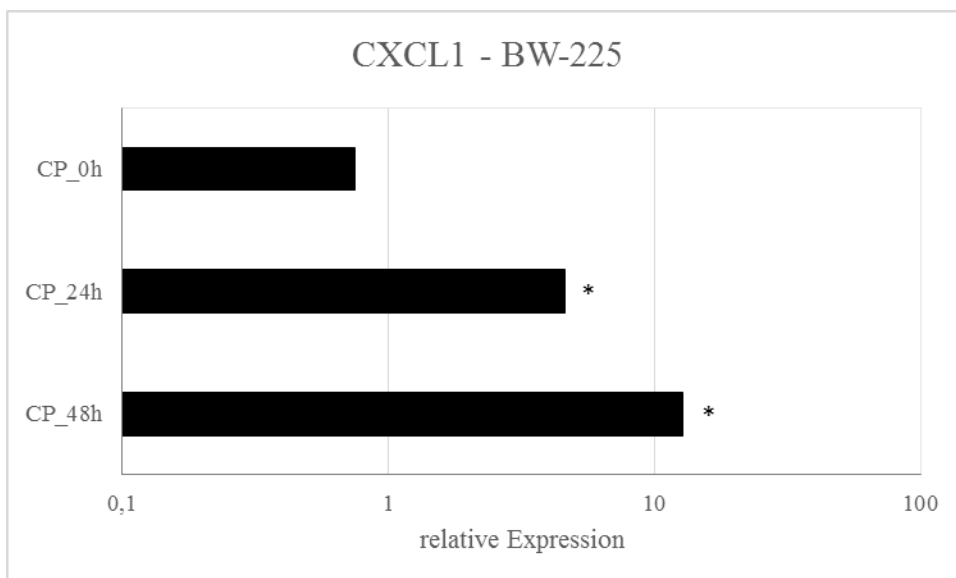


Abb. 11: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie BW-225 unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

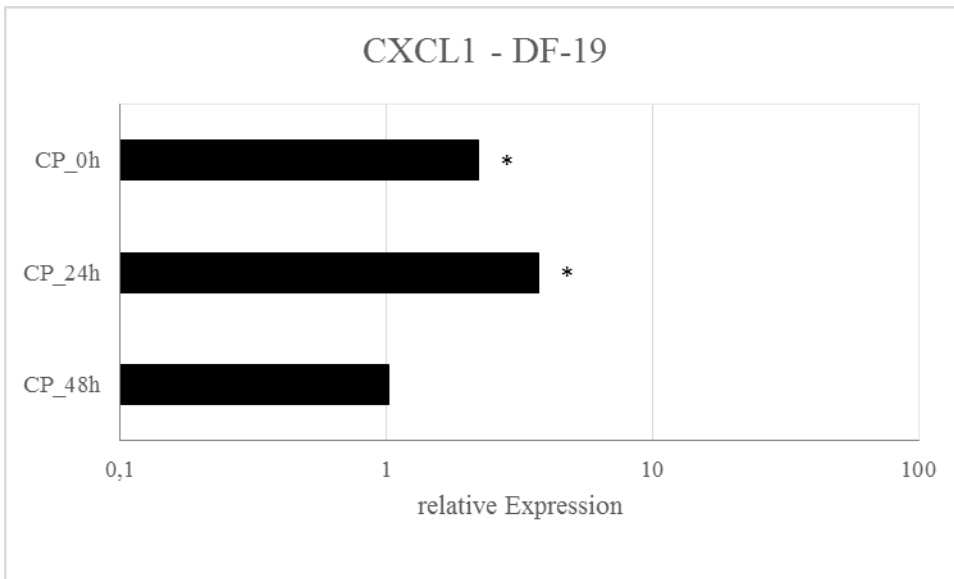


Abb. 12: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie DF-19 unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

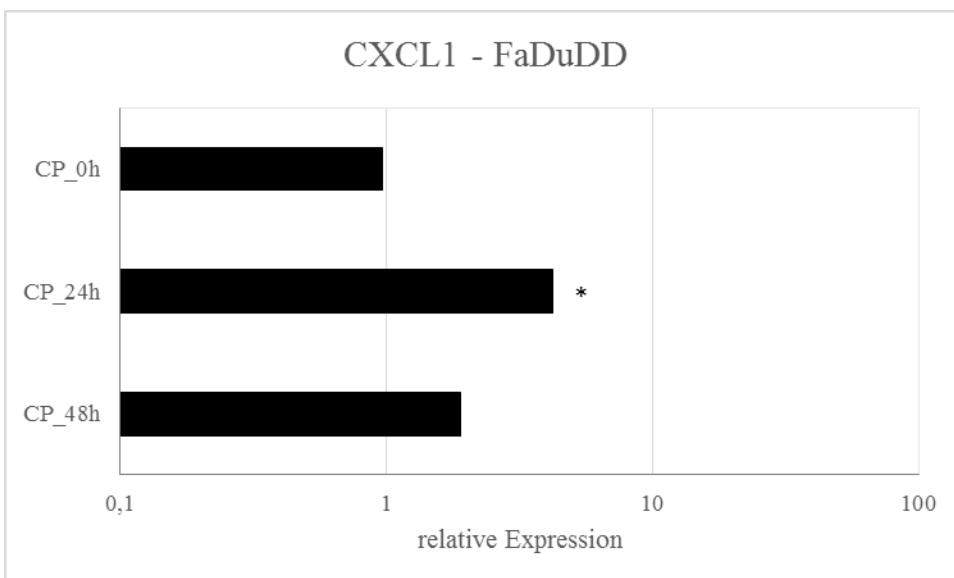


Abb. 13: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie FaDuDD unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

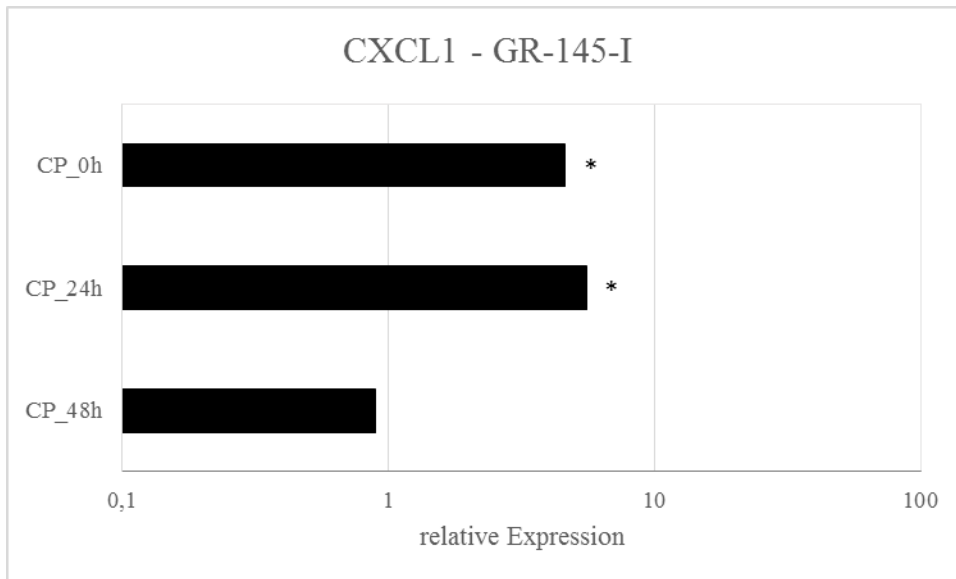


Abb. 14: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie GR-145-I unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

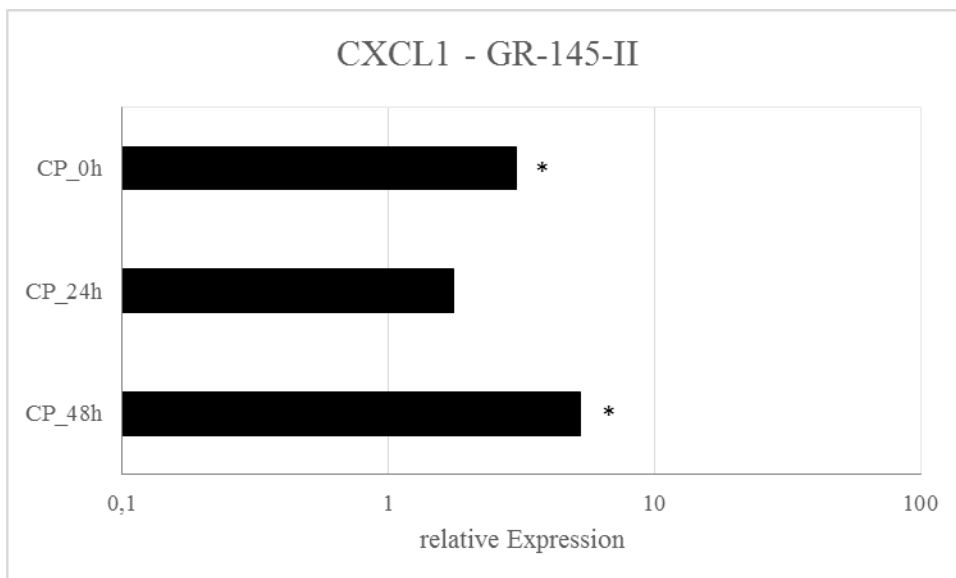


Abb. 15: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie GR-145-II unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

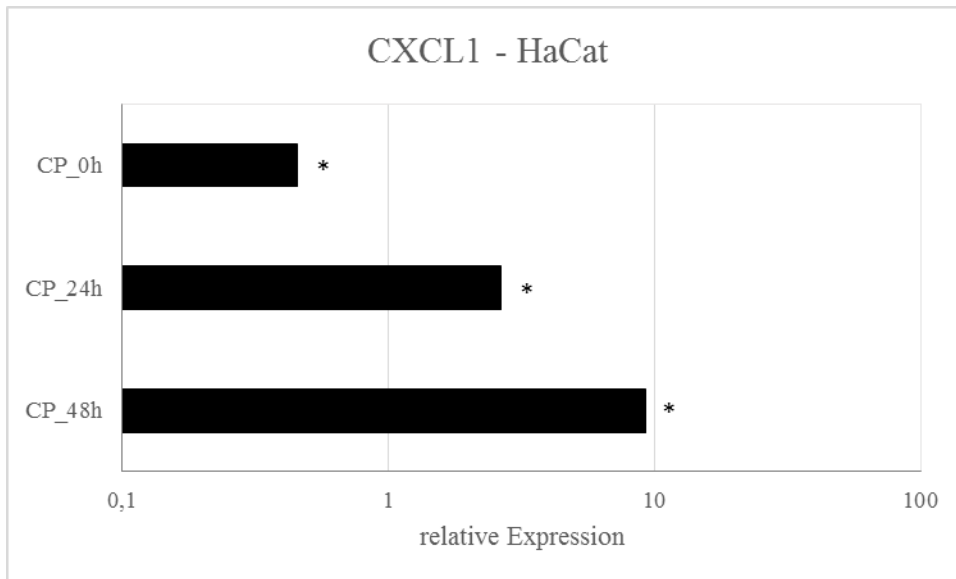


Abb. 16: Expression von CXCL1 bei der Zelllinie HaCat unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

CXCL3

Die Expression von CXCL3 erfolgte von drei Zelllinien, wobei die Expression bei den Linien BHY und FaDuDD jeweils nur zu einem Zeitpunkt gemessen werden konnte. Diese Expression ist bei der Zelllinie FaDuDD nicht signifikant verändert, während der Wert bei BHY den Wert der unbehandelten Kontrolle um ein 15-faches übersteigt.

Bei der Zellreihe ZMK-1 konnte die CXCL3-Expression zu allen drei Zeitpunkten gemessen werden, wo sie sich signifikant erhöht gegenüber der der unbehandelten Kontrollen zeigte und ihren Höhepunkt nach 24 h hatte.

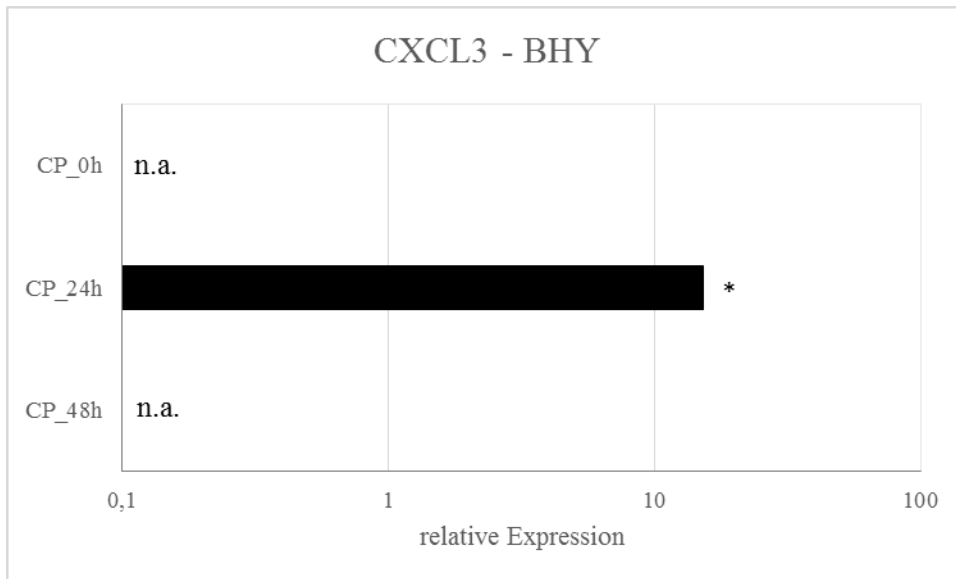


Abb. 17: Expression von CXCL3 bei der Zelllinie BHY unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

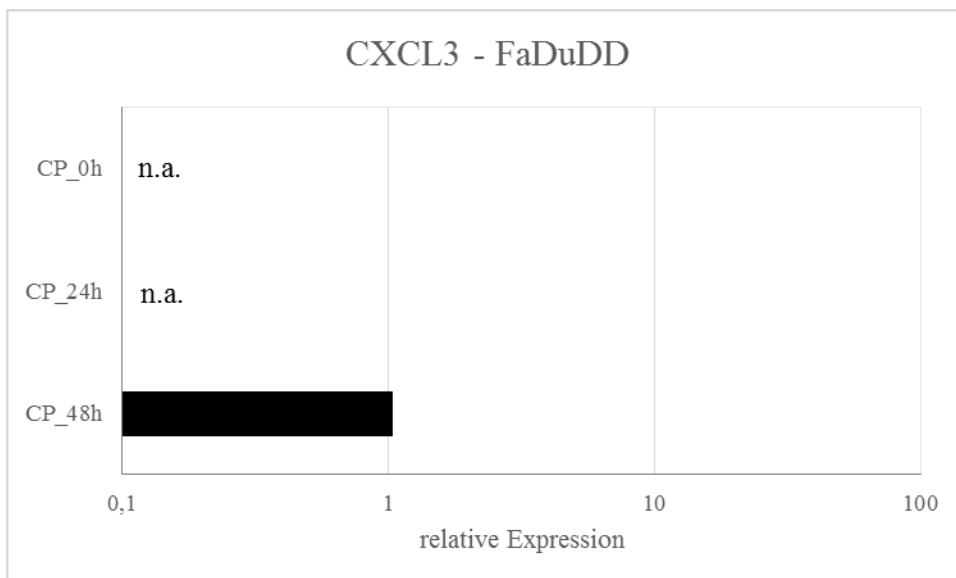


Abb. 18: Expression von CXCL3 bei der Zelllinie FaDuDD unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

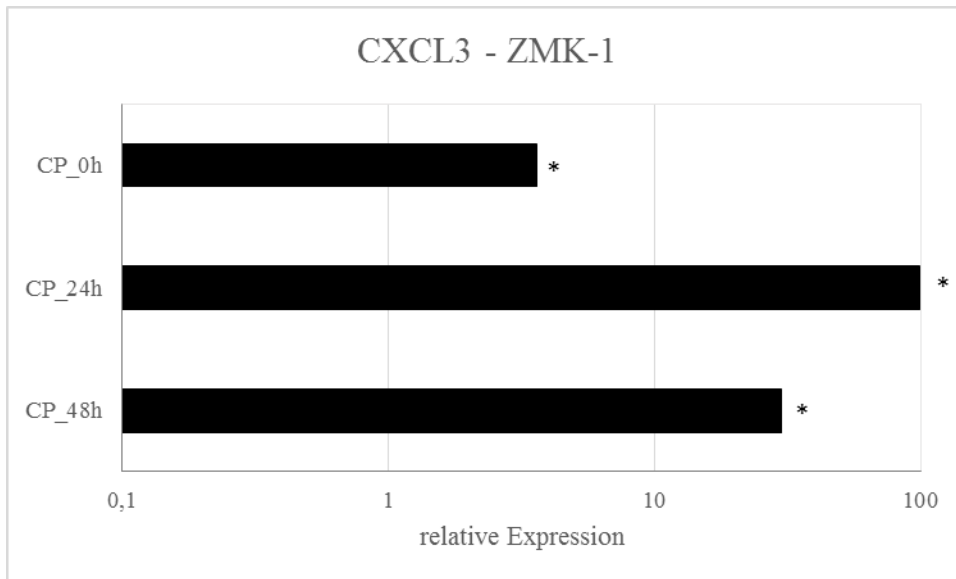


Abb. 19: Expression von CXCL3 bei der Zelllinie ZMK-1 unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

3.1.2.3 CCR6- und CCL20-Expression

CCR6

Die Expression des Chemokinrezeptors CCR6 erfolgte von den Zelllinien BHY und GR-145-II. Bei beiden Zelllinien war die Expression signifikant erniedrigt, über eine zeitliche Dynamik lässt sich aufgrund der unvollständigen Messzeitpunkte jedoch nichts aussagen.



Abb. 20: Expression von CCR6 bei der Zelllinie BHY unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

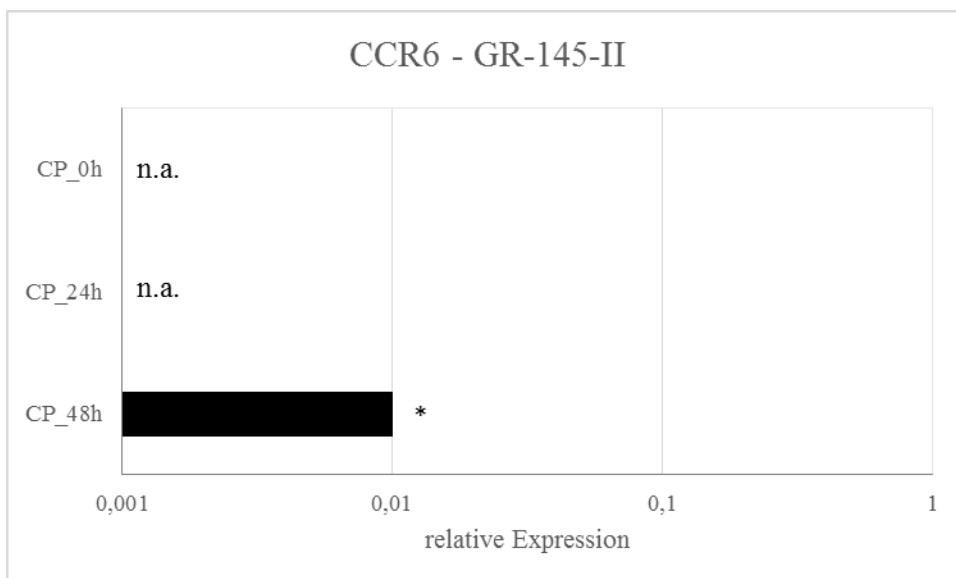


Abb. 21: Expression von CCR6 bei der Zelllinie GR-145-II unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

CCL20

CCL20 wurde von allen Zelllinien unter Cisplatinbehandlung exprimiert. Überwiegend konnte dabei eine z.T. deutliche Zunahme der CCL20-Expression beobachtet werden. Bei den Zelllinien BHY und DF-19 konnte nur eine Tendenz zur Änderung festgestellt werden, die nicht signifikant war. Die Ergebnisse der übrigen Zellreihen zeigen Abb. 23 und 25-29. Dabei zeigten HaCat und ZMK-1 über alle Zeitpunkte hinweg eine signifikante Überexpression. In FaDuDD, GR-145-I und GR-145-II war die Expression nur zu einem Zeitpunkt signifikant erhöht.

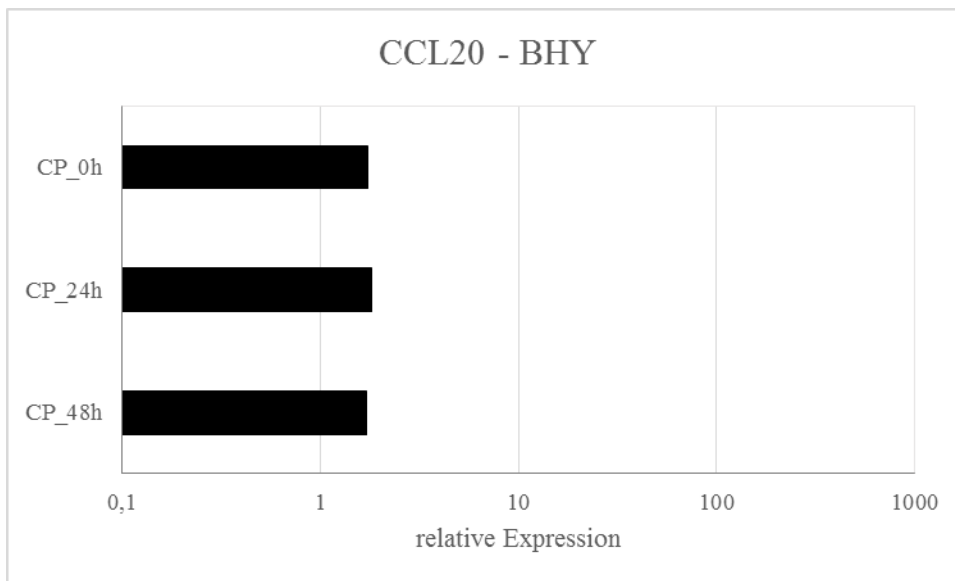


Abb. 22: Expression von CCL20 bei der Zelllinie BHY unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

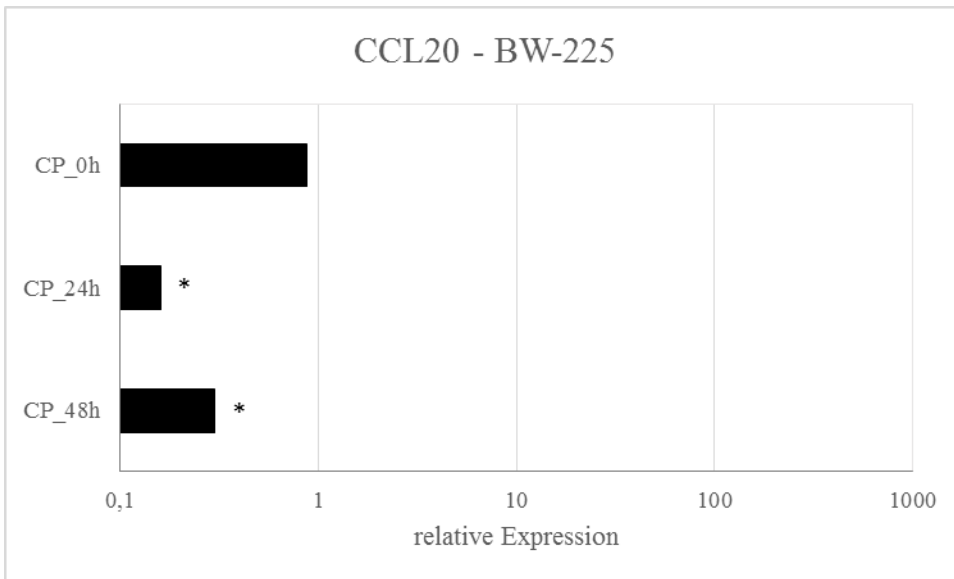


Abb. 23: Expression von CCL20 bei der Zelllinie BW-225 unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrollen.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

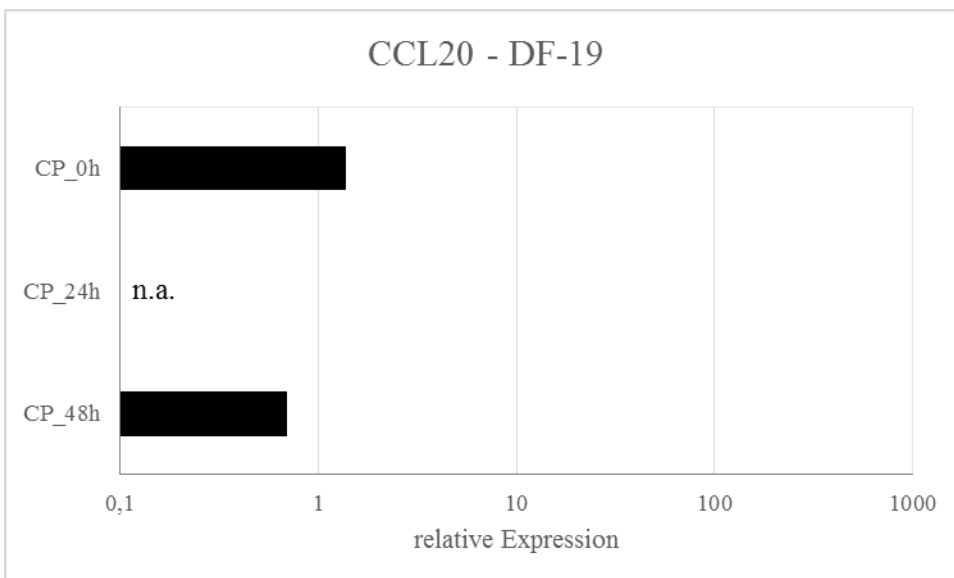


Abb. 24: Expression von CCL20 bei der Zelllinie DF-19 unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrollen.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

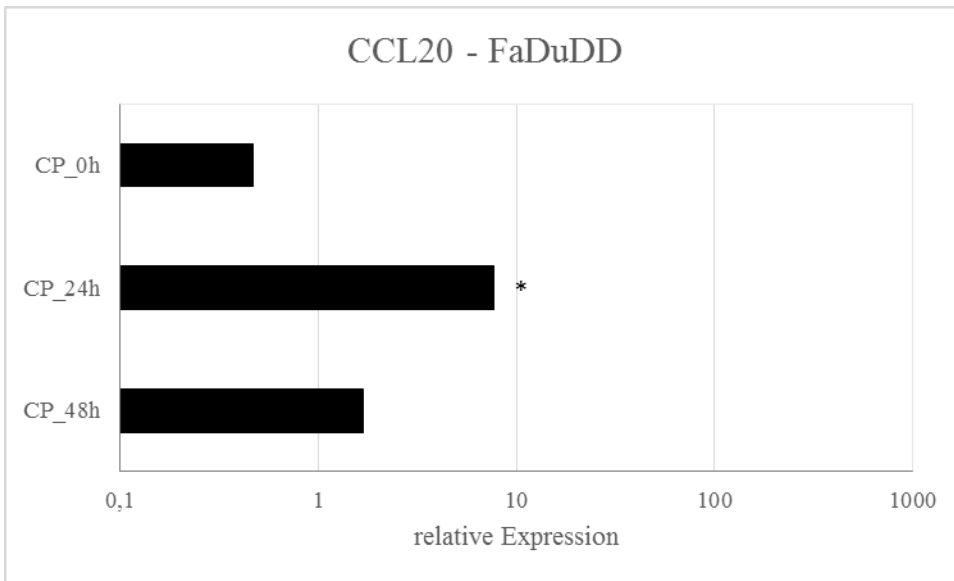


Abb. 25: Expression von CCL20 bei der Zelllinie FaDuDD unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

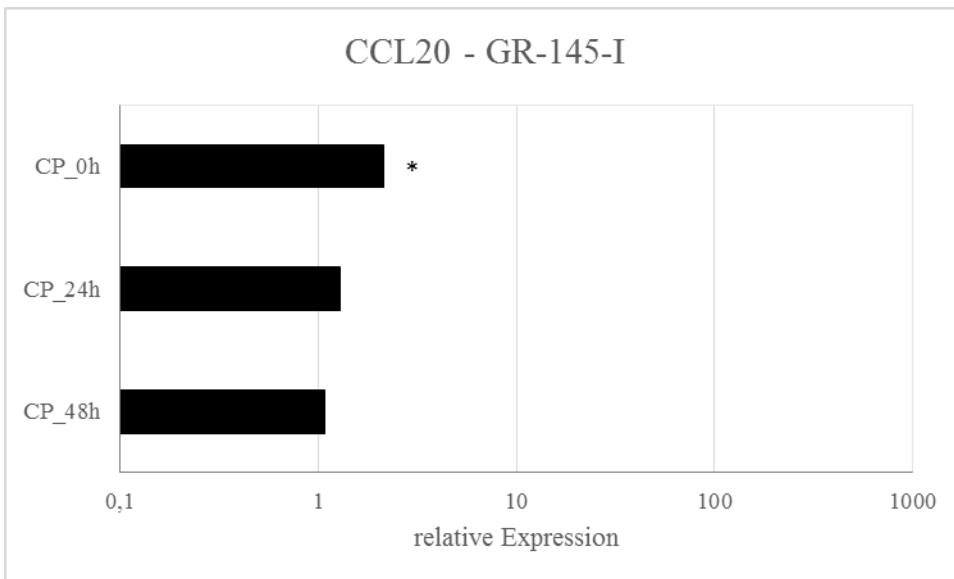


Abb. 26: Expression von CCL20 bei der Zelllinie GR-145-I unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

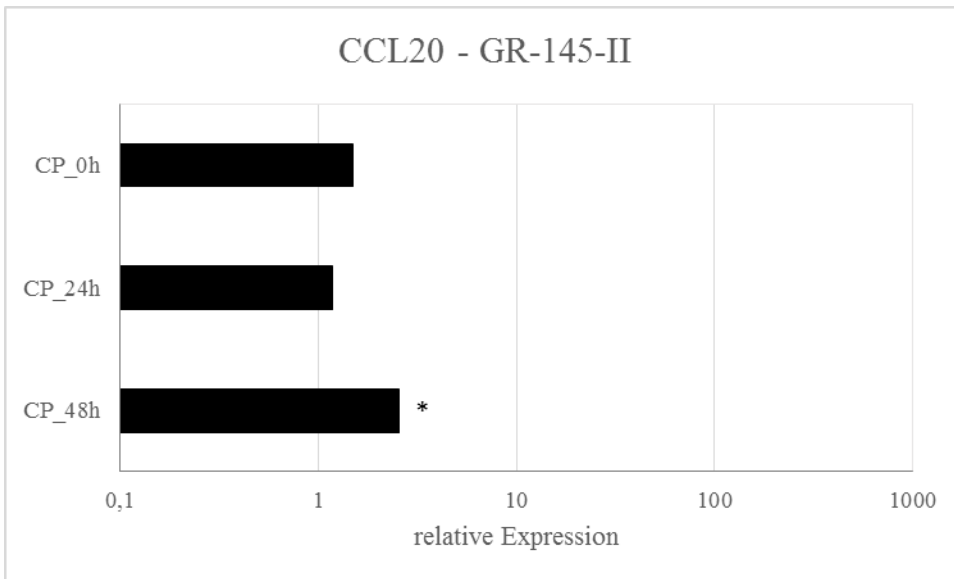


Abb. 27: Expression von CCL20 bei der Zelllinie GR-145-II unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrollen.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

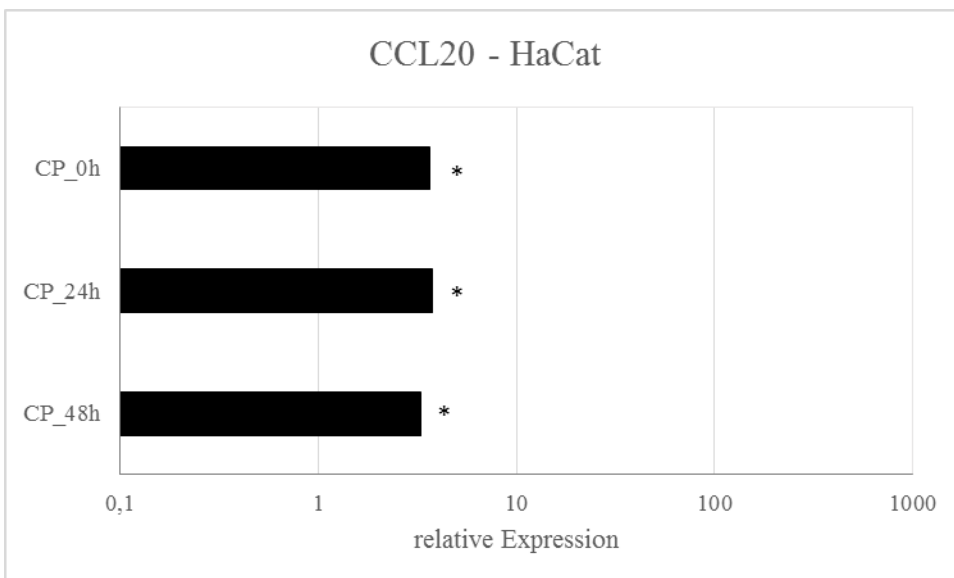


Abb. 28: Expression von CCL20 bei der Zelllinie HaCat unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrollen.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

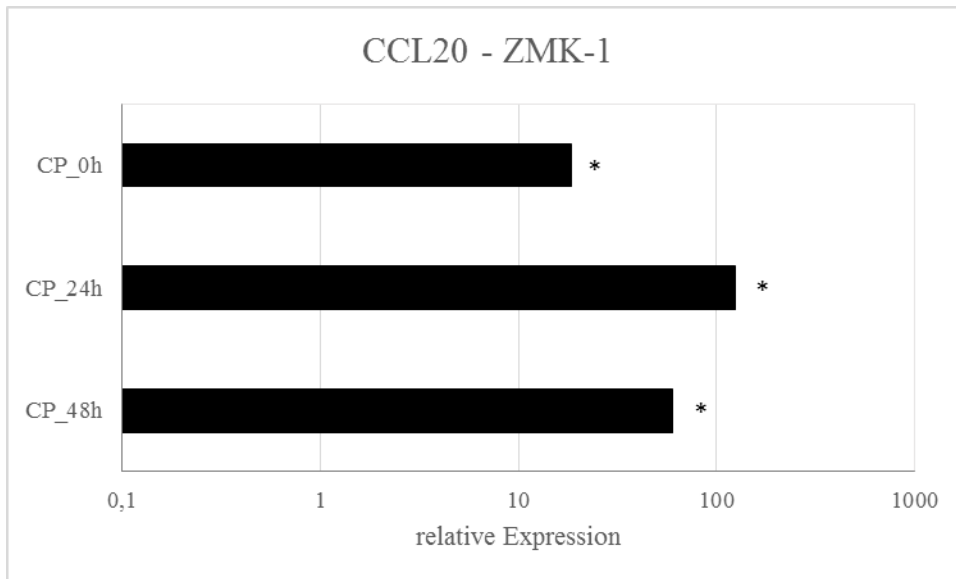


Abb. 29: Expression von CCL20 bei der Zelllinie ZMK-1 unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

3.1.2.4 CCR7-Expression

CCR7 wurde von den Tumorzelllinien BHY und ZMK-1 und von den Normalgewebe-Zelllinien HaCat und DF-19 exprimiert. Bei der Zelllinie HaCat konnte durch die Cisplatin-Therapie eine deutliche Expressionsminderung beobachtet werden. Im zeitlichen Verlauf steigt die Expression von CCR7 bei HaCat zwar wieder an, bleibt aber zu allen Zeitpunkten signifikant erniedrigt. Die Expression von CCR7 verläuft bei der anderen Normalgewebe-Zelllinie DF-19 bezüglich der Dynamik über die Zeit gegenläufig zu der von HaCat; es kommt zu einer signifikanten Expressionsminderung nach 48 h. Bei BHY und kommt es erst nach 48 h zu einer signifikanten Expressionssteigerung. ZMK-1 zeigt eine signifikante Expressionssteigerung nach 48 h, jedoch ist hier keine Aussage über eine zeitliche Dynamik möglich.

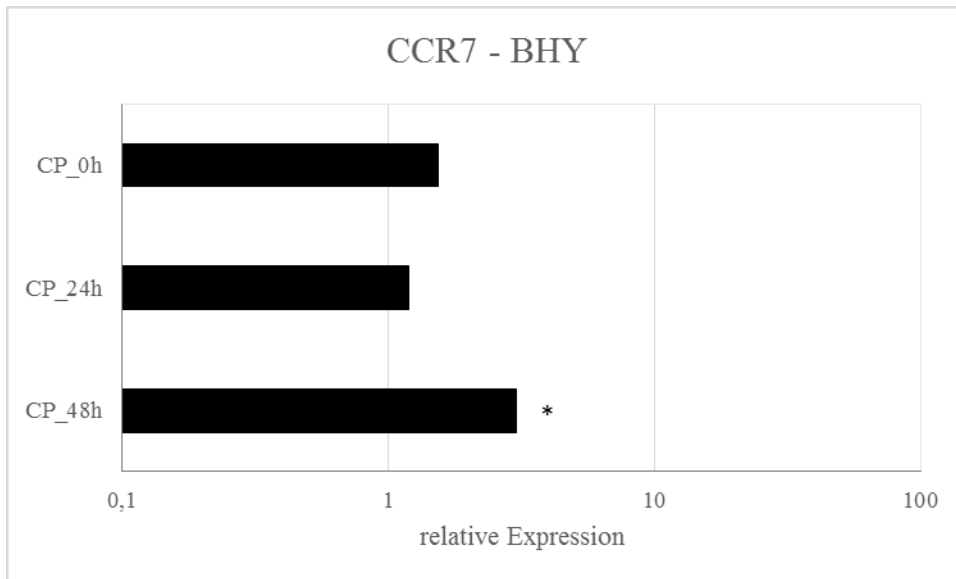


Abb. 30: Expression von CCR7 bei der Zelllinie BHY unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

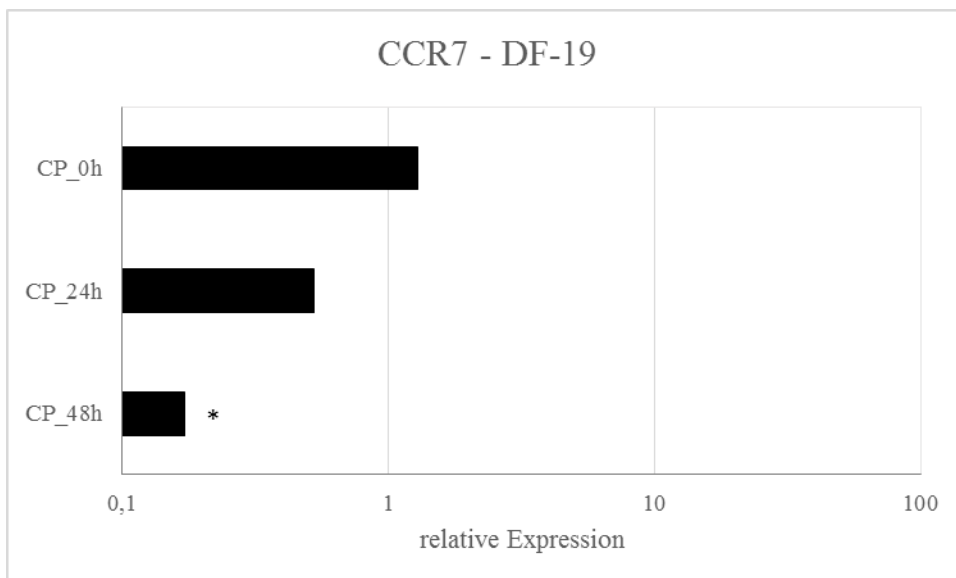


Abb. 31: Expression von CCR7 bei der Zelllinie DF-19 unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

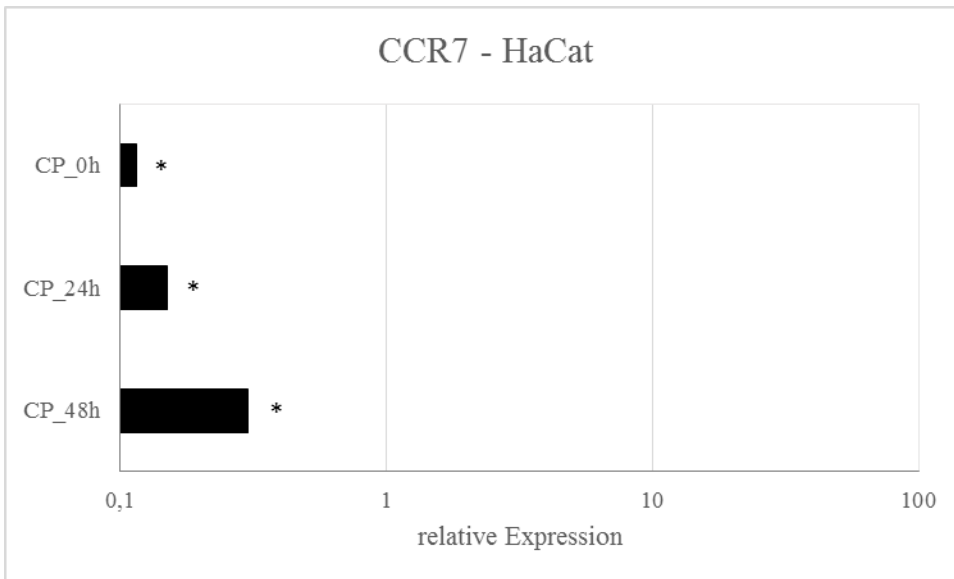


Abb. 32: Expression von CCR7 bei der Zelllinie HaCat unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

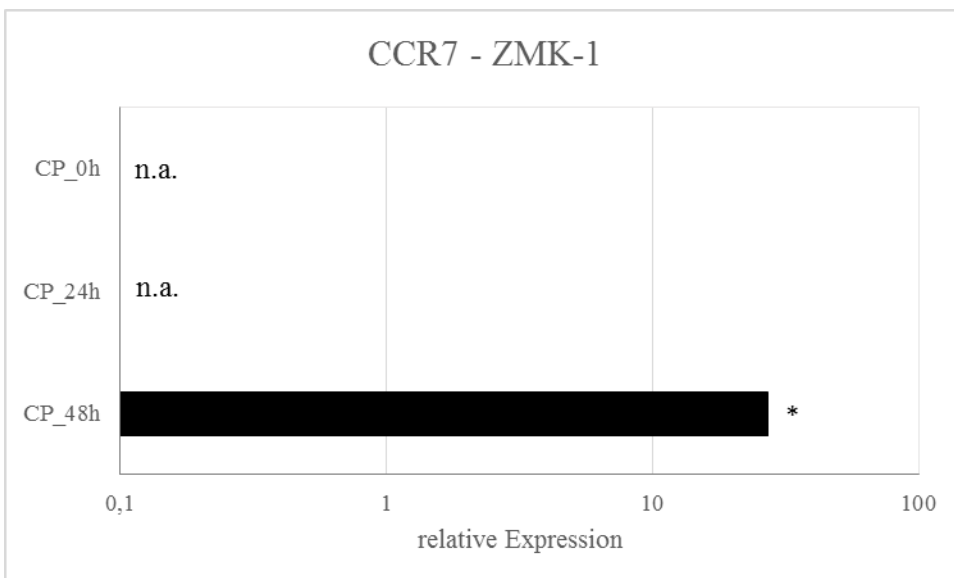


Abb. 33: Expression von CCR7 bei der Zelllinie ZMK-1 unter Cisplatin-Therapie
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Dabei entspricht der Wert „1“ der Expression der unbehandelten Kontrolle.
 Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen.
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 0 h, 24 h, 48 h = Extrahierung der RNA zum Zeitpunkt 0 (zwei Stunden nach Inkubation mit Cisplatin), 24 und 48 Stunden später
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

3.2 Einfluss der Radiochemotherapie auf das Koloniebildungsverhalten

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Koloniebildungstests dargestellt. Wie in Kap. 2.2.5 beschrieben, wurden hierzu die Hälfte der Proben mit Cisplatin vorbehandelt und anschließend alle Proben mit zunehmender Dosis bestrahlt. Die anschließend überlebenden Kolonien wurden ausgezählt und grafisch dargestellt

Alle Zelllinien weisen eine verringerte Koloniebildung nach kombinierter Therapie im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie auf. Diese stellte sich als signifikant dar.

3.2.1 Koloniebildungsversuch BHY

Die Zelllinie BHY bildete keine Kolonien, die Anfertigung einer Koloniebildungskurve war nicht möglich.

3.2.2 Koloniebildungsversuch BW-225

Bei der kombinierten Strahlentherapie erkennt man bei BW-225 eine verminderte Koloniebildung durch die Chemotherapie sowie eine verminderte Koloniebildung durch die zunehmende Strahlendosis.

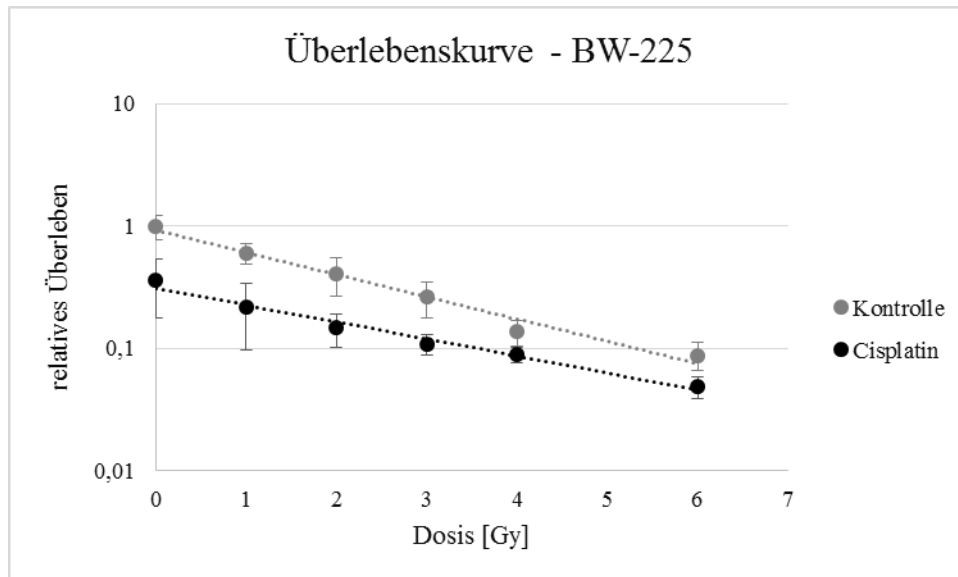


Abb. 34: Koloniebildungstest BW-225

Ordinate: Logarithmische Darstellung des relativen Überlebens der zuvor ausgeimpften Zellen mit bzw. ohne vorherige Cisplatin-Therapie. Abszisse: Dosis in Gray. Normierung auf die unbehandelte Kontrolle.

Tab. 16: Werte der Koloniebildungstests von BW-225

Dosis [Gy]	Kontrolle	SD-Kontrolle	Cisplatin	SD-Cisplatin	t-Wert	p-Wert
0	1,000	0,222	0,358	0,181	5,903	0,00010
1	0,603	0,119	0,218	0,121	5,868	0,00011
2	0,410	0,142	0,147	0,045	5,007	0,00040
3	0,263	0,084	0,109	0,020	5,506	0,00018
4	0,137	0,033	0,090	0,013	4,346	0,00116
6	0,088	0,023	0,049	0,010	5,736	0,00013

Kontrolle = Mittelwert des Überlebens Zellen mit alleiniger Radiotherapie

SD-Kontrolle = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit alleiniger Radiotherapie

Cisplatin = Mittelwert des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

SD-Cisplatin = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

3.2.3 Koloniebildungsversuch DF-19

Bei der Normalgewebslinie DF-19 zeigt sich ein geringerer Cisplatin-Effekt, die Unterschiede der kombinierten Therapie und zur alleinigen Radiotherapie sind hier geringer ausgeprägt als bei den Tumorzellreihen.

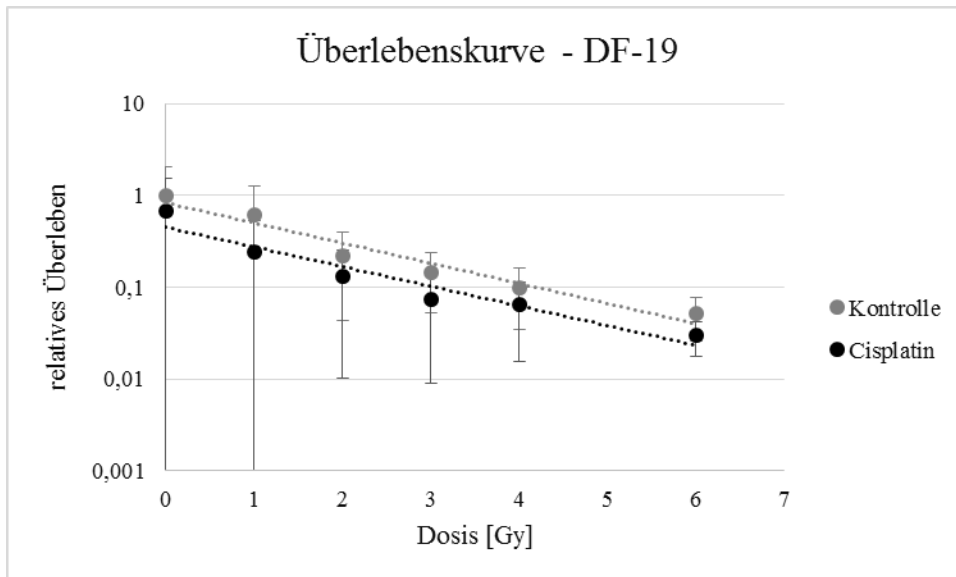


Abb. 35: Koloniebildungstest DF-19

Ordinate: Logarithmische Darstellung des relativen Überlebens der zuvor ausgeimpften Zellen mit bzw. ohne vorherige Cisplatin-Therapie. Abszisse: Dosis in Gray. Normierung auf die unbehandelte Kontrolle.

Tab. 17: Werte der Koloniebildungstests von DF-19

Dosis [Gy]	Kontrolle	SD-Kontrolle	Cisplatin	SD-Cisplatin	t-Wert	p-Wert
0	1,000	1,066	0,676	0,842	4,593	0,000774
1	0,620	0,662	0,246	0,291	3,425	0,005674
2	0,220	0,178	0,132	0,122	4,783	0,000568
3	0,147	0,094	0,075	0,066	5,112	0,000337
4	0,099	0,065	0,065	0,049	4,901	0,000471
6	0,052	0,026	0,030	0,012	4,868	0,000496

Kontrolle = Mittelwert des Überlebens Zellen mit alleiniger Radiotherapie

SD-Kontrolle = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit alleiniger Radiotherapie

Cisplatin = Mittelwert des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

SD-Cisplatin = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

3.2.4 Koloniebildungsversuch FaDuDD

Bei der Zelllinie FaDuDD zeigen sich insbesondere bei der kombinierten Therapie hohe Variabilitäten der Koloniebildung. Trotzdem zeigen sich auch hier annähernd parallel verlaufende Trendlinien der verschiedenen Therapien.

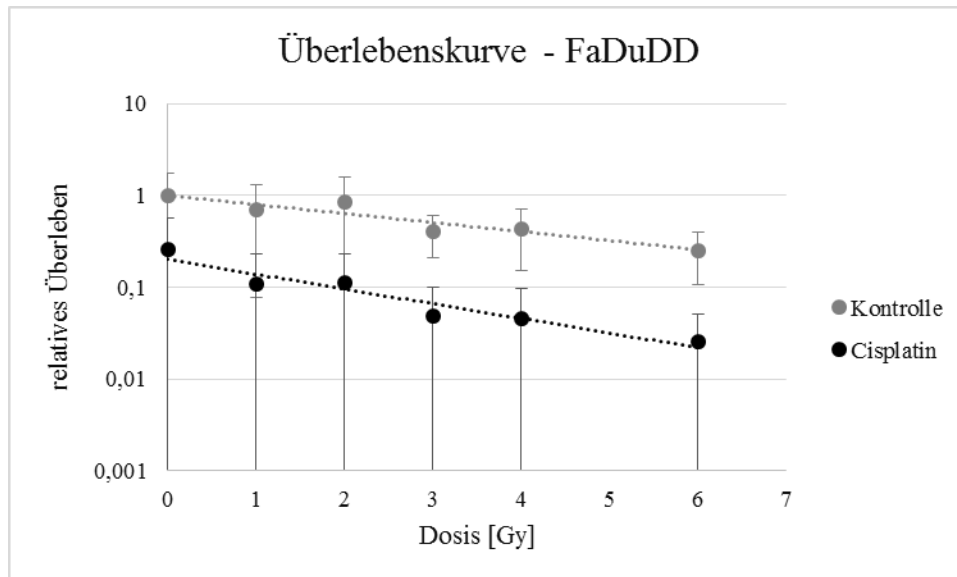


Abb. 36: Koloniebildungstest FaDuDD

Ordinate: Logarithmische Darstellung des relativen Überlebens der zuvor ausgeimpften Zellen mit bzw. ohne vorherige Cisplatin-Therapie. Abszisse: Dosis in Gray. Normierung auf die unbehandelte Kontrolle.

Tab. 18: Werte der Koloniebildungstests von FaDuDD

Dosis [Gy]	Kontrolle	SD-Kontrolle	Cisplatin	SD-Cisplatin	t-Wert	p-Wert
0	1,000	0,765	0,262	0,309	5,547	0,000174
1	0,703	0,625	0,107	0,124	3,984	0,002145
2	0,848	0,743	0,111	0,122	4,057	0,001893
3	0,407	0,195	0,049	0,052	7,893	0,000007
4	0,436	0,282	0,046	0,052	5,662	0,000146
6	0,253	0,146	0,025	0,026	6,201	0,000067

Kontrolle = Mittelwert des Überlebens Zellen mit alleiniger Radiotherapie

SD-Kontrolle = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit alleiniger Radiotherapie

Cisplatin = Mittelwert des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

SD-Cisplatin = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

3.2.5 Koloniebildungsversuch GR-145-I

Bei GR-145-I ist der Unterschied zwischen den Trendlinien der Radiochemotherapie und Strahlentherapie weniger ausgeprägt als bei anderen Zellreihen, da die Cisplatin-Therapie einen vergleichsweise geringen Effekt auf die Koloniebildung ausmacht.

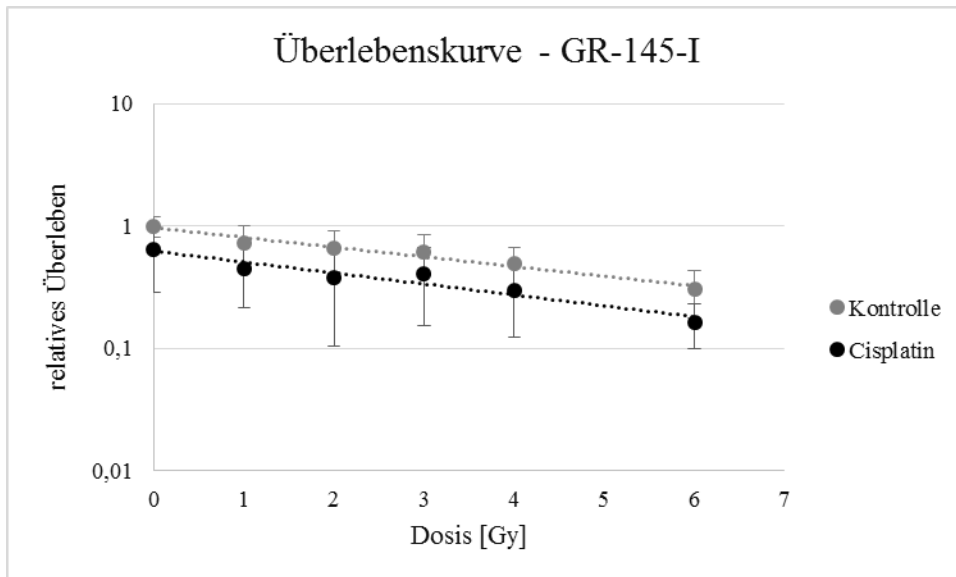


Abb. 37: Koloniebildungstest GR-145-I

Ordinate: Logarithmische Darstellung des relativen Überlebens der zuvor ausgeimpften Zellen mit bzw. ohne vorherige Cisplatin-Therapie. Abszisse: Dosis in Gray. Normierung auf die unbehandelte Kontrolle.

Tab. 19: Werte der Koloniebildungstests von GR-145-I

Dosis [Gy]	Kontrolle	SD-Kontrolle	Cisplatin	SD-Cisplatin	t-Wert	p-Wert
0	1,000	0,189	0,650	0,360	5,516	0,000182
1	0,728	0,285	0,450	0,235	7,023	0,000022
2	0,664	0,255	0,378	0,273	6,497	0,000044
3	0,619	0,223	0,409	0,257	8,928	0,000002
4	0,489	0,175	0,296	0,172	6,173	0,000070
6	0,307	0,130	0,165	0,065	6,887	0,000026

Kontrolle = Mittelwert des Überlebens Zellen mit alleiniger Radiotherapie

SD-Kontrolle = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit alleiniger Radiotherapie

Cisplatin = Mittelwert des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

SD-Cisplatin = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

3.2.6 Koloniebildungsversuch GR-145-II

Bei der Zellreihe GR-145-II zeigt sich bereits durch die Cisplatin-Therapie eine Halbierung der Koloniebildung. Die um circa die Hälfte verminderte Koloniebildung ist bei allen Strahlendosen zu beobachten.

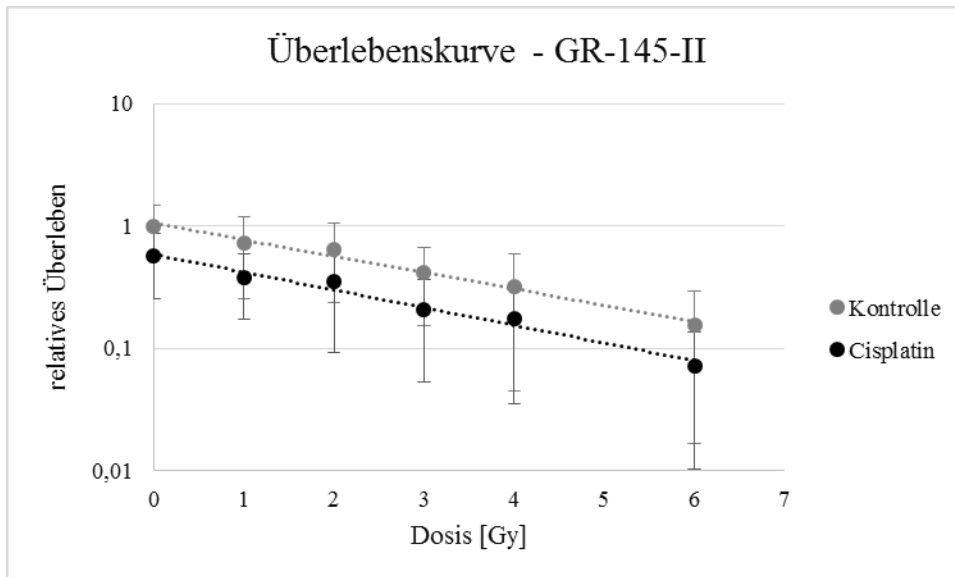


Abb. 38: Koloniebildungstest GR-145-II

Ordinate: Logarithmische Darstellung des relativen Überlebens der zuvor ausgeimpften Zellen mit bzw. ohne vorherige Cisplatin-Therapie. Abszisse: Dosis in Gray. Normierung auf die unbehandelte Kontrolle.

Tab. 20: Werte der Koloniebildungstests von GR-145-II

Dosis [Gy]	Kontrolle	SD-Kontrolle	Cisplatin	SD-Cisplatin	t-Wert	p-Wert
0	1,000	0,466	0,565	0,309	7,727	0,000009
1	0,728	0,475	0,380	0,206	4,326	0,001202
2	0,649	0,413	0,349	0,255	5,497	0,000187
3	0,414	0,259	0,208	0,155	6,024	0,000086
4	0,321	0,276	0,174	0,138	3,643	0,003865
6	0,156	0,140	0,072	0,062	3,486	0,005092

Kontrolle = Mittelwert des Überlebens Zellen mit alleiniger Radiotherapie

SD-Kontrolle = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit alleiniger Radiotherapie

Cisplatin = Mittelwert des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

SD-Cisplatin = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

3.2.7 Koloniebildungsversuch HaCat

Einen im Vergleich nur sehr geringen Effekt der Cisplatin-Therapie ist bei der Zelllinie HaCat zu beobachten. Bei der Normalgewebslinie ist zusätzlich auch der Effekt der Strahlentherapie und der kombinierten Radiochemotherapie geringer als bei den Tumorzellreihen.

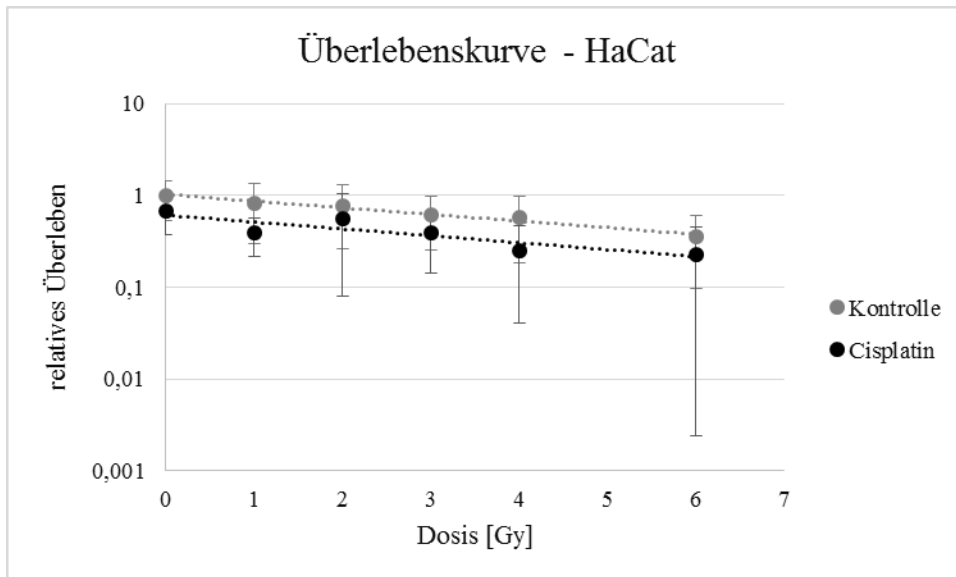


Abb. 39: Koloniebildungstest HaCat

Ordinate: Logarithmische Darstellung des relativen Überlebens der zuvor ausgeimpften Zellen mit bzw. ohne vorherige Cisplatin-Therapie. Abszisse: Dosis in Gray. Normierung auf die unbehandelte Kontrolle.

Tab. 21 Werte der Koloniebildungstests von HaCat

Dosis [Gy]	Kontrolle	SD-Kontrolle	Cisplatin	SD-Cisplatin	t-Wert	p-Wert
0	1,000	0,464	0,673	0,297	4,929	0,000450
1	0,829	0,526	0,389	0,173	4,228	0,001417
2	0,781	0,517	0,555	0,475	8,042	0,000006
3	0,614	0,359	0,391	0,247	5,455	0,000199
4	0,579	0,393	0,253	0,213	4,540	0,000843
6	0,354	0,256	0,229	0,227	7,441	0,000013

Kontrolle = Mittelwert des Überlebens Zellen mit alleiniger Radiotherapie

SD-Kontrolle = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit alleiniger Radiotherapie

Cisplatin = Mittelwert des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

SD-Cisplatin = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

3.2.8 Koloniebildungsversuch ZMK-1

Einen sehr ausgeprägten Unterschied zwischen Radiotherapie und Radiochemotherapie lässt sich bei der Zellreihe ZMK-1 nachweisen. Die Chemotherapie bewirkt bereits eine deutliche Reduktion der Koloniebildung der unbestrahlten Kontrollen. Dieser Effekt wird jedoch nicht durch die zusätzliche Strahlendosis verstärkt.

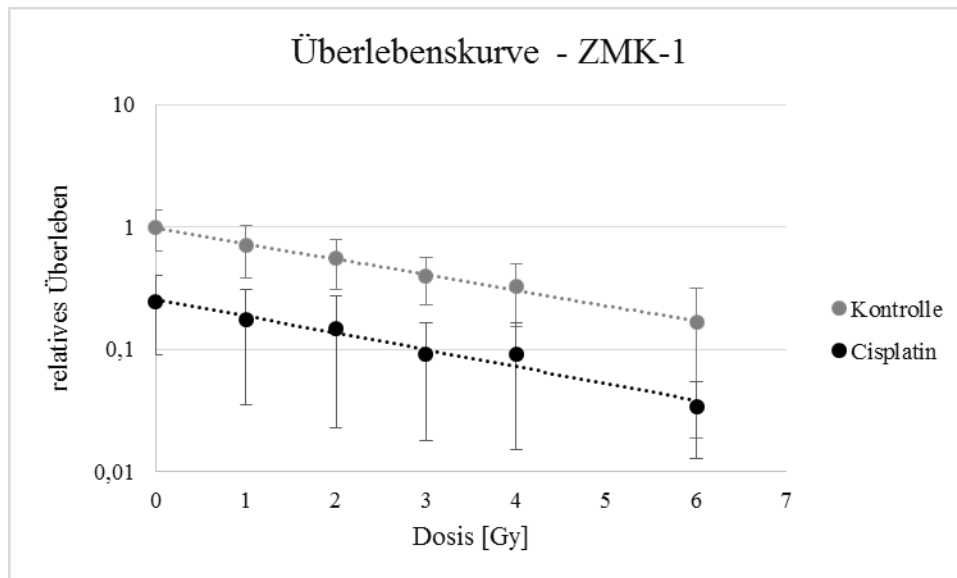


Abb. 40: Koloniebildungstest ZMK-1

Ordinate: Logarithmische Darstellung des relativen Überlebens der zuvor ausgeimpften Zellen mit bzw. ohne vorherige Cisplatin-Therapie. Abszisse: Dosis in Gray. Normierung auf die unbehandelte Kontrolle.

Tab. 22: Werte der Koloniebildungstests von ZMK-1

Dosis [Gy]	Kontrolle	SD-Kontrolle	Cisplatin	SD-Cisplatin	t-Wert	p-Wert
0	1,000	0,368	0,248	0,158	11,297	0,0000002
1	0,703	0,318	0,174	0,139	9,776	0,0000009
2	0,552	0,244	0,150	0,127	11,595	0,0000002
3	0,397	0,168	0,091	0,073	10,723	0,0000004
4	0,325	0,171	0,091	0,076	7,822	0,0000081
6	0,166	0,147	0,034	0,021	3,324	0,0067811

Kontrolle = Mittelwert des Überlebens Zellen mit alleiniger Radiotherapie

SD-Kontrolle = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit alleiniger Radiotherapie

Cisplatin = Mittelwert des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

SD-Cisplatin = Standardabweichung des Überlebens der Zellen mit kombinierter Radiochemotherapie

3.3 Expression der Chemokinliganden und –rezeptoren unter Radiochemotherapie

Die Effekte der alleinigen Radiotherapie wurden bereits von Wolff et al. beschrieben (Wolff et al. 2011b). Die folgenden Diagramme beleuchten nun die Auswirkungen der kombinierten Radiochemotherapie im Vergleich zu der alleinigen Radiotherapie. Alle Werte wurden zu diesem Zwecke bereits auf die Kontrollproben, die weder Radio- noch Chemotherapie erhalten haben, bezogen. Es handelt sich also um relative Expressionsdaten, welche auf der Abszisse aufgetragen sind.

Auf der Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte der Messung und die jeweilige Therapie aufgetragen. Im direkten Vergleich sind dabei immer die Werte der alleinigen Radiotherapie (grau gefärbte Balken) gegenüber der kombinierten Radiochemotherapie (schwarz gefärbte Balken) aufgetragen. Eine Markierung der Balken mit einer Klammer zeigt dabei eine signifikant unterschiedliche Expression der Radiotherapie im Vergleich zur Radiochemotherapie an.

Auf der Abszisse ist die relative Expression des jeweilig gemessenen Gens aufgetragen. Ein Wert von 1 bedeutet dabei eine Expression, die der Expression der unbehandelten Proben entspricht gleich.

3.3.1 CXCR4- und CXCL12-Expression CXCR4

Die Steigerung der Expression, die bei der isolierten Chemotherapie für CXCR4 beobachtbar war, lässt sich ebenfalls bei der kombinierten Radiochemotherapie feststellen. Allerdings wird dieser Chemokinrezeptor nur von den drei Zelllinien BW-225, FaDuDD und ZMK-1 exprimiert. Bei allen drei Zellreihen ist eine deutliche Expressionssteigerung gegenüber den unbehandelten Kontrollen zu sehen.

Bei der Zellreihe ZMK-1 findet sich zu allen Zeitpunkten eine signifikante Expressionssteigerung von CXCR4 (Abb. 43). Bei der Ziellinie FaDuDD findet sich – mit Ausnahme des 3-Stunden-Wertes – ebenfalls eine signifikante Mehrexpression. Bei BW-225 findet sich eine Expressionssteigerung nach 24 und 28 Stunden. Auffällig ist eine signifikante Verminderung der Expression nach drei Stunden.

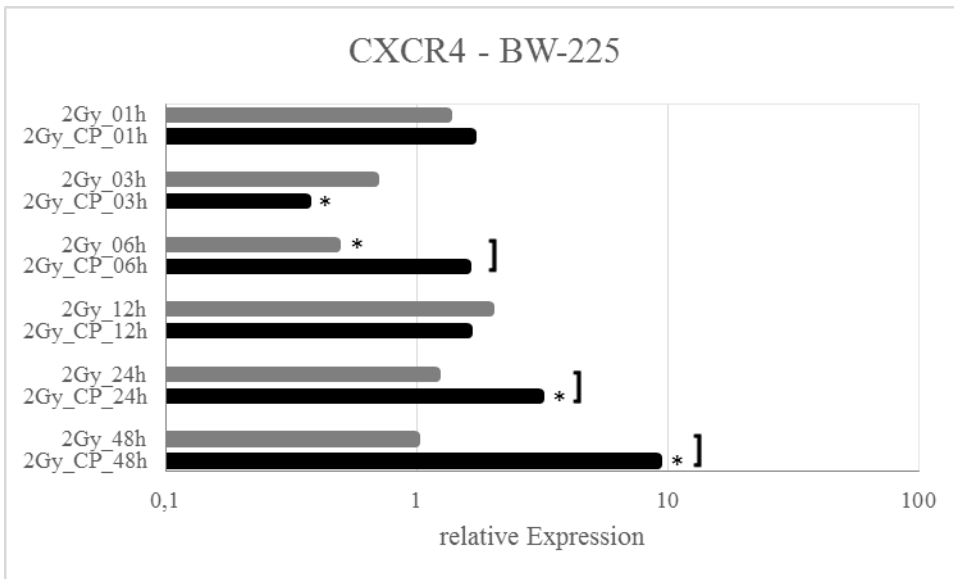


Abb. 41: Darstellung der Expression von CXCR4 bei der Zelllinie BW-225
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.
 2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle
] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

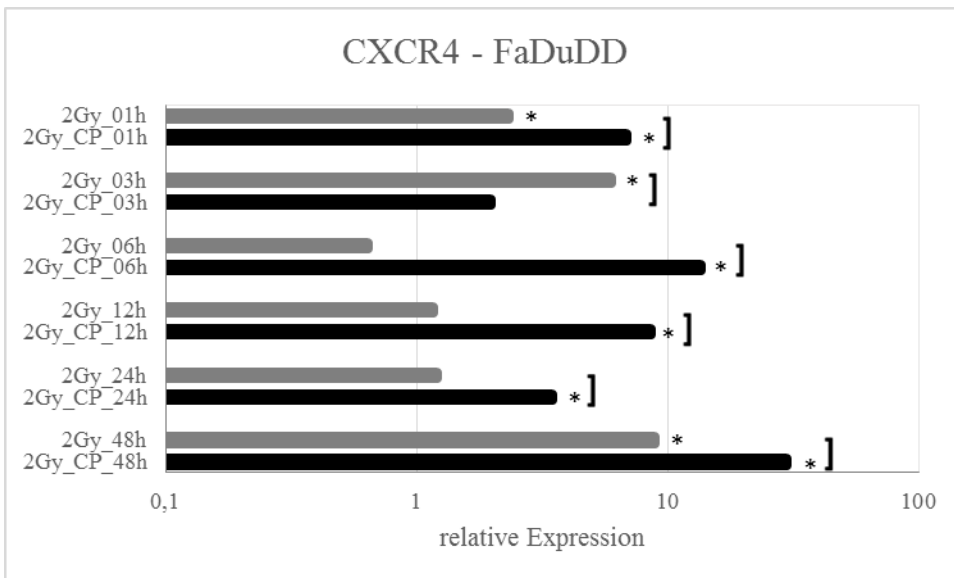


Abb. 42: Darstellung der Expression von CXCR4 bei der Zelllinie FaDuDD
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.
 2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle
] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

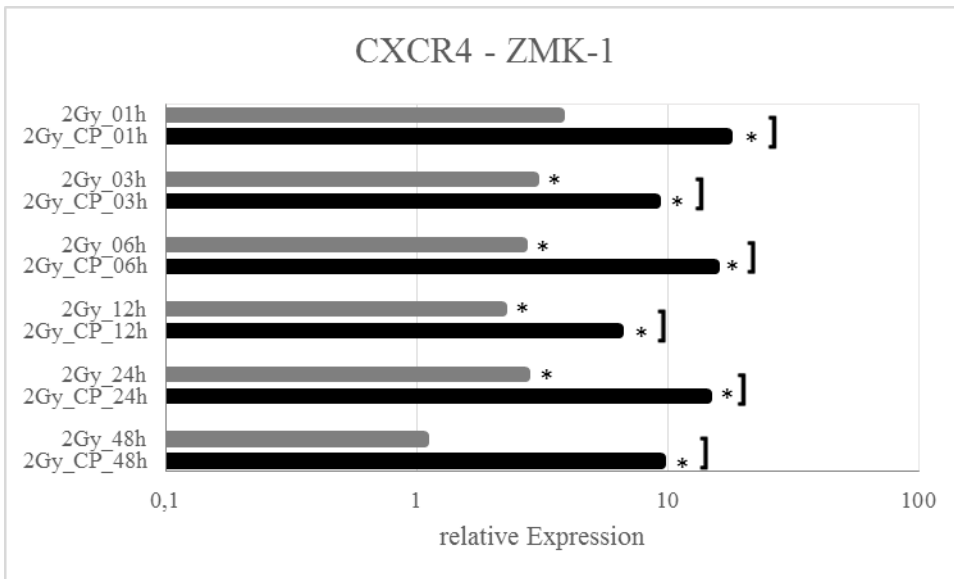


Abb. 43: Darstellung der Expression von CXCR4 bei der Zelllinie ZMK-1
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

CXCL12

Auch CXCL12 wurde nur von drei Zelllinien exprimiert. Während bei GR-145-I die Expression stärker als die der unbehandelten Kontrollen war, blieb die Expression von CXCL12 bei BW-225 und DF-19 unter der der Kontrollen. Im zeitlichen Verlauf blieb die Expression wie auch schon bei der alleinigen Chemotherapie relativ konstant.

Im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie wurde die Expression durch die kombinierte Therapie bei BW-225 und DF-19 herabgesetzt, während die Expression von CXCL12 durch die Radiochemotherapie bei GR-145-I deutlich gesteigert wurde.

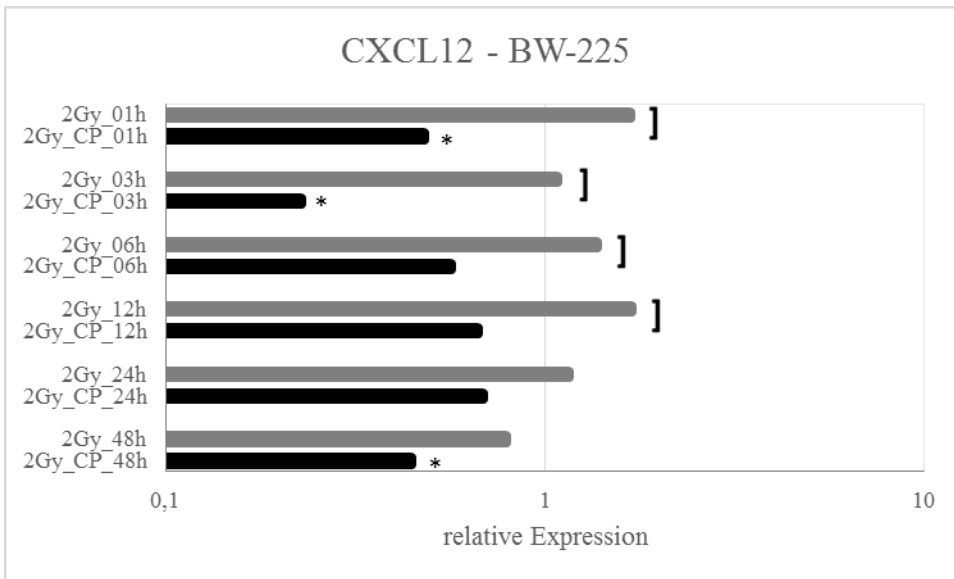


Abb. 44: Darstellung der Expression von CXCL12 bei der Zelllinie BW-225
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

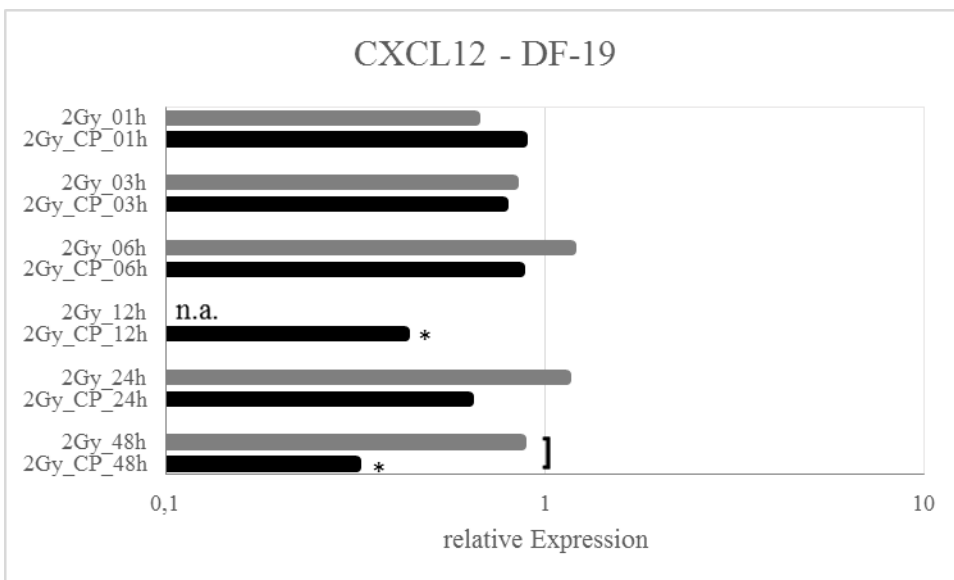


Abb. 45: Darstellung der Expression von CXCL12 bei der Zelllinie DF-19
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

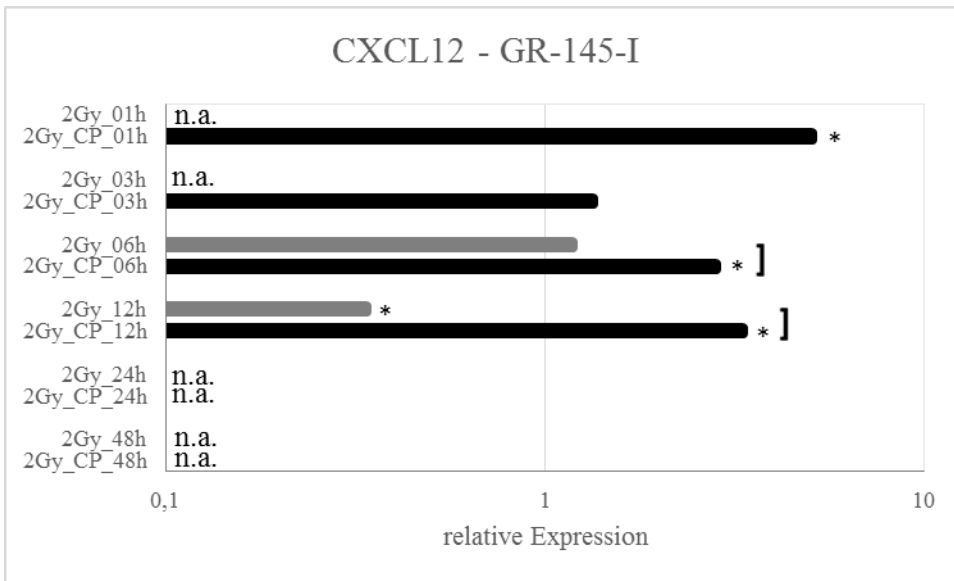


Abb. 46: Darstellung der Expression von CXCL12 bei der Zelllinie GR-145-I
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.
 2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle
] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

3.3.2 CXCR1-, CXCL1- und CXCL3-Expression

CXCR1

CXCR1 wurde von der Zelllinie HaCat exprimiert. Diese Werte lagen signifikant unter denen der unbehandelten Kontrollen. Im zeitlichen Verlauf sowie im Vergleich mit den nur mit Radiotherapie behandelten Proben konnten keine klaren Tendenzen beobachtet werden.

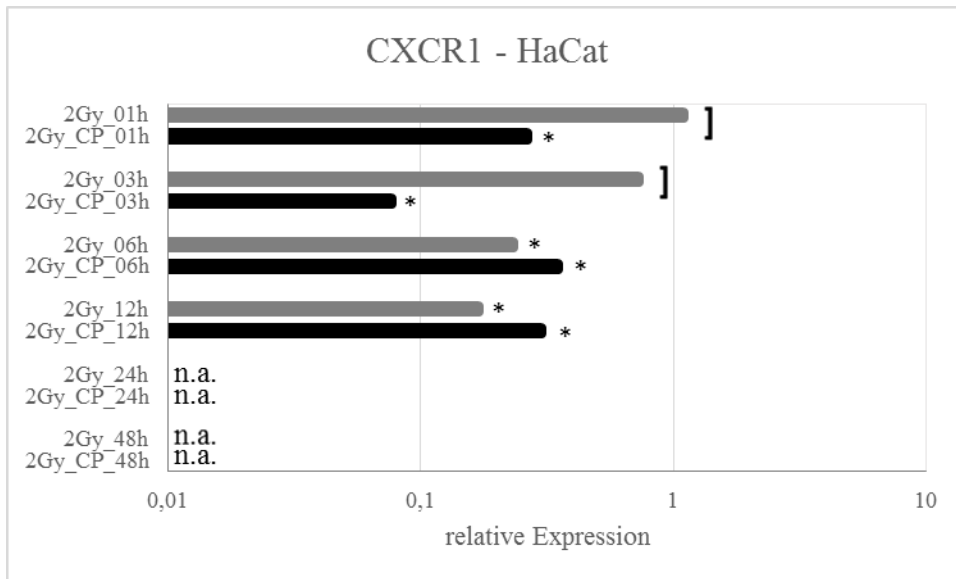


Abb. 47: Darstellung der Expression von CXCR1 bei der Zelllinie HaCat
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

CXCL1

CXCL1 wurde von den Tumorzelllinien BHY, BW-225, FaDuDD, GR-145-I und GR-145-II sowie den Normalgewebslinien HaCat und DF-19 exprimiert.

Bei GR-145-II ist CXCL1 zu allen Zeitpunkten signifikant überexprimiert (Abb. 53).

Ähnliches gilt für GR-145-I. Hier ist jedoch ein leichter Abfall der Expression über die Zeit zu beobachten. Tendenziell kann eine Mehrexpression auch für BHY und bei der Zellreihe HaCat für vier von sechs Zeitpunkten festgestellt werden.

Bei der Zelllinie BW-225 finden sich gegensätzliche Ergebnisse; zunächst ist eine signifikante Minderepression von CXCL1 an den Zeitpunkten 1 h, 3 h und 12 h zu beobachten, bei den Zeitpunkten 24 h und 48 h zeigt sich jedoch eine signifikante Mehrexpression.

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen war die Expression durch die kombinierte Radiochemotherapie nicht signifikant abgeschwächt teilweise jedoch stark erhöht. Bei folgenden Zelllinien konnte keine Expressionsänderung im zeitlichen Verlauf deutlich werden: BHY, DF-19, GR-145-II und HaCat. Bei den Zellreihen BW-225 und FaDuDD konnte über die Zeit eine Expressionssteigerung, bei der Zelllinie GR-145-I konnte eine Expressionsminderung beobachtet werden.

Die kombinierte Radiochemotherapie bewirkte im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie eine vermehrte Expression von CXCL1. Vor allem bei der Messung nach 24 bis 48 Stunden ist eine stärkere Expression zu beobachten.

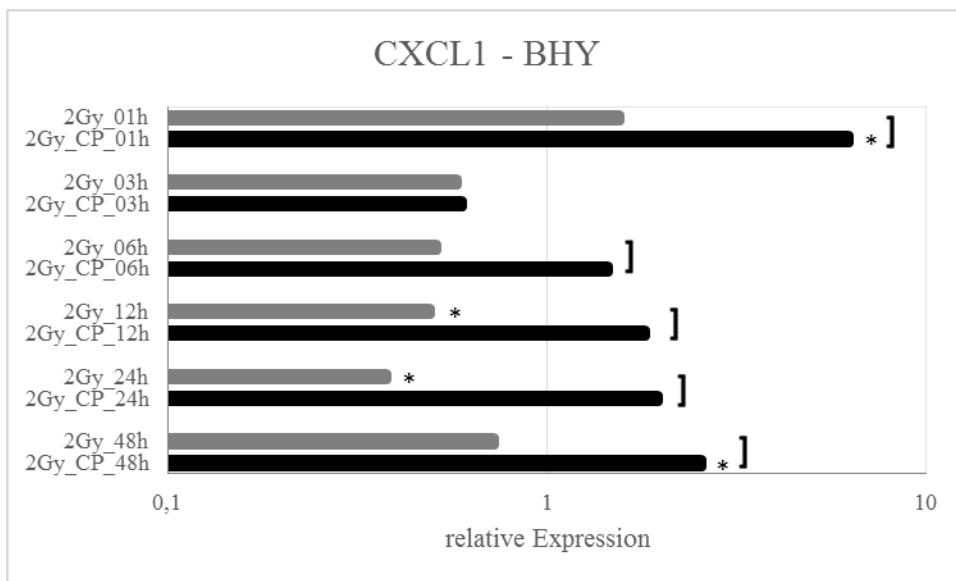


Abb. 48: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie BHY
Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

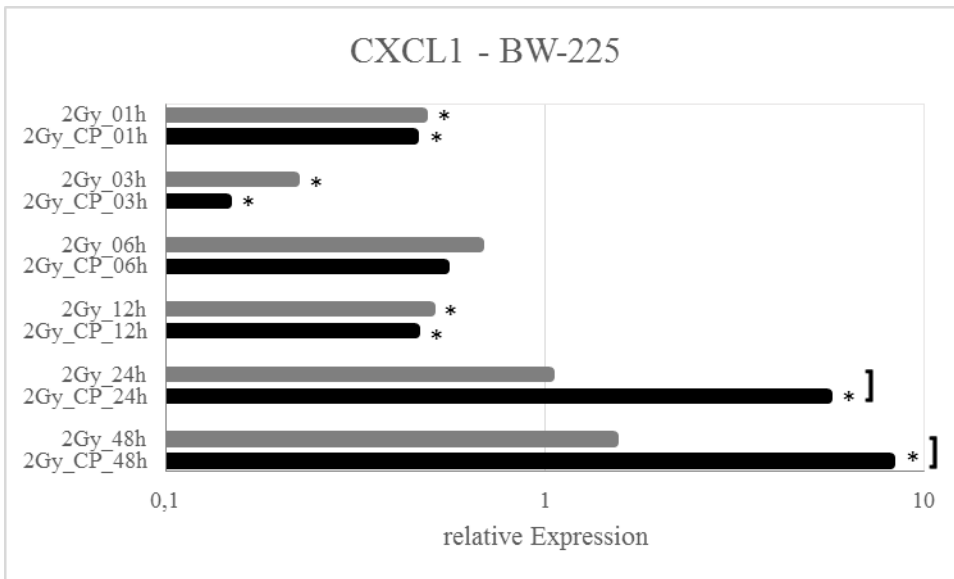


Abb. 49: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie BW-225
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.
 2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle
] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

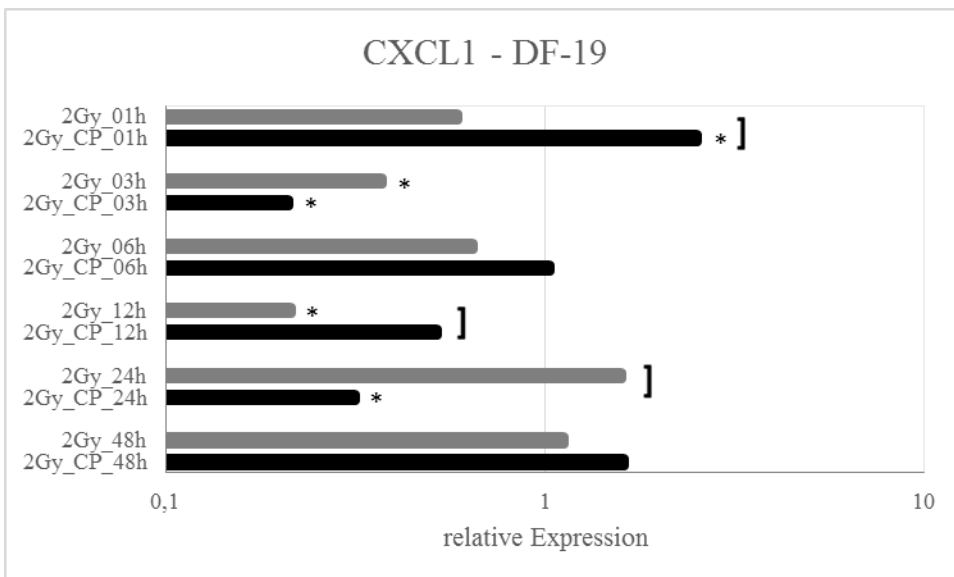


Abb. 50: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie DF-19
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.
 2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle
] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

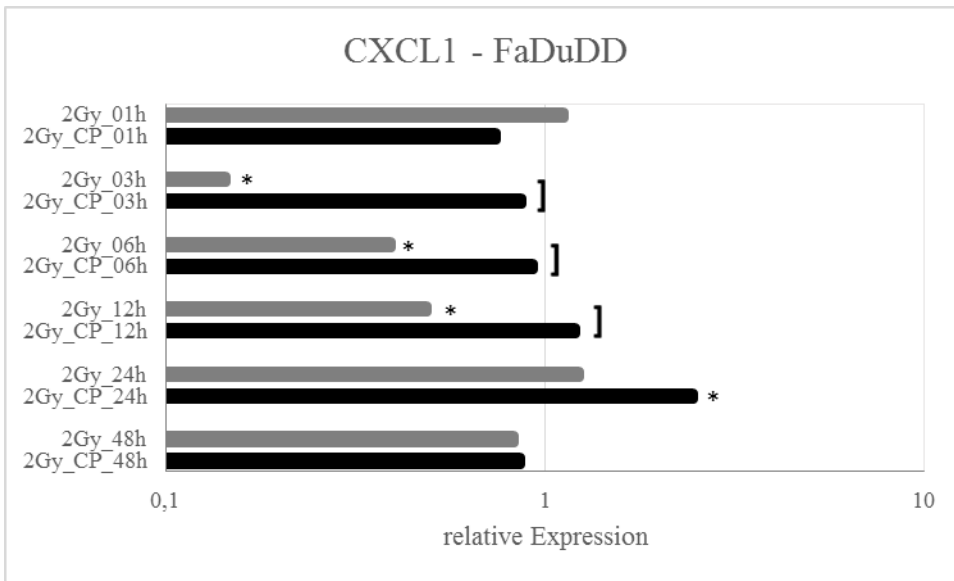


Abb. 51: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie FaDuDD
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.
 2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle
] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

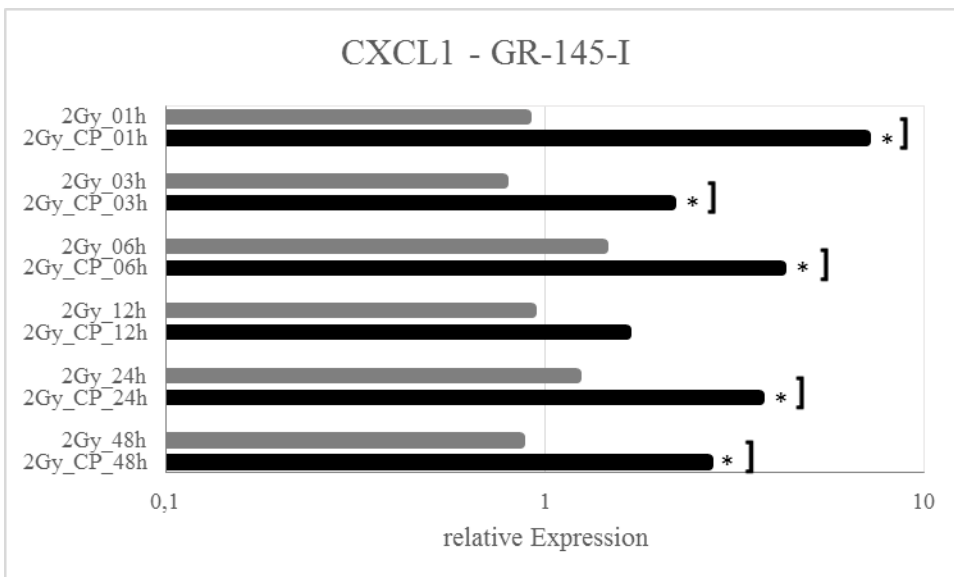


Abb. 52: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie GR-145-I
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.
 2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle
] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

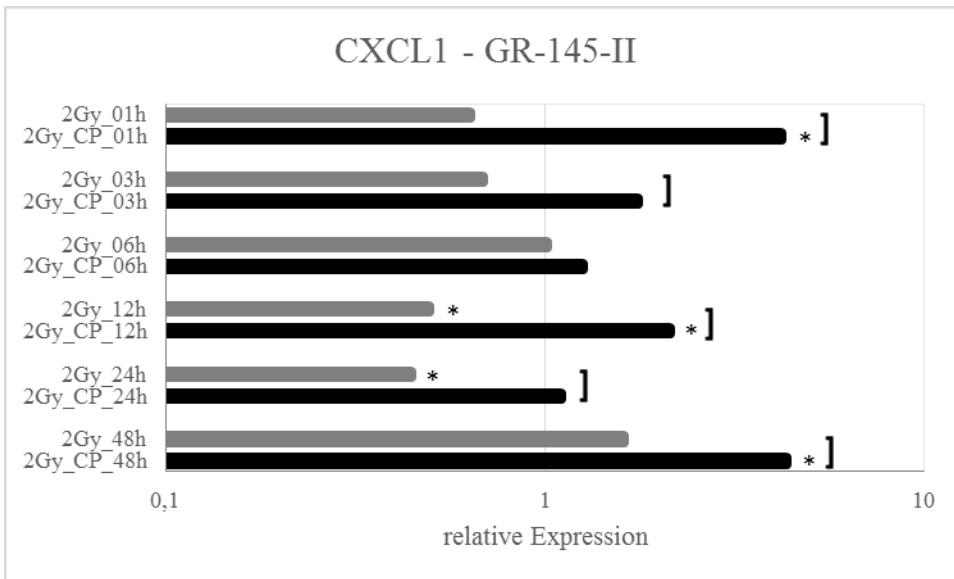


Abb. 53: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie GR-145-II
Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

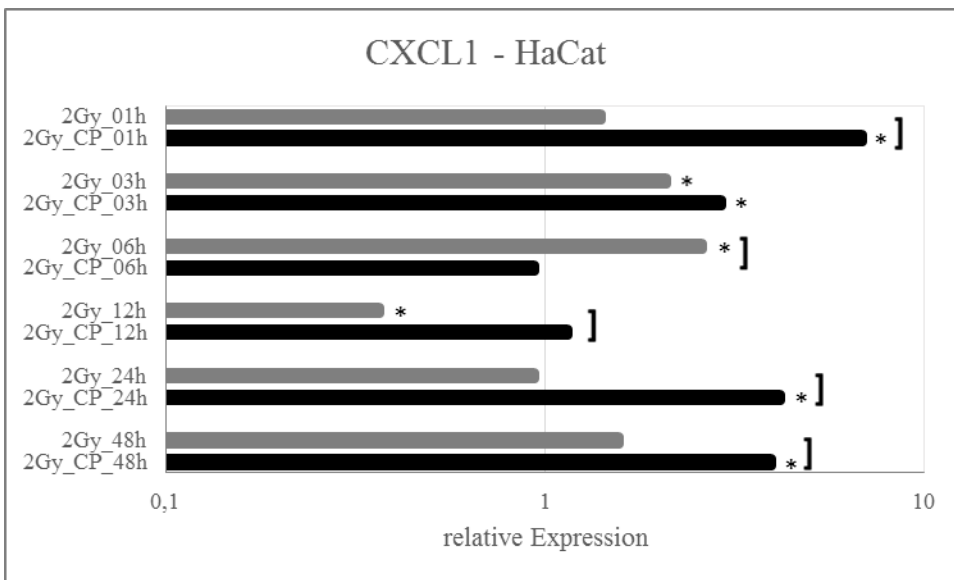


Abb. 54: Darstellung der Expression von CXCL1 bei der Zelllinie HaCat

Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

CXCL3

Die Expression von CXCL3 erfolgte von den Zelllinien BHY, DF-19, FaDuDD, GR-145-I, GR-145-II, HaCat und ZMK-1, jedoch konnten nur an den wenigstens Zeitpunkten eine signifikante Menge an cDNA nachgewiesen werden. Bei allen mit Radiochemotherapie behandelten Proben lagen die gemessenen Werte deutlich über denen der unbehandelten Kontrollen sowie über den Werten der Proben, die mit alleiniger Radiotherapie behandelt wurden. Die kombinierte Radiochemotherapie führte also zu einer Steigerung der Expression an CXCL3, die sowohl bei Tumorzellen als auch bei physiologischen Zellreihen zu beobachten war.

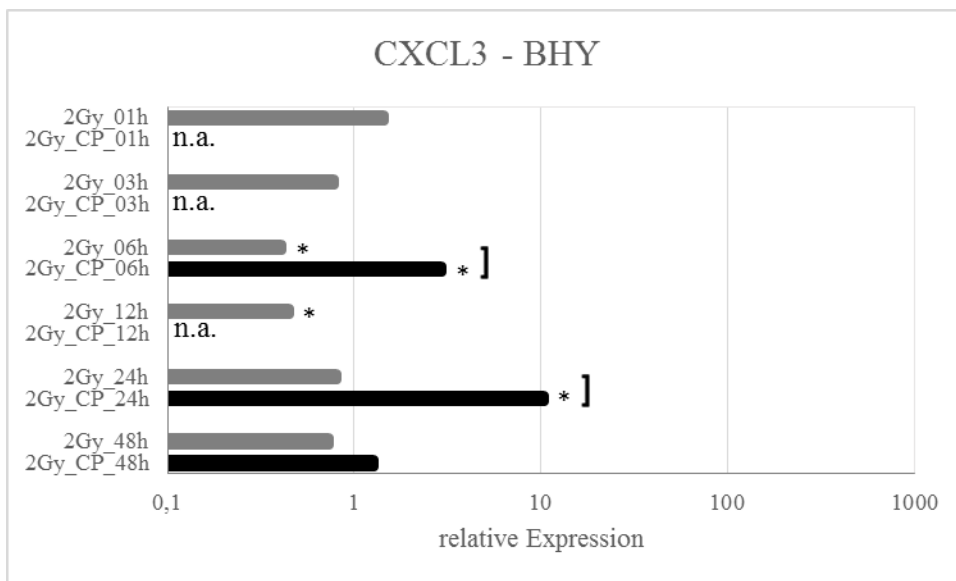


Abb. 55: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie BHY

Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

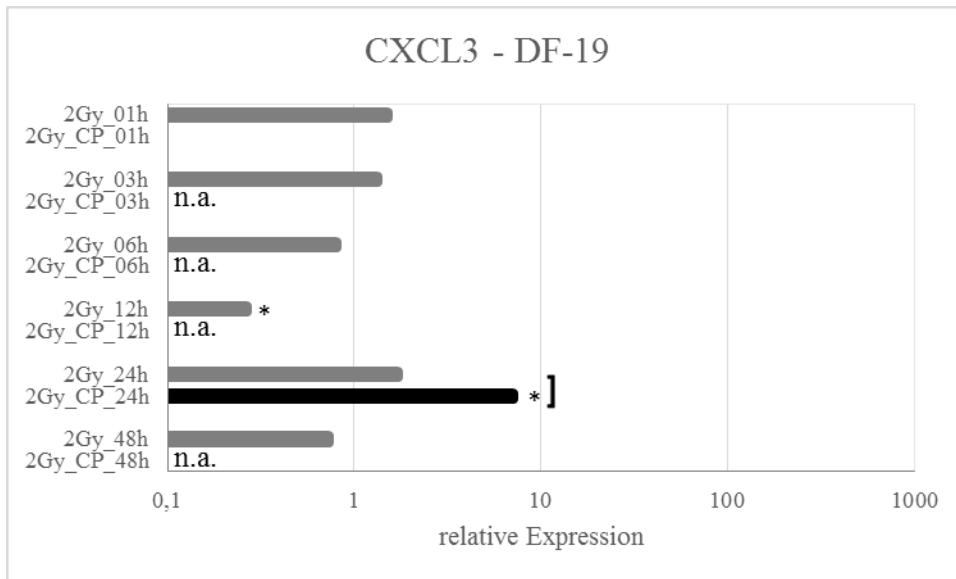


Abb. 56: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie DF-19

Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

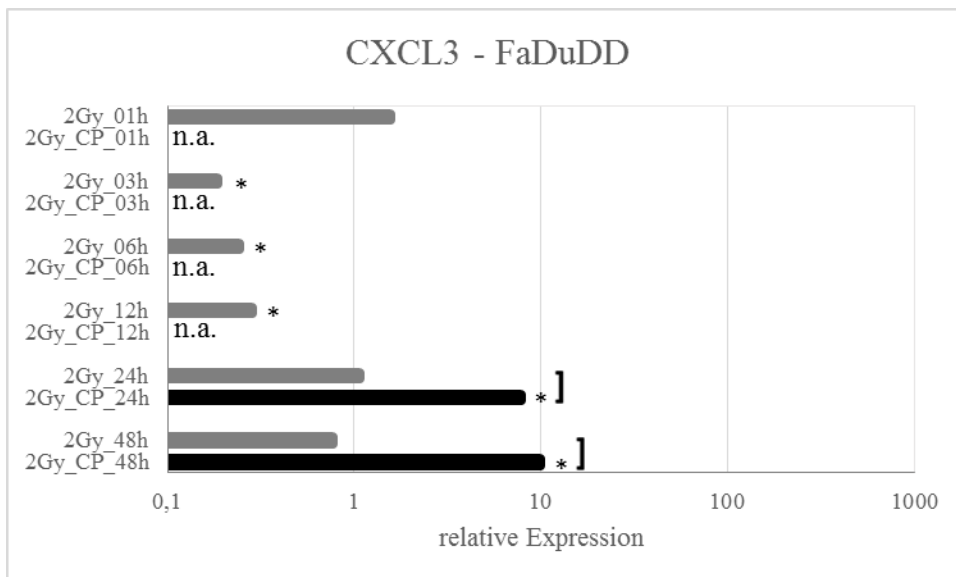


Abb. 57: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie FaDuDD

Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

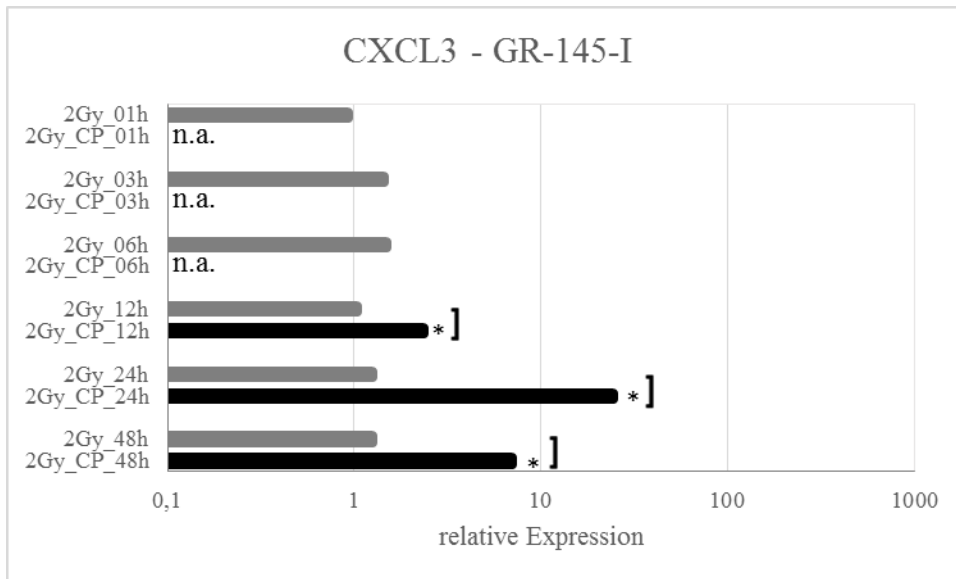


Abb. 58: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie GR-145-I
Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

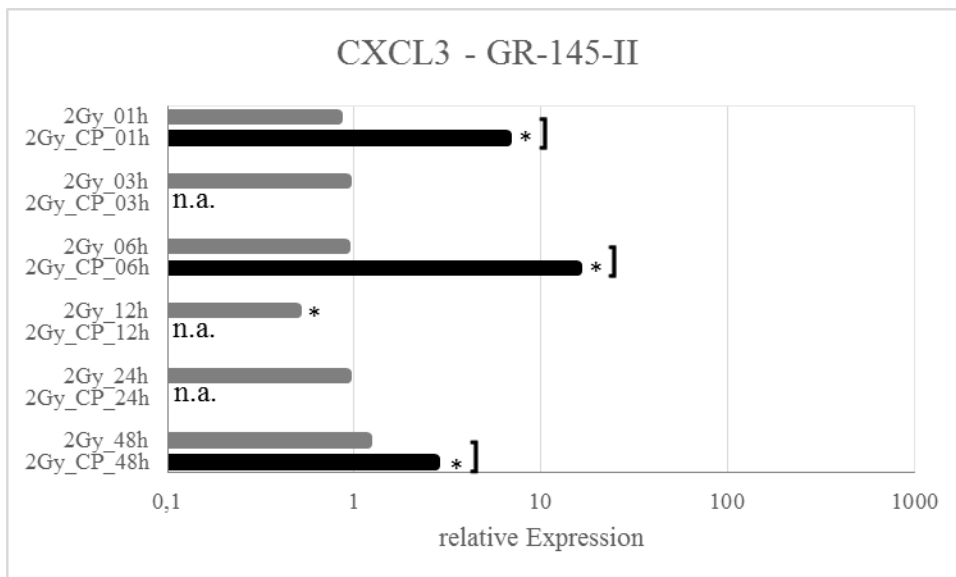


Abb. 59: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie GR-145-II

Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

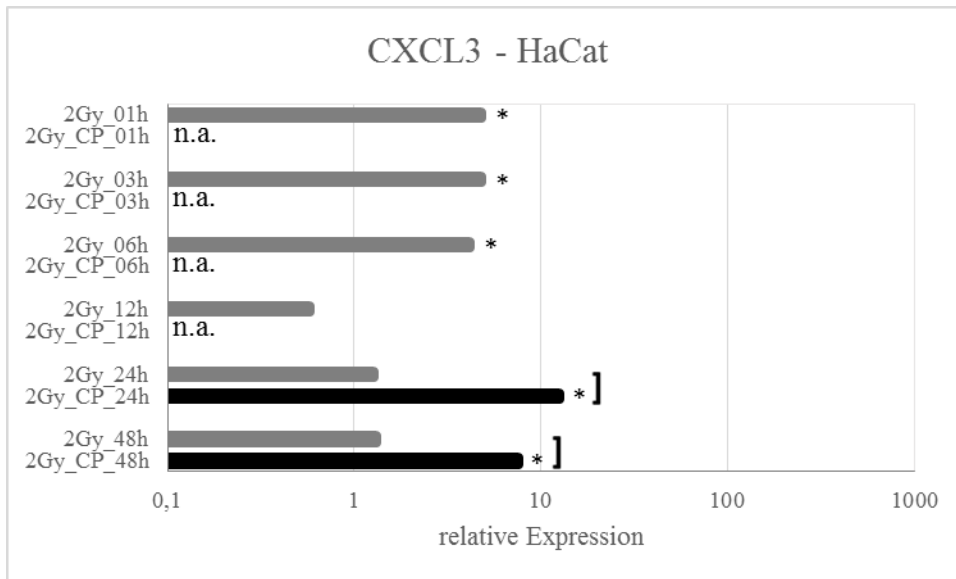


Abb. 60: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie HaCat
Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

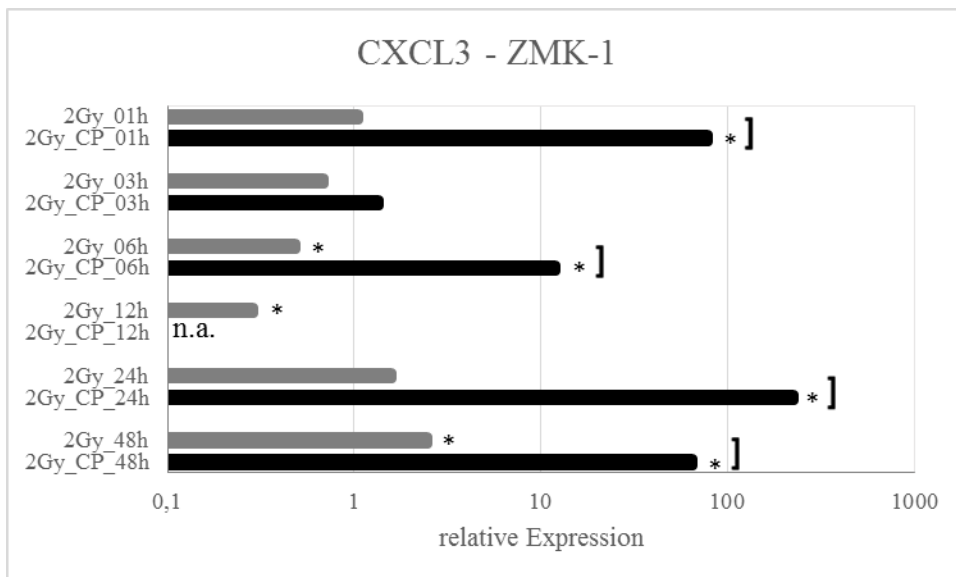


Abb. 61: Darstellung der Expression von CXCL3 bei der Zelllinie ZMK-1

Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

3.3.3 CCR6- und CCL20-Expression

CCR6

CCR6 wurde von BHY zu allen Zeitpunkten exprimiert, Dabei zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen sowie den mit alleiniger Radiotherapie behandelten Zellen eine deutliche Abnahme der Genexpression durch die kombinierte Radiochemotherapie. Ebenso konnte eine leichte Abnahme im zeitlichen Verlauf beobachtet werden.

Bei der Zelllinie GR-145-II konnten nur Werte nach 24 und 48 Stunden gemessen werden. Diese lagen, wie bereits die Werte der alleinigen Radiotherapie deutlich unter der Expression der unbehandelten Kontrollen.

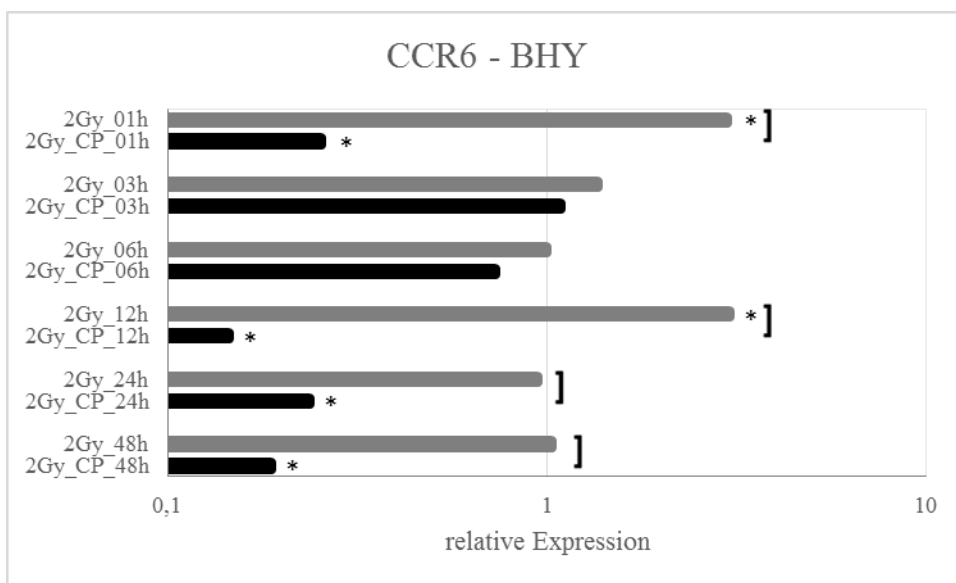


Abb. 62: Darstellung der Expression von CCR6 bei der Zelllinie BHY

Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

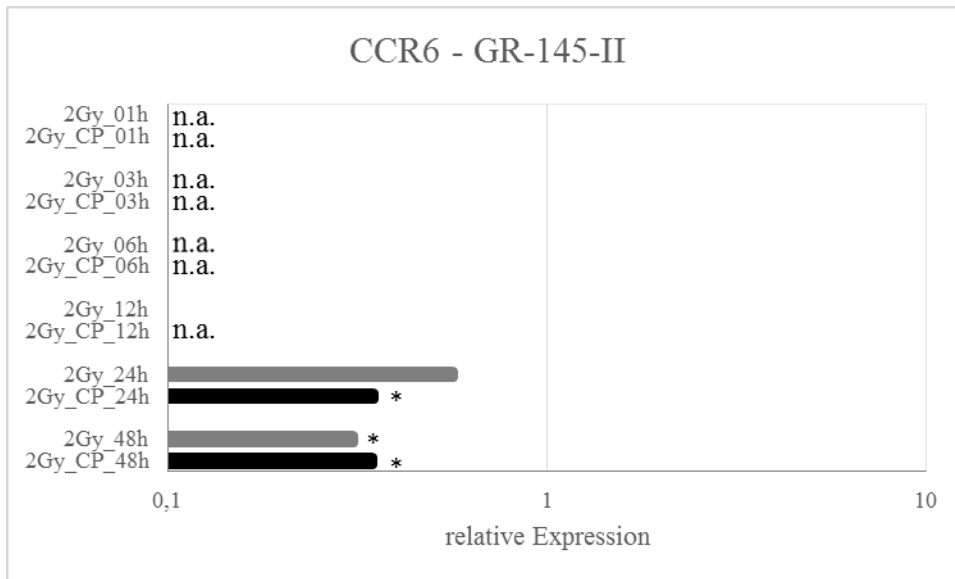


Abb. 63: Darstellung der Expression von CCR6 bei der Zelllinie GR-145-II
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

CCL20

Die Expression von CCL20 konnte bei allen Zelllinien nachgewiesen werden. Die Expressionsstärke lag bei fast allen Zelllinien auf dem Niveau der unbehandelten Kontrollen, nur die Zellreihe ZMK-1 zeigte einen signifikanten Anstieg der Expression um bis zu das Hundertfache der Ausgangswerte.

Während bei den Zellreihen BHY, BW-225, DF-19, GR-145-I und HaCat eine Abnahme der Expression im zeitlichen Verlauf zu beobachten war, die bei allen Zellreihen außer HaCat auch unter die Expression der unbehandelten Kontrollen abfiel, konnte bei der Zelllinien FaDuDD, GR-145-II und ZMK-1 keine deutliche Zu- oder Abnahme der Expression beobachtet werden.

Im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie konnte bei BHY und GR-145-I keine signifikante Änderung der Genexpression durch die kombinierte Radiochemotherapie festgestellt werden; bei den Zelllinien FaDuDD, GR-145-II, HaCat und ZMK-1 bewirkte die Radiochemotherapie eine Expressionssteigerung, bei DF-19 eine Abnahme der Expression von CCL20 im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie.

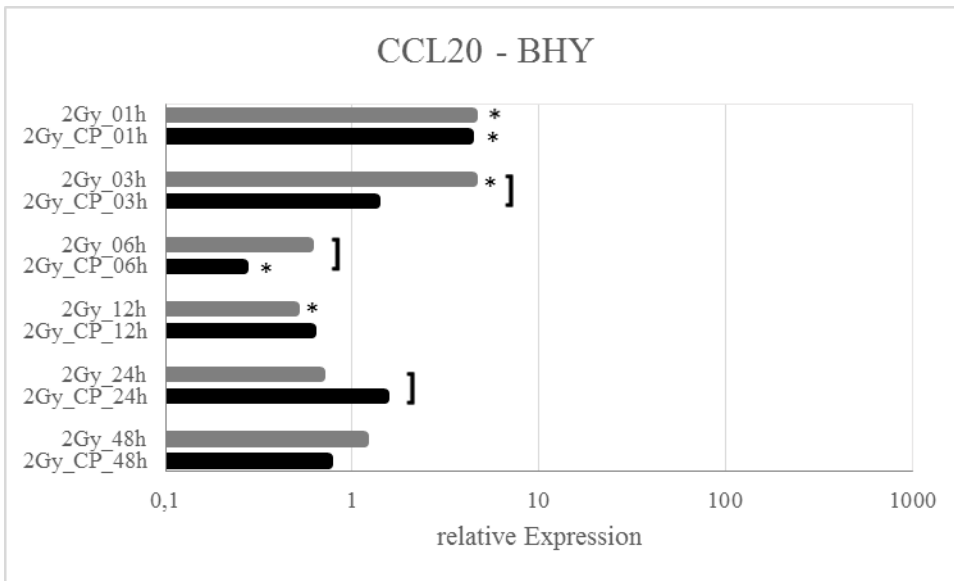


Abb. 64: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie BHY
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

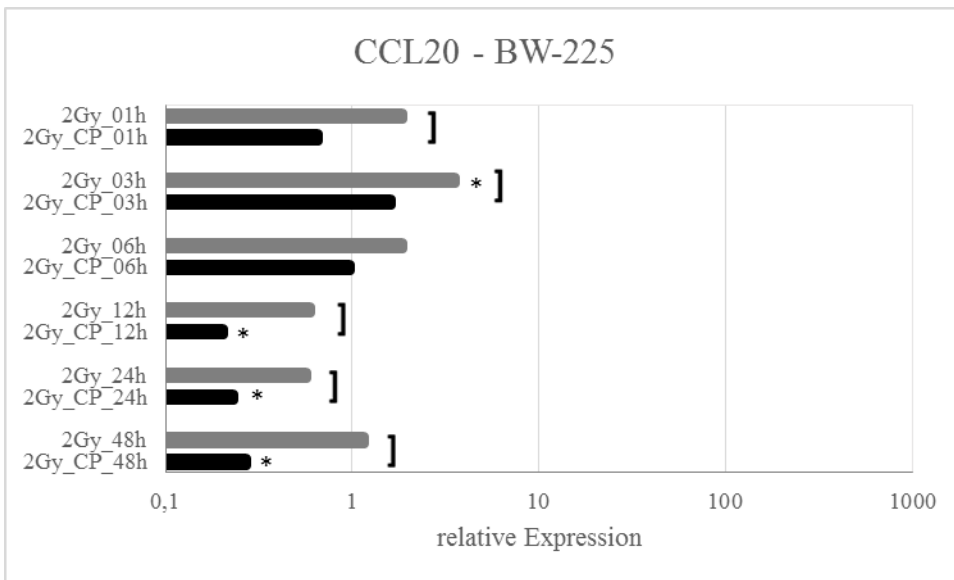


Abb. 65: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie BW-225

Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

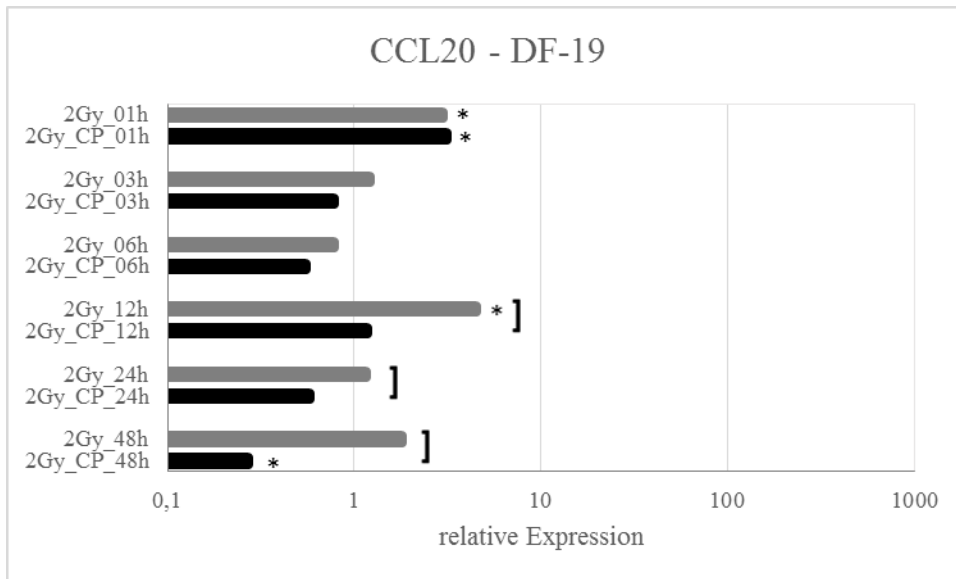


Abb. 66: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie DF-19
Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

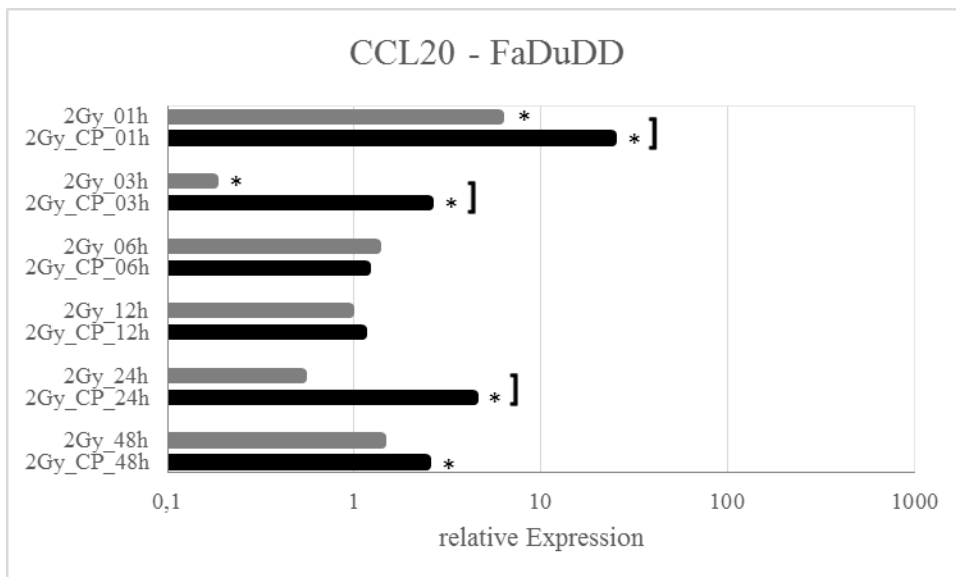


Abb. 67: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie FaDuDD

Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

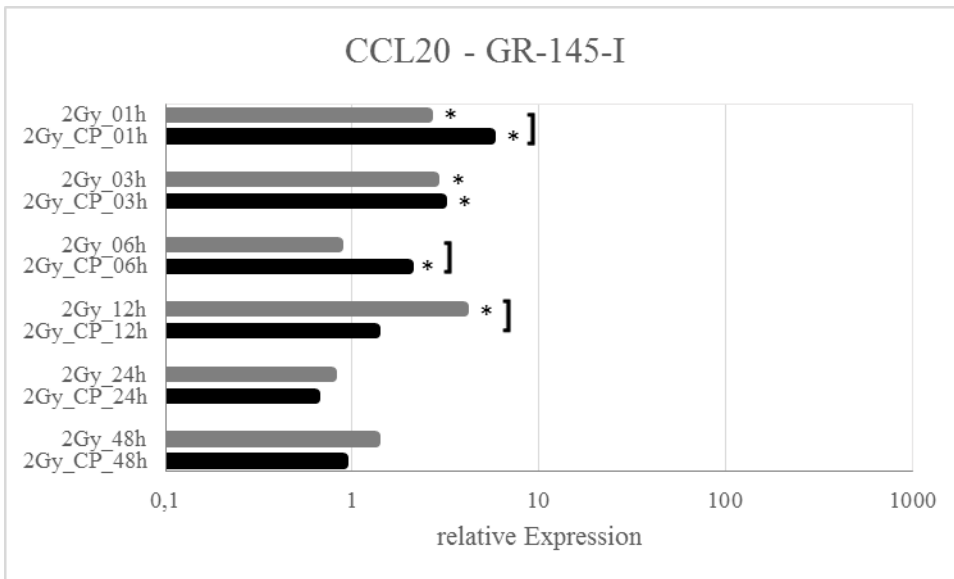


Abb. 68: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie GR-145-I
Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

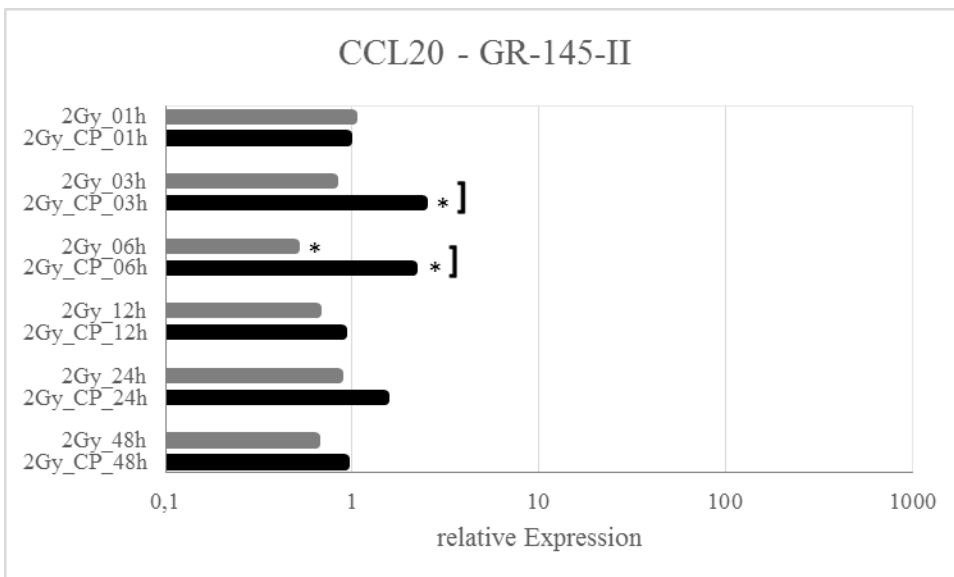


Abb. 69: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie GR-145-II

Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

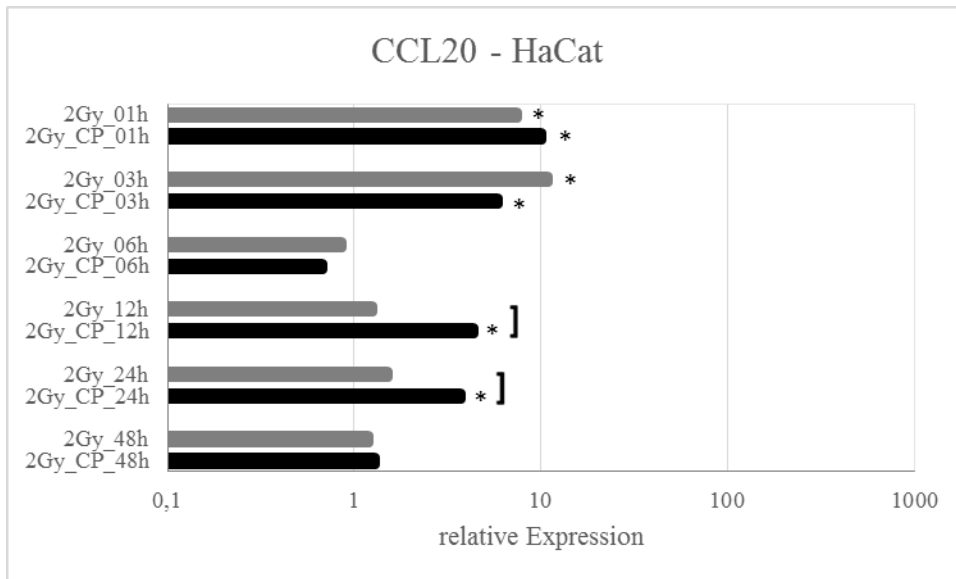


Abb. 70: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie HaCat
Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

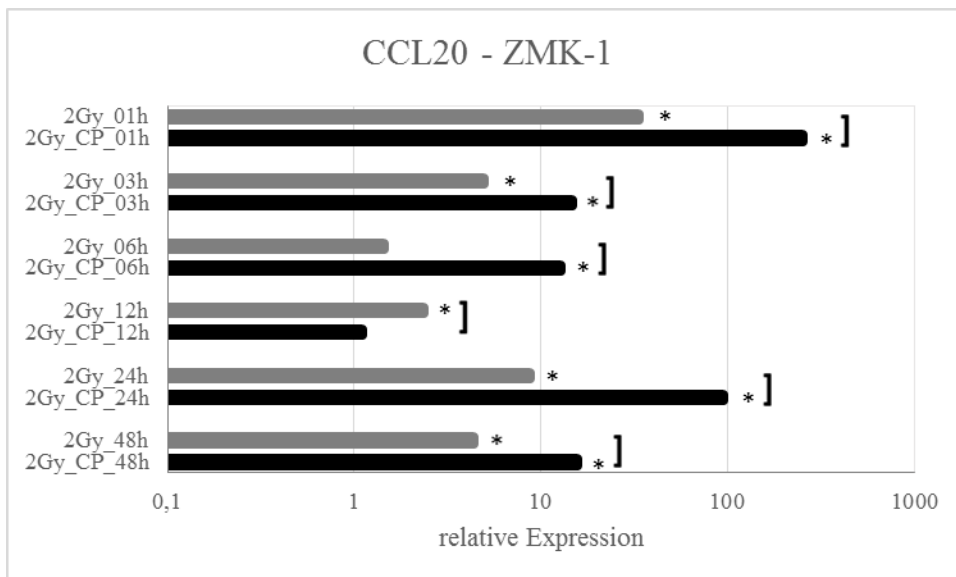


Abb. 71: Darstellung der Expression von CCL20 bei der Zelllinie ZMK-1

Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

3.3.4 CCR7

CCR7 wurde von BHY, DF-19, HaCat und ZMK-1 exprimiert. Die Expression blieb im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen meist schwächer, im Vergleich zu den Proben mit alleiniger Radiotherapie konnte keine signifikante Expressionsänderung beobachtet werden. Eine klare zeitliche Dynamik kann ebenfalls nicht festgestellt werden.

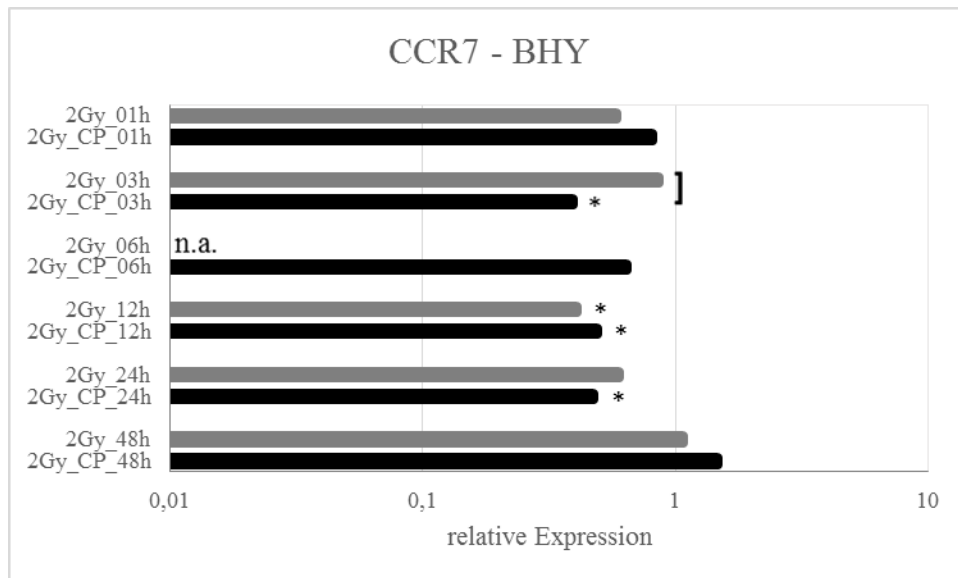


Abb. 72: Darstellung der Expression von CCR7 bei der Zelllinie BHY

Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.

2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray

CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin

01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung

* Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

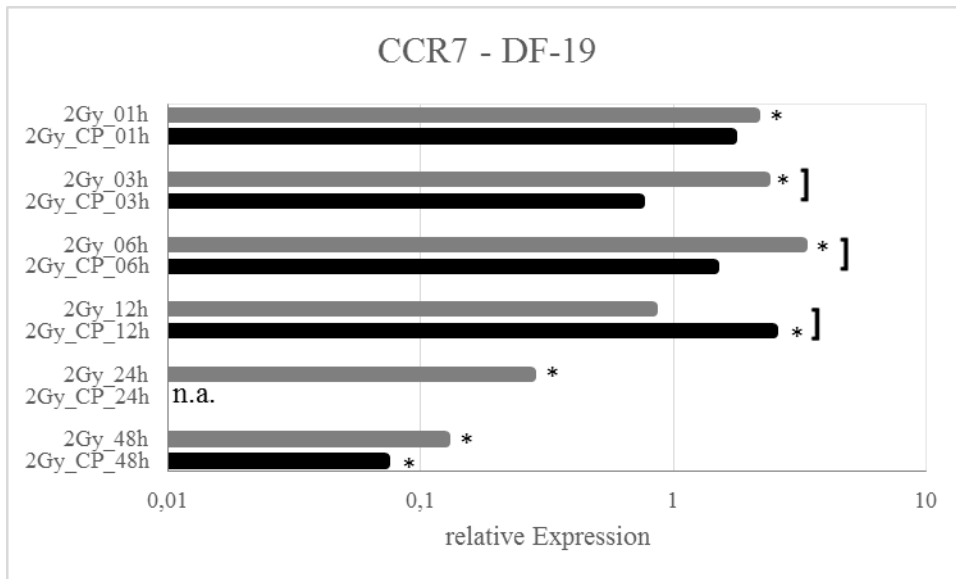


Abb. 73: Darstellung der Expression von CCR7 bei der Zelllinie DF-19
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.
 2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle
] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

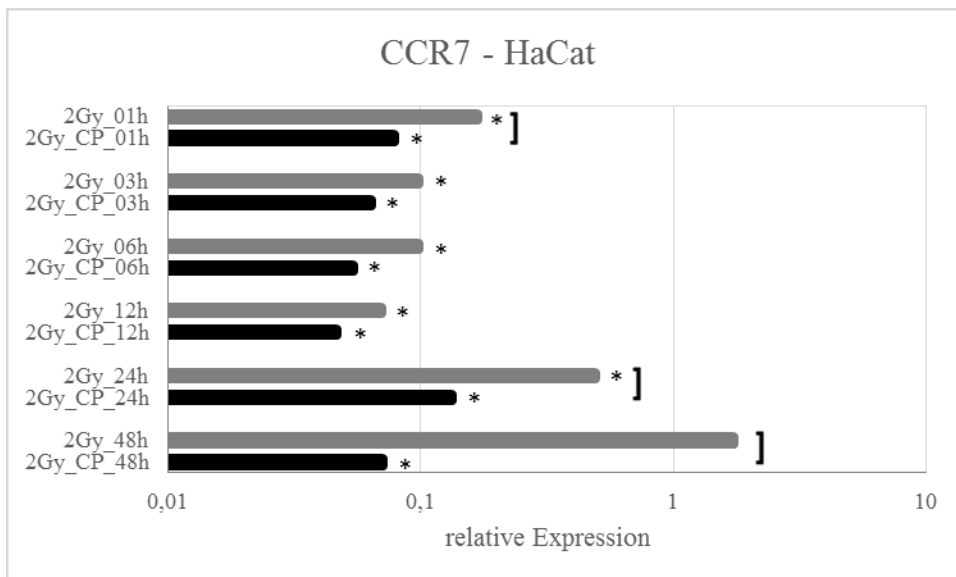


Abb. 74: Darstellung der Expression von CCR7 bei der Zelllinie HaCat
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.
 2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle
] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

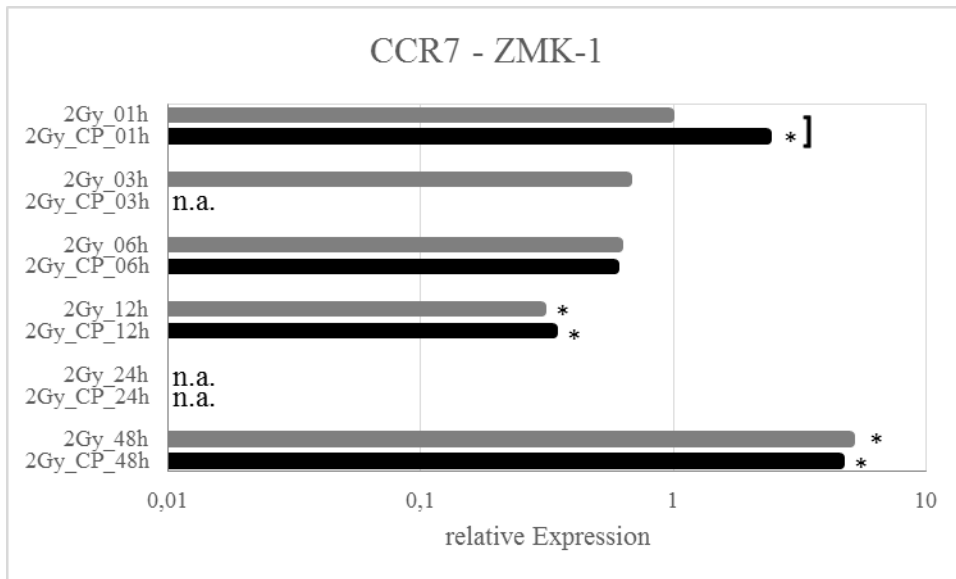


Abb. 75: Darstellung der Expression von CCR7 bei der Zelllinie ZMK-1
 Auf der Abszisse ist die relative Expression des Gens, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dargestellt. Auf die Ordinate sind die verschiedenen Zeitpunkte mit der jeweiligen Therapie aufgetragen. Die Werte der alleinigen Radiotherapie sind der Arbeit von Wolff (Wolff et al. 2011b) entnommen und in der Grafik hell dargestellt.
 2 Gy = Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray
 CP = Behandlung und Inkubation für zwei Stunden der Zellen mit Cisplatin
 01 h, 03 h, 06 h, usw. = Extrahierung der RNA 01, 03, 06, usw. Stunden nach Bestrahlung
 * Signifikant veränderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle
] Signifikanter Unterschied der Expression von RT im Vergleich zur RCT

4. Diskussion

Im folgenden Kapitel werden nun die Ergebnisse aus Kap. 3 diskutiert und in einen wissenschaftlichen Zusammenhang gestellt.

Wie in Kap. 1.3.2 beschrieben, wurden in dieser Arbeit Chemokinliganden und –rezeptoren untersucht, die sich bereits bei SCCHN als relevant dargestellt haben. Der Messung einer veränderten Expression unter kombinierter Radiochemotherapie, die ein Standardverfahren bei SCCHN ist (Lefebvre 2005; Siddiqui et al. 2011), wurde bisher wenig Beachtung geschenkt. Aufgrund der immer noch schlechten Prognose bei SCCHN (Hauswald et al. 2011) ist es besonders wichtig, möglichst umfangreich über Einflüsse, die auf die Tumorzellen wirken, Bescheid zu wissen. Nur mit diesem Wissen kann eine Weiterentwicklung der Therapie von SCCHN, aber auch eine bessere Einschätzung der Prognose erfolgen.

Einen Baustein hierzu soll vorliegende Arbeit beitragen.

4.1 Cisplatin-Effekt

4.1.1 Cisplatin-Effekt im Koloniebildungsversuch

Bei alleiniger Therapie mit Cisplatin konnte in den Koloniebildungsversuchen bei allen Zellreihen ein signifikant vermindertes Überleben beobachtet werden.

Den geringsten Einfluss auf das Zellüberleben hatte Cisplatin bei den Normalgewebslinien HaCat und DF-19. Besonders stark zeigte sich der Effekt von Cisplatin auf die Tumorzellreihen BW-225, FaDuDD und ZMK-1. Hierbei war die Koloniebildungsrate z. T. bis um 75% gegenüber der unbehandelten Kontrolle erniedrigt.

Aufgrund der bei den Tumorzellen bereits veränderten DNA und meist eingeschränktem Reparatursystem können die durch die Cisplatin-Therapie entstehenden Schäden nicht mehr ausgeglichen werden, und die Zelle muss den programmierten Zelltod einleiten. Im Gegensatz dazu weisen die gesunden Gewebsreihen ein intaktes Reparatursystem auf und können so die durch die Chemotherapie ausgelösten Schäden besser kompensieren. Hierdurch sind auch die ebenfalls im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika eher geringen Nebenwirkungen bei einer Therapie mit Cisplatin zu erklären (Wolff et al. 2009).

Jedoch zeigten sich bei den Tumorzellreihen BHY, GR-145-I und GR-145-II ein nur moderates Ansprechen auf die Cisplatin-Therapie, was sich auch in den individuell unterschiedlichen Ansprechraten der Patienten mit SCCHN deckt.

Zum Teil wurden besonders große Standardabweichungen beobachtet. Ein möglicher Grund könnte die hohe Teilungsgeschwindigkeit der Zelllinien sein, die bei längerer Inkubation der Zellen zu einem erhöhten Vorkommen an Kolonien führte. Des Weiteren zeigten die Zellen ein zum Teil recht flächiges Wachstum, so dass eine Isolierung der einzelnen Kolonien sich zeitweise recht schwierig gestaltete.

4.1.2 Cisplatin-Effekt auf die Genexpression

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Cisplatin auf die Genexpression verschiedener, auch in Tumoren vorkommender Chemokinliganden und –rezeptoren zu untersuchen. Die Auswahl bezieht sich auf die Arbeit von Wolff et al. (Wolff et al. 2011b). Die Ergebnisse der Messung der einzelnen Expressionen der Chemokinliganden und –rezeptoren sollen hier nun in wissenschaftlichen Kontext diskutiert werden.

4.1.2.1 CXCR4- und CXCL12-Expression

Wie in Kap. 1.3.2 bereits erläutert, spielen CXCR4 und sein Ligand CXCL12 eine wichtige Rolle bei Tumorwachstum und Metastasierung (Raman et al. 2007; Lugade et al. 2008).

In dieser Arbeit konnte bei den exprimierenden Zelllinien BW-225, FaDuDD und ZMK-1 die CXCR4-Expression bei singulärer Cisplatin-Therapie beobachtet werden. Das zeitliche Muster dieser Expression unterschied sich dabei zwischen den genannten Zellreihen, jedoch war die Expression zu jedem Zeitpunkt signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht.

Eine Überexpression von CXCR4 unter Chemotherapie wurde bereits in mehreren Studien beschrieben. Diese geht häufig mit einem schlechten Therapieansprechen einher (Sison et al. 2013). Ursächlich für eine vermehrte Expression kann jedoch auch eine zu gering gewählte Dosierung der eingesetzten Chemotherapie sein (Koishi et al. 2006).

Übertragen auf diese Untersuchung müsste somit die nachgewiesene Mehrexpression von CXCR4 mit einem schlechten Ansprechen der Zellen auf die Cisplatin-Gabe im Koloniebildungsversuch einhergehen. Dies war jedoch nicht der Fall. Es scheinen somit weitere Einflussfaktoren im Rahmen der Cisplatin-Therapie zu existieren, die ein gutes Ansprechen dieser Zellen auf die Chemotherapie-Gabe bewirken.

Im Gegensatz dazu zeigte sich die Expression des Liganden CXCL12, die bei den Zelllinien BW-225 und DF-19 gemessen werden konnte, tendenziell vermindert. Die Studienlage zu CXCL12 ist aktuell nicht eindeutig (s. Kap 4.2.2.1). Da es sich bei BW-225 und DF-19 zudem sowohl um eine Tumor- als auch um eine Normalzelllinie handelt, ist eine biologische Bedeutung der CXCL12-Expression aus diesen Experimenten nicht ableitbar.

4.1.2.2 CXCR1-, CXCL1- und CXCL3-Expression

Der Einfluss von CXCL1, CXCL3 und CXCR1 auf das Verhalten von Zellen ist vielfältig.

Unter der Behandlung mit Cisplatin konnte CXCR1 bei keiner Zellreihe nachgewiesen werden. Auch bei der kombinierten Radiochemotherapie, wie sie in dieser Arbeit untersucht wurde, war hierzu passend eine deutliche Expressionsminderung nachweisbar. Andere Studien zeigten dies auch für eine isolierte Radiotherapie (Wolff et al. 2011b).

Bei besonders aggressiv wachsenden Tumoren wie bspw. dem Pankreas-Karzinom ist bekannt, dass eine vermehrte CXCR1-Expression mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko verbunden ist (Chen et al. 2014); ebenso ist hiermit eine erhöhte Mortalität verbunden. Das Ausbleiben der CXCR1-Expression bei den hier untersuchten Zellreihen kann somit als möglicher Prädiktor für ein gutes Ansprechen wie auch ein erniedrigtes Metastasierungsrisiko unter Therapie verstanden werden.

Im Gegensatz dazu kann CXCL1 bei allen Zellreihen außer ZMK-1 nachgewiesen werden. In allen Zellreihen zeigten sich hierbei unterschiedliche zeitliche Dynamiken, jedoch ließ sich bei jeder Zellreihe an mindestens einem Zeitpunkt eine signifikante Überexpression von CXCL1 beobachten. Ähnlich wurde dies bereits von Seignez et al. *in vivo* beobachtet (Seignez et al. 2014). Eine Therapie mit platinhaltigen Zytostatika führte in dieser Studie zu einer Überexpression von CXCL1, was zu einer vermehrten Immigration von neutrophilen Granulozyten führte. Dies wurde im Sinne einer zellulären Regeneration gedeutet. Auch andere Autoren sehen in einer *in vivo* gesteigerten Expression von CXCL1 eine Einleitung verschiedener Reparaturvorgänge. Dies soll somit zum Zellerhalt beitragen (Acharyya et al. 2012).

Beim am gleichen Rezeptor bindenden Liganden CXCL3 zeigte sich in dieser Arbeit ein gleichsinniges Verhalten. Es zeigen sich vermehrte Expressionen bei den Tumorzellreihen BHY und ZMK-1. Durch die gleiche Rezeptoraffinität von CXCL1 und CXCL3 scheinen die Ergebnisse im gleichen, wie bereits oben beschriebenen, biologischen Kontext zu stehen. Der Zellerhalt scheint hier im Mittelpunkt zu stehen.

4.1.2.3 CCR6- und CCL20-Expression

Die Expression von CCR6 erfolgte von den Zellreihen BHY und GR-145-II, bei diesen jedoch nicht zu allen Zeitpunkten. Bei den gemessenen Zeitpunkten zeigte sich die Expression signifikant vermindert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

CCL20 hingegen wurde von allen Zelllinien exprimiert. Dabei zeigte sich bei der isolierten Cisplatin-Therapie bei der Zelllinie BW-225 eine verminderte Expression, bei allen anderen Zellreihen eine tendenziell vermehrte Expression von CCL20. Bei DF-19, FaDuDD, GR-145-I und ZMK-1 konnte über den zeitlichen Verlauf eine abnehmende Expression beobachtet werden. Eine Expressionssteigerung unter platinhaltiger Chemotherapie konnte bereits bei Rubie et al. nachgewiesen werden (Rubie et al. 2011). Die Autoren dieser Studie betrachteten diese Expressionssteigerung als temporären Effekt, der von ihnen als Ausdruck einer Stressreaktion gewertet wurde. Die hier gezeigten Ergebnisse können somit im Rahmen einer Stressreaktion der Zellen auf die Therapie mit Cisplatin gewertet werden.

Mrizak et al. konnten beim Nasopharynx-Karzinom Verbindungen zu einer veränderten T-Zell-Aktivität belegen (Mrizak et al. 2014). Beim Cervix-Karzinom gibt es zudem Belege, dass eine CCR6/CCL20-Expression mit einer T-Zell-Migration in Tumorgewebe einhergeht (Yu et al. 2015). Beim hepatozellulären Karzinom scheint hingegen eine veränderte CCR6/CCL20-Expression mit einer erhöhten Gefäßinfiltration und Metastasenbildung einherzugehen (Du et al. 2014).

Letztlich bleibt die pathophysiologische Bedeutung von CCR6/CCL20 für die hier untersuchten Zellreihen ungeklärt, weitere Untersuchungen scheinen hier insbesondere in Hinblick auf die hier erwähnte T-Zell-Interaktion sinnvoll.

4.1.2.4 CCR7-Expression

Eine Expression von CCR7 konnte bei BHY, DF-19, HaCat und ZMK nachgewiesen werden. Bei der alleinigen Chemotherapie zeigte sich bei BHY eine verstärkte Expression. Bei HaCat und ZMK konnte man bei alleiniger Chemotherapie einen Anstieg der Expression nach 24 und 48 Stunden beobachten.

Wie in Kap. 1.3.2 beschrieben, korreliert eine hohe CCR7-Expression mit einer hohen Rezidivrate, Lymphknotenmetastasen, Tumorprogress und eingeschränkter Lebenserwartung (Wang et al. 2005a; Tsuzuki et al. 2006). Übertragen auf diese Versuche könnte die Expressionssteigerung von CCR7 als Stressreaktion auf die Therapie verstanden werden, wobei die Zelle unter Chemotherapie versucht, dem Zellzerfall entgegenzuwirken.

Dementsprechend geht eine erhöhte CCR7-Expression mit einer schlechteren Prognose einher (Mburu et al. 2012).

4.2 Einfluss der Radiochemotherapie

Nachdem nun ausführlich die alleinigen Einflüsse von Cisplatin dargestellt wurden, sollen im Folgenden die Effekte einer kombinierten Radiochemotherapie diskutiert werden.

4.2.1 Einfluss der Radiochemotherapie auf die Koloniebildungsversuche

In den Koloniebildungsversuchen wurde das Zellüberleben unter kombinierter Radiochemotherapie beobachtet. Dabei konnte, wie in Kap. 4.1.1 bei allen Zellreihen ein signifikanter Unterschied der Koloniebildung zwischen der unbehandelten Kontrolle und der Cisplatin-Therapie dargestellt werden.

Mit zunehmender Strahlendosis zeigt sich ein vermindertes Überleben der Zellen. Der zytotoxische Effekt von Cisplatin wurde durch die Bestrahlung additiv verstärkt. Die berechneten Trendlinien von den mit Radiochemotherapie behandelten Proben und den ausschließlich bestrahlten Proben verliefen nahezu parallel. Somit ist unter den gewählten Bedingungen bei den hier verwandten Zelllinien die dem Cisplatin zugeschriebene Radiosensibilisierung nicht zu beobachten. Das ausbleibende Sensitizing kann auf einer nur mäßigen intrazellulären Sauerstoffkonzentration beruhen (Rave-Fränk et al. 2002). Die Sauerstoffkonzentration in der Zelle ist besonders wichtig um das Radiosensitizing zu ermöglichen (s. Kap. 1.2.3). Da die Kolonien - außer beim Nährmediumswechsel - vollständig mit dem Nährmedium bedeckt wurden, könnten die Zellen somit einem zu geringen Sauerstoffgehalt ausgesetzt worden sein. Dies könnte eine erniedrigte intrazelluläre Sauerstoffkonzentration zur Folge haben, was wiederum das ausbleibende Radiosensitizing erklären könnte.

Bei der Zelllinie BHY konnte keine Koloniebildung beobachtet werden, weswegen auf die Anfertigung einer Überlebenskurve verzichtet werden musste. Gründe hierfür können in einer mangelhaften Anhaftung der Zellen am Flaschenboden liegen. Hierdurch könnte es einerseits zur erschwerten Koloniebildung kommen; andererseits könnte die Anfärbung der Kolonien durch die verminderte Anheftung erschwert werden.

4.2.2 Einfluss der Radiochemotherapie auf die Genexpression

4.2.2.1 CXCR4- und CXCL12-Expression

CXCR4 wurde von den drei Zellreihen BW-225, FaDuDD und ZMK-1 exprimiert. Hierbei konnte bei FaDuDD und ZMK-1 eine signifikante Expressionssteigerung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und der alleinigen Radiotherapie beobachtet werden. Eine deutliche zeitliche Dynamik ist bei diesen Zellreihen nicht erkennbar. Bei der Tumorzellreihe BW-225 zeigte sich nach drei und sechs Stunden zunächst eine verminderte Expression, nach 24 und 48 Stunden jedoch eine signifikante Mehrexpression. Eine Mehrexpression wird von den Zellen bei Hypoxie eingeleitet. Hierdurch soll die Angiogenese angeregt und eine verbesserte Sauerstoffzufuhr gewährleistet werden (Gu et al. 2015; Shakir et al. 2015).

Dass eine Mehrexpression von CXCR4 unter Radiochemotherapie mit einer schlechteren Prognose einhergeht, konnte von Koishi et al. nachgewiesen werden (Koishi et al. 2006). Hierfür wurden nach neoadjuvanter Radiochemotherapie die Expressionen für CXCR4 bei Patienten mit Oesophagus-Tumoren gemessen. Patienten mit erhöhten CXCR4-Expressionen hatten ein höheres Risiko für ein Tumorrezidiv sowie ein vermindertes Gesamtüberleben. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich ebenso bei Patienten mit Glioblastom. Nach kombinierter Radiochemotherapie korrelierte eine vermehrte CXCR4-Expression mit einem erhöhten Rezidivrisiko (Tabouret et al. 2015).

Ein höheres Rezidiv- und Metastasenrisiko könnte somit auch für die Zellreihen BW-225, FaDuDD und ZMK-1 postuliert werden.

CXCL12 wurde von den Zelllinien BW-225, DF-19 und GR-145-I exprimiert. Hierbei zeigte sich bei den Zelllinien BW-225 und DF-19 eine tendenziell verminderte CXCL12-Expression. Dies deckt sich mit der oben genannten Studie der CXCR4-Expression bei kombiniert behandelten Glioblastomen; auch hier war die CXCL12-Expression vermindert (Tabouret et al. 2015).

Aber auch für eine Überexpression von CXCL12 unter kombinierter Radiochemotherapie finden sich Belege; hier insbesondere für das fortgeschrittene Rektum-Karzinom (Tamas et al. 2015). Eine Mehrexpression konnte in dieser Arbeit für die Zelllinie GR-145-I nachgewiesen werden.

Die Mehrexpression von CXCL12 bei GR-145-I im Vergleich zur verminderten Expression bei BW-225 und DF-19 sollte hier somit nicht als Fehlmessung eingeordnet werden; vielmehr ist sie ein Ausdruck der unterschiedlichen Strahlenreaktion der untersuchten Zellreihen.

Das alleinige Messen einer CXCL12-Expression kann somit keine eindeutige Aussage bezüglich des Tumorprogresses oder Therapieansprechens liefern. Hier sind weitere Subgruppen-Analysen notwendig.

4.2.2.2 CXCR1-, CXCL1- und CXCL3-Expression

CXCR1 konnte nur bei der Zelllinie HaCat unter kombinierter Radiochemotherapie gemessen werden, wobei auch hierbei nicht an allen Zeitpunkten eine Expression nachgewiesen werden konnte. Die Expression, die messbar war, zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei allen gemessenen Werten signifikant erniedrigt.

Im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie zeigt sich eine verminderte Expression von CXCR1 zu den Zeitpunkten 01 h und 03 h. Zu den Zeitpunkten 06 h und 12 h befindet sich die Expression auf einem ähnlichen Niveau.

Auch bei alleiniger Radiotherapie konnten Wolff et al. die Expression von CXCR1 nur bei HaCat nachweisen (Wolff et al. 2011b).

Dadurch sind auch die fehlenden Werte erklärbar; ein zu hoher Ct-Wert in der PCR wird als nicht verlässlich angesehen und somit können sehr geringe Mengen RNA nicht nachgewiesen werden.

Aufgrund des ebenfalls fehlenden Nachweises von CXCR1 bei den unbehandelten Kontrollen der anderen Zellreihen muss davon ausgegangen werden, dass CXCR1 von den geprüften Zellreihen nicht exprimiert wird.

Insbesondere führt auch die kombinierte Radiochemotherapie nicht zu einer CXCR1-Expression. CXCR1 scheint somit für die hier untersuchten Zellreihen bedeutungslos.

CXCL1 und CXCL3 wurden im Gegensatz zu CXCR1 von den meisten Zellreihen exprimiert (s. Kap. 3.3.2). Bei beiden gemessenen Liganden zeigte sich eine deutliche Mehrexpression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen sowie zur isolierten Radiotherapie. Die Ergebnisse sind deckungsgleich zur isolierten Cisplatintherapie.

Damit konnte in dieser Arbeit erstmals das Verhalten der beiden Chemokine unter kombinierter Radiochemotherapie dargestellt werden.

Wie schon in Kap. 4.1.3.2 bereits diskutiert, könnte sich bei der Mehrexpression von CXCL1 und CXCL3 um einen Mechanismus zum Zellerhalt handeln.

4.2.2.3 CCR6- und CCL20-Expression

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von CCR6 nur bei der Zelllinie BHY zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur alleinigen Radiotherapie, bei der die Expression der unbehandelten Kontrolle entsprach oder darüber lag, war die Expression bei der kombinierten Radiochemotherapie signifikant erniedrigt.

Ebenso zeigte sich bei GR-145-II die Expression zu den messbaren Zeitpunkten signifikant erniedrigt.

Bei kolorektalen Karzinomen und Gliomen konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von CCR6 mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Wang et al. 2012; Liu et al. 2014). Eine Verbesserung des Gesamtüberlebens von Patienten mit SCCHN könnte somit in Verbindung mit einem durch die Radiochemotherapie erniedrigten CCR6-Spiegel gebracht werden. Eine kombinierte Radiochemotherapie könnte sich somit für einige Subklassen der SCCHN als prognostisch günstig erweisen.

Bei der Messung von CCL20 unter Radiochemotherapie konnten unterschiedliche Expressionsmuster beobachtet werden. Im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie sind diese variablen Expressionsmuster der kombinierten Radiochemotherapie sehr ähnlich.

Bekannt ist, dass ein Tumorprogress durch eine Radiotherapie bzw. eine Radiochemotherapie aufgehalten werden kann (s. Kap. 1.2.2 und Kap. 1.2.3). Ein relevanter Unterschied zwischen der Auswirkung der beiden Therapieoptionen auf die CCL20-Expression scheint nicht zu bestehen.

Wang et al. beschrieben, dass durch die Stimulation mit CCL20 beim kolorektalen Karzinom eine erhöhte Expression von CCR6 erreicht werden konnte (Wang et al. 2014). Dies könnte einen Erklärungsansatz der erhöhten CCL20-Expression bieten. Die Zelle versucht die verringerte CCR6-Expression durch ein Mehrangebot an CCL20 zu kompensieren.

Ein anderer Erklärungsansatz könnten weitere, in dieser Arbeit nicht gemessene, Botenstoffe sein. In einer früheren Arbeit konnte eine Expressionssteigerung von CCL20 durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1beta und Tumornekrosefaktor-alpha nachgewiesen werden (Wu et al. 2007). In diesem Zusammenhang sei hier nochmals auf das Kap. 4.1.3.3 verwiesen; die dort beschriebene T-Zell-Aktivität könnte im Rahmen der proinflammatorischen Reaktion verstanden werden. Hier ist eine weitere Erforschung wünschenswert.

4.2.2.4 CCR7-Expression

CCR7 wurde von vier Zellreihen exprimiert. Bei der Normalgewebszelllinie HaCat zeigte sich eine signifikante Minderexpression von CCR7 gegenüber der unbehandelten Kontrolle und der alleinigen Radiotherapie. Im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie zeigte sich die CCR7-Expression von BHY, DF-19 und ZMK1 tendenziell erniedrigt, bezüglich der unbehandelten Kontrolle konnte keine größeren Expressionsveränderungen beobachtet werden.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den bereits bekannten Eigenschaften von CCR7. Eine CCR7-Überexpression begünstigt *in vivo* die Ausbildung von Metastasen (Wang et al. 2004; Mburu et al. 2012). Durch die Behandlung mit Radiochemotherapie bei SCCHN wird die Metastasierungswahrscheinlichkeit verringert (Hanna et al. 2004; Qian et al. 2014); ausblickend kann eine weitere SCCHN Subgruppenanalyse bezüglich CCR7 zudem auch Aufschluss über Metastasierungswahrscheinlichkeiten bieten. Die klinische Bedeutung einer solchen Analyse sollte evaluiert werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten der Expression von Chemokinliganden und -rezeptoren bei SCCHN unter Chemotherapie und kombinierter Radiochemotherapie untersucht.

Ziel dieser Untersuchung war es, ein besseres Verständnis für die auf den Tumor einwirkenden Einflüsse zu erlangen und deren Verhalten unter Therapie zu beschreiben.

Die Erhebung der Ergebnisse erfolgte durch die Anfertigung von Koloniebildungsversuchen von SCCHN- und Normalgewebszelllinien. Des Weiteren wurde die Genexpression von verschiedenen Chemokinliganden und -rezeptoren derselben Zellreihen mittels *Real-time* PCR gemessen. Bei beiden Untersuchungsmethoden wurde dabei die singuläre Chemotherapie mit der kombinierten Radiochemotherapie verglichen. Zusätzlich erfolgte der Vergleich mit der alleinigen Radiotherapie.

Durch die Therapie mit Cisplatin zeigte sich das Überleben aller Zellreihen signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vermindert. Bei den Normalgewebszelllinien war dieser Effekt jedoch weit weniger stark ausgeprägt als bei den Tumorzellen.

In den Koloniebildungsversuchen zeigte sich ein additiver Effekt der kombinierten Radiochemotherapie; eine Radiosensibilisierung konnte nicht nachgewiesen werden.

Eine Verstärkung der Expressionsveränderung der Chemokinrezeptoren und ihrer Liganden konnte durch die kombinierte Radiochemotherapie im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie in den meisten Fällen beobachtet werden.

Eine Mehrexpression unter Chemotherapie und Radiochemotherapie konnte bei CCL20 aufgezeigt werden. Dies könnte im Rahmen eines temporären Effektes, einer Kompensation bei CCR6-Minderexpression oder aber im Rahmen einer erhöhten T-Zell-Migration vorkommen. Eine verminderte CCR6-Expression korreliert mit einer Prognoseverbesserung durch die Radiochemotherapie.

Ein gegensätzliches Verhalten unter den verschiedenen Therapieformen konnte bei CCR7 dargestellt werden. Unter der Chemotherapie kam es zu einer vermehrten CCR7-Expression,

unter Radiotherapie und kombinierter Radiochemotherapie eher zu einer verminderten Expression. Eine verminderte Metastasierungswahrscheinlichkeit durch die kombinierte Radiochemotherapie kann postuliert werden.

Bei dem Chemokinrezeptor CXCR4 konnte eine Überexpression unter der Therapie nachgewiesen werden. Dies könnte für ein schlechtes Therapieansprechen der Zellen sprechen oder aber als Ausdruck einer zellulären Hypoxie mit Versuch der Neoangiogenese gedeutet werden. Eine vermehrte Expression von CXCR4 geht jedoch generell mit einer schlechten Prognose einher. Im Gegensatz hierzu konnte für den zugehörigen Liganden CXCL12 keine eindeutige Expressionsänderung nachgewiesen werden.

Eine Mehrexpression von CXCL1 und CXCL3 unter isolierter Chemotherapie und kombinierter Radiochemotherapie könnte als Ausdruck einer zellulären Regeneration gedeutet werden, welche dem Zellerhalt dienen soll. Der zugehörige Rezeptor CXCR1 konnte hingegen nur sehr vereinzelt nachgewiesen werden.

Das unterschiedliche Verhalten der Chemokinliganden und ihrer Rezeptoren stellt erneut die Vielschichtigkeit des Themas dar.

Es werden sicherlich noch weitere Forschungen nötig sein, um die Auswirkungen von Chemokinen besser zu verstehen und ihre Wirkung im klinischen Alltag zu nutzen.

6. Literaturverzeichnis

Abiko Y, Nishimura M, Kusano K, Nakashima K, Okumura K, Arakawa T, Takuma T, Mizoguchi I, Kaku T (2003):

Expression of MIP-3alpha/CCL20, a macrophage inflammatory protein in oral squamous cell carcinoma.

Arch Oral Biol 48(2): 171-175

Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, Malladi S, Kim J, Morris PG, Manova-Todorova K, Leversha M, Hogg N, Seshan VE (2012):

A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis.

Cell 150(1): 165–178

Almofti A, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Iga H, Yoshida H, Sato M (2004):

The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma.

Int J Oncol 25(1): 65-71

Ao X, Zhao L, Davis MA, Lubman DM, Lawrence TS, Kong FM (2009):

Radiation produces differential changes in cytokine profiles in radiation lung fibrosis sensitive and resistant mice.

J Hematol Oncol 2: 6

Bachmeier BE, Mohrenz IV, Mirisola V, Schleicher E, Romeo F, Höhneke C, Jochum M, Nerlich AG, Pfeffer U (2008):

Curcumin downregulates the inflammatory cytokines CXCL1 and -2 in breast cancer cells via NFkappaB.

Carcinogenesis 29(4): 779-789

Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M (2004):

Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer.

N Engl J Med 350(19): 1945-1952

Bissada E, Brana I, Siu LL (2012):

Important early advances in squamous cell carcinoma of the head and neck.

Am Soc Clin Oncol Educ Book 373-376

Böhnke A, Westphal F, Schmidt A, El-Awady RA, Dahm-Daphi J (2004):

Role of p53 mutations, protein function and DNA damage for the radiosensitivity of human tumour cells.

Int J Radiat Biol 80(1): 53-63

Brockstein BE (2011):

Management of recurrent head and neck cancer: recent progress and future directions.

Drugs 71(12): 1551-1559

- Brunotto M, Zarate AM, Bono A, Barra JL, Berra S (2014):
Risk genes in head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis of last 5 years.
Oral Oncol 50(3): 178-188
- Calcagno AM, Chewning KJ, Wu CP, Ambudkar SV (2006):
Plasma membrane calcium ATPase (PMCA4): a housekeeper for RT-PCR relative quantification of polytopic membrane proteins.
BMC Mol Biol 7: 29
- Chang KP, Hao SP, Chang JH, Wu CC, Tsang NM, Lee YS, Hsu CL, Ueng SH, Liu SC, Liu YL (2008):
Macrophage inflammatory protein-3alpha is a novel serum marker for nasopharyngeal carcinoma detection and prediction of treatment outcomes.
Clin Cancer Res 14(21): 6979-6987
- Chen L, Fan J, Chen H, Meng Z, Chen Z, Wang P, Liu L (2014):
The IL-8/CXCR1 axis is associated with cancer stem cell-like properties and correlates with clinical prognosis in human pancreatic cancer cases.
Sci Rep 4: 5911
- Christy AW, Bojan A (2013):
Targeted therapy: A novel approach in head and neck cancer.
Indian J Dent Res 24(2): 261-266
- Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S (2008):
Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR.
BMC Cancer 8: 350
- Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M (2004):
Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous cell carcinoma of the head and neck.
N Engl J Med 350(19): 1937-1944
- Delilbasi CB, Okura M, Iida S, Kogo M (2004):
Investigation of CXCR4 in squamous cell carcinoma of the tongue.
Oral Oncol 40(2): 154-157
- de Mello RA, Gerós S, Alves MP, Moreira F, Avezedo I, Dinis J (2014):
Cetuximab plus platinum-based chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective study in a single comprehensive European cancer institution.
PLoS One 9(2): e86697
- Dempke W: Lehrbuch Hämato-Onkologie, Hämatologie – Onkologie – Hämostaseologie. 1. Auflage; Hans Huber Verlag, Bern 2006

Deutsch AJ, Aigelsreiter A, Steinbauer E, Frühwirth M, Kerl H, Beham-Schmid C, Schaidler H, Neumeister P (2008):

Distinct signatures of B-cell homeostatic and activation-dependent chemokine receptors in the development and progression of extragastric MALT lymphomas.
J Pathol 215(4): 431-444

Dewey WC, Ling CC, Meyn RE (1995):

Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy.
Int J Radiat Oncol Biol Phys 33(4): 781-796

Dragovic AF, Bonner JA, Spencer SA, Nabell LM, Carroll WR, Caudell JJ (2011):

Impact of average weekly dose of radiation during radiotherapy alone or chemoradiotherapy in head and neck cancer.
Head Neck 33(11): 1551-1556

Du D, Liu Y, Qian H, Zhang B, Tang X, Zhang T, Liu W (2014):

The effects of the CCR6/CCL20 biological axis on the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma.
Int J Mol Sci 15(4): 6441-6452

Eriksson D, Stigbrand T (2010):

Radiation-induced cell death mechanisms.
Tumour Biol 31(4): 363-372

Ernst M: Eine Weltgeschichte des Platins: das achte Metall. 1. Auflage; H. Gietl Verlag & Publikationsservice GmbH, Regenstauf 2010

Facoetti A, Mariotti L, Ballarini F, Bertolotti A, Nano R, Pasi F, Ranza E, Ottolenghi A (2009):

Experimental and theoretical analysis of cytokine release for the study of radiation-induced bystander effect.
Int J Radiat Biol 85(8): 690-699

Ferreira FO, Ribeiro FL, Batista AC, Leles CR, de Cássia Gonçalves Alencar R, Silva TA (2008):

Association of CCL2 with lymph node metastasis and macrophage infiltration in oral cavity and lip squamous cell carcinoma.
Tumour Biol 29(2): 114-121

Gasparini G, Testolin A, Maluta S, Cristoferi V, Pozza F (1993):

Treatment of locally advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck with concurrent radiochemotherapy - randomized comparison of Cisplatin versus Carboplatin.
Int J Oncol 2(2): 185-190

Gerber PA, Hippe A, Buhren BA, Müller A, Homey B (2009):

Chemokines in tumor-associated angiogenesis.
Biol Chem 390(12): 1213-1223

- Giuliano S, Guyot M, Grépin R, Pagès G (2014):
The ELR+CXCL chemokines and their receptors CXCR1/CXCR2: A signaling axis and new target for the treatment of renal cell carcinoma.
Oncoimmunology 3: e28399
- Grégoire V, Lefebvre J-L, Licitra L, Felip E (2010):
Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, Treatment and follow-up.
Ann Oncol 21 Suppl 5: v184-186
- Gremy O, Benderitter M, Linard C (2008):
Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal gamma-irradiation.
World J Gastroenterol 14(46): 7075-7085
- Gu Q, He Y, Ji J, Yao Y, Shen W, Luo J, Zhu W, Cao H, Geng Y, Xu J, Zhang S, Cao J, Ding WQ (2015):
Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and reactive oxygen species (ROS) mediates radiation-induced invasiveness through the SDF-1 α /CXCR4 pathway in non-small cell lung carcinoma cells.
Oncotarget 6(13): 10893-10907
- Hakenewerth AM, Millikan RC, Rusyn I, Herring AH, North KE, Barnholtz-Sloan JS, Funkhouser W, Weissler MC, Olshan AF (2011):
Joint effects of alcohol consumption and polymorphisms in alcohol and oxidative stress metabolism genes on risk of head and neck cancer.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 20(11): 2438-2449
- Hanna E, Alexiou M, Morgan J, Badley J, Maddox AM, Penagaricano J, Fan CY, Breau R, Suen J (2004):
Intensive chemoradiotherapy as a primary treatment for organ preservation in patients with advanced cancer of the head and neck: efficacy, toxic effects, and limitations.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 130(7): 861-867
- Hauswald H, Simon C, Hecht S, Debus J, Lindel K (2011):
Long-term outcome and patterns of failure in patients with advanced head and neck cancer.
Radiat Oncol 6: 70
- Hedrick JA, Zlotnik A (1996):
Chemokines and lymphocyte biology.
Curr Opin Immunol 8(3): 343-347
- Huguenin P, Beer KT, Allal A, Rufibach K, Friedli C, Davis JB, Pestalozzi B, Schmid S, Thöni A, Ozsahin M (2004):
Concomitant cisplatin significantly improves locoregional control in advanced head and neck cancers treated with hyperfractionated radiotherapy.
J Clin Oncol 22(23): 4665-4673

- Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U (2010):
Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends, 7. Ausgabe
Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Robert-Koch-
Institut
http://www.rki.de/cln_160/nn_204124/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/KID/kid__no.de.html?__nnn=true
- Ishikawa T, Nakashiro K, Hara S, Klosek SK, Li C, Shintani S, Hamakawa H (2006):
CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral squamous cell
carcinoma.
Int J Oncol 28(1): 61-66
- Johnston CJ, Williams JP, Okunieff P, Finkelstein JN (2002):
Radiation-induced pulmonary fibrosis: examination of chemokine and chemokine
receptor families.
Radiat Res 157(3): 256-265
- Kakinuma T, Hwang ST (2006):
Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis.
J Leukoc Biol 79(4): 639-651
- Kato A, Chustz RT, Ogasawara T, Kulka M, Saito H, Schleimer RP, Matsumoto K (2009):
Dexamethasone and FK506 inhibit expression of distinct subsets of chemokines in
human mast cells.
J Immunol 182(11): 7233-7243
- Khademi B, RaZMK-1hah M, Erfani N, Gharagozloo M, Ghaderi A (2008):
SDF-1 and CCR5 genes polymorphism in patients with head and neck cancer.
Pathol Oncol Res 14(1): 45-50
- Koishi K, Yoshikawa R, Tsujimura T, Hashimoto-Tamaoki T, Kojima S, Yanagi H,
Yamamura T, Fujiwara Y (2006):
Persistent CXCR4 expression after preoperative chemoradiotherapy predicts early
recurrence and poor prognosis in esophageal cancer
World J Gastroenterol 12(47): 7585–7590
- Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeit und Trends. 7. Ausgabe; Robert Koch-Institut
(Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.),
Berlin 2010
- Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die
Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012
- Kua VF, Ismail F, Chee Ee Phua V, Aslan NM (2013):
Carboplatin/5-fluorouracil as an alternative to cisplatin/5- fluorouracil for metastatic
and recurrent head and neck squamous cell carcinoma and nasopharyngeal carcinoma.
Asian Pac J Cancer Prev 14(2): 1121-1126

- Lefebvre J-L (2005):
Current clinical outcomes demand new treatment options for SCCHN.
Ann Oncol 16(suppl 6): vi7-vi12
- Li L, Khan MN, Li Q, Chen X, Wei J, Wang B, Cheng JW, Gordon JR, Li F (2015):
G31P, CXCR1/2 inhibitor, with cisplatin inhibits the growth of mice hepatocellular carcinoma and mitigates high-dose cisplatin-induced nephrotoxicity.
Oncol Rep 33(2): 751-757
- Li Z, Wang Y, Dong S, Ge C, Xiao Y, Li R, Ma X, Xue Y, Zhang Q, Lv J, Tan Q, Zhu Z, Song X, Tan J (2014):
Association of CXCR1 and 2 expressions with gastric cancer metastasis in ex vivo and tumor cell invasion in vitro.
Cytokine 69(1): 6-13
- Linard C, Marquette C, Mathieu J, Pennequin A, Clarençon D, Mathé D (2004):
Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor.
Int J Radiat Oncol Biol Phys 58(2): 427-434
- Liu J, Ke F, Xu Z, Liu Z, Zhang L, Yan S, Wang Z, Wang H, Wang H (2014):
CCR6 is a prognostic marker for overall survival in patients with colorectal cancer, and its overexpression enhances metastasis in vivo.
PLoS One 9(6): e101137
- Lugade AA, Sorensen EW, Gerber SA, Moran JP, Frelinger JG, Lord EM (2008):
Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity.
J Immunol 180(5): 3132-3139
- Malik IA, Moriconi F, Sheikh N, Naz N, Khan S, Dudas J (2010):
Single-dose gamma-irradiation induces up-regulation of chemokine gene expression and recruitment of granulocytes into the portal area but not into other regions of rat hepatic tissue.
Am J Pathol 176(4): 1801-1815
- Marples B, Wouters BG, Collis SJ, Chalmers AJ, Joiner MC (2004):
Low-dose hyper-radiosensitivity: a consequence of ineffective cell cycle arrest of radiation-damaged G2-phase cells.
Radiat Res 161(3): 247-255
- Matsumura S, Wang B, Kawashima N, Braunstein S, Badura M, Cameron TO, Babb JS, Schneider RJ, Formenti SC, Dustin ML (2008):
Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells.
J Immunol 181(5): 3099-3107

- Mburu YK, Egloff AM, Walker WH, Wang L, Seethala RR, van Waes C, Ferris RL (2012):
Chemokine Receptor 7 (CCR7) Gene Expression Is Regulated by NF- κ B and
Activator Protein 1 (AP1) in Metastatic Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck
(SCCHN).
J Biol Chem 287(5): 3581–3590
- Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Mañes S, Martínez-A C (2001):
Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and
TK pathway activation.
Annu Rev Immunol 19: 397-421
- Michiels K, Schutyser E, Conings R, Lenaerts JP, Put W, Nuyts S, Delaere P, Jacobs R,
Struyf S, Proost P (2009):
Carcinoma cell-derived chemokines and their presence in oral fluid.
Eur J Oral Sci 117(4): 362-368
- Mihaescu A, Santen S, Jeppsson B, Thorlacius H (2010):
p38 Mitogen-activated protein kinase signalling regulates vascular inflammation and
epithelial barrier dysfunction in an experimental model of radiation-induced colitis.
Br J Surg 97(2): 226-234
- Miyazaki H, Patel V, Wang H, Edmunds RK, Gutkind JS, Yeudall WA (2006):
Down-regulation of CXCL5 inhibits squamous carcinogenesis.
Cancer Res 66(8): 4279-4284
- Moriconi F, Christiansen H, Raddatz D, Dudas J, Hermann RM, Rave-Fränk M, Sheikh N,
Saile B, Hess CF, Ramadori G (2008):
Effect of radiation on gene expression of rat liver chemokines: in vivo and in vitro
studies.
Radiat Res 169(2): 162-169
- Mrizak D, Martin N, Barjon C, Jimenez-Pailhes AS, Mustapha R, Niki T, Guigay J, Pancré V,
de Launoit Y, Busson P (2014):
Effect of nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes on human regulatory T cells.
J Natl Cancer Inst 107(1): 363
- Muller A, Sonkoly E, Eulert C, Gerber PA, Kubitza R, Schirlau K, Franken-Kunkel P,
Poremba C, Snyderman C, Klotz LO (2006):
Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and
regulation during chemotherapy.
Int J Cancer 118(9): 2147-2157
- Müller K, Meineke V (2007):
Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells.
Exp Hematol 35(4 Suppl 1): 96-104
- Oliveira-Neto HH, Silva ET, Leles CR, Mendonça EF, Alencar Rde C, Silva TA, Batista AC
(2008):
Involvement of CXCL12 and CXCR4 in lymph node metastases and development of
oral squamous cell carcinomas.
Tumour Biol 29(4): 262-271

- Palacios DA, Miyake M, Rosser CJ (2013):
Radiosensitization in prostate cancer: mechanisms and targets.
BMC Urol 13: 4
- Qian W, Zhu G, Ji Q, Guo Y, Wang Y, Wang Y (2014):
Outcome and prognostic factors of 125 loco-regionally advanced head and neck squamous cell carcinoma treated with multi-modality treatment.
Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 36(3): 217-222
- Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A (2007):
Role of chemokines in tumor growth.
Cancer Lett 256(2): 137-165
- Rave-Fränk M, Glomme S, Hertig J, Weiss E, Pradier O, Hess CF, Virsik-Köpp P, Schmidberger H (2002):
Combined effect of topotecan and irradiation on the survival and the induction of chromosome aberrations in vitro.
Strahlenther Onkol 178(9): 497-503
- Rossi D, Zlotnik A (2000):
The biology of chemokines and their receptors.
Annu Rev Immunol 18: 217-242
- Rothkamm K, Löbrich M (2002):
Misrepair of radiation-induced DNA double-strand breaks and its relevance for tumorigenesis and cancer treatment (review).
Int J Oncol 21(2): 433-440
- Rothkamm K, Löbrich M (2003):
Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses.
Proc Natl Acad Sci USA 100(9): 5057-5062
- Rubie C, Frick VO, Ghadjar P, Wagner M, Justinger C, Graeber S, Sperling J, Kollmar O, Schilling MK (2011):
Effect of preoperative FOLFOX chemotherapy on CCL20/CCR6 expression in colorectal liver metastases.
World J Gastroenterol 17(26): 3109–3116
- Samara GJ, Lawrence DM, Chiarelli CJ, Valentino MD, Lyubsky S, Zucker S, Vaday GG (2004):
CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma.
Cancer Lett 214(2): 231-241
- Sanzari JK, Nuth M, Kennedy AR (2009):
Induction of cytokine gene expression in human thyroid epithelial cells irradiated with HZE particles (iron ions).
Radiat Res 172(4): 437-443

- Schmoll HJ, Dunst J, Becker A, Fleig WE (1997):
Simultane Radiotherapie.
Dtsch Arztebl 94(48): A-3277 / B-2759 / C-2445
- Seignez C, Martin A, Rollet CE, Racoeur C, Scagliarini A, Jeannin JF, Bettaieb A, Paul C (2014):
Senescence of tumor cells induced by oxaliplatin increases the efficiency of a lipid A immunotherapy via the recruitment of neutrophils.
Oncotarget 5(22): 11442–11451
- Shahrara S, Amin MA, Woods JM, Haines GK, Koch AE (2003):
Chemokine receptor expression and in vivo signaling pathways in the joints of rats with adjuvant-induced arthritis.
Arthritis Rheum 48(12): 3568-3583
- Shakir M, Tang D, Zeh HJ, Tang SW, Anderson CJ, Bahary N, Lotze MT (2015):
The Chemokine Receptors CXCR4/CXCR7 and Their Primary Heterodimeric Ligands CXCL12 and CXCL12/High Mobility Group Box 1 in Pancreatic Cancer Growth and Development: Finding Flow.
Pancreas 44(4): 528-534
- Siddiqui F, Raben D, Lu JJ, Grecula JC, Lo SS, Huang Z, Mayr NA, Teh BS, Yao M (2011):
Emerging applications of stereotactic body radiation therapy for head and neck cancer.
Expert Rev Anticancer Ther 11(9): 1429-1436
- Siegenthaler W, Blum HE: Klinische Pathophysiologie. 9. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006
- Singh S, Nannuru KC, Sadanandam A, Varney ML, Singh RK (2009):
CXCR1 and CXCR2 enhances human melanoma tumorigenesis, growth and invasion.
Br J Cancer 100(10): 1638–1646
- Sison EAR, McIntyre E, Magoon D, Brown P (2013):
Dynamic chemotherapy-induced upregulation of surface CXCR4 expression as a mechanism of chemotherapy resistance in pediatric acute myeloid leukemia.
Mol Cancer Res 11(9): 1004–1016
- Soriano SF, Serrano A, Hernanz-Falcón P, Martín de Ana A, Monterrubio M, Martínez C, Rodríguez-Frade JM, Mellado M (2003):
Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses.
Eur J Immunol 33(5): 1328-1333
- St John MA, Abemayor E, Wong DT (2006):
Recent new approaches to the treatment of head and neck cancer.
Anticancer Drugs 17(4): 365-375

- Tabouret E, Tchoghandjian A, Denicolai E, Delfino C, Metellus P, Graillon T, Boucard C, Nanni I, Padovani L, Ouafik L, Figarella-Branger D, Chinot O (2015):
Recurrence of glioblastoma after radio-chemotherapy is associated with an angiogenic switch to the CXCL12-CXCR4 pathway.
Oncotarget 6(13): 11664-11675
- Tamas K, Domanska UM, van Dijk TH, Timmer-Bosscha H, Havenga K, Karrenbeld A, Sluiter WJ, Beukema JC, van Vugt MA, de Vries EG, Hospers GA, Walenkamp AM (2015):
CXCR4 and CXCL12 Expression in Rectal Tumors of Stage IV Patients Before and After Local Radiotherapy and Systemic Neoadjuvant Treatment.
Curr Pharm Des 21(17): 2276-2283
- Tan CT, Chu CY, Lu YC, Chang CC, Lin BR, Wu HH, Liu HL, Cha ST, Prakash E, Ko JY (2008):
CXCL12/CXCR4 promotes laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma metastasis through MMP-13-dependent invasion via the ERK1/2/AP-1 pathway.
Carcinogenesis 29(8): 1519-1527
- Tang C, Yang L, Wang N, Li L, Xu M, Chen GG, Liu ZM (2014):
High expression of GPER1, EGFR and CXCR1 is associated with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma.
Int J Clin Exp Pathol 7(6): 3213-3223
- Tschiesner U, Schuster L, Strieth S, Harréus U (2012):
Functional outcome in patients with advanced head and neck cancer: surgery and reconstruction with free flaps versus primary radiochemotherapy.
Eur Arch Otorhinolaryngol 269(2): 629-638
- Tsuzuki H, Takahashi N, Kojima A, Narita N, Sunaga H, Takabayashi T, Fujieda S (2006):
Oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas expressing CCR7 have poor prognoses.
Auris Nasus Larynx 33(1): 37-42
- Urba SG (1999):
Concurrent chemoradiotherapy in head and neck cancer.
Curr Oncol Rep 1(2): 105-109
- Wang D, Li J, Liu JY, Li F, Wang LP, Huang L, Li JY, Chen XF, Liu JB, Wu CC (2014):
Modification of chemokine receptor expression to enhance levels of trafficking receptors on autologous cytokine-induced killer cells derived from patients with colorectal cancer.
Biomed Pharmacother 68(5): 551-556
- Wang F, Arun P, Friedman J, Chen Z, Van Waes C (2009):
Current and potential inflammation targeted therapies in head and neck cancer.
Curr Opin Pharmacol 9(4): 389-395
- Wang J, Xi L, Hunt JL, Gooding W, Whiteside TL, Chen Z, Godfrey TE, Ferris RL (2004):
Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell carcinoma of the head and neck identifies a novel metastatic phenotype.
Cancer Res 64(5): 1861-1866

- Wang J, Xi L, Gooding W, Godfrey TE, Ferris RL (2005a):
Chemokine receptors 6 and 7 identify a metastatic expression pattern in squamous cell carcinoma of the head and neck.
Adv Otorhinolaryngol 62: 121-133
- Wang J, Zhang X, Thomas SM, Grandis JR, Wells A, Chen ZG, Ferris RL (2005b):
Chemokine receptor 7 activates phosphoinositide-3 kinase-mediated invasive and prosurvival pathways in head and neck cancer cells independent of EGFR.
Oncogene 24(38): 5897-5904
- Wang J, Seethala RR, Zhang Q, Gooding W, van Waes C, Hasegawa H, Ferris RL (2008):
Autocrine and paracrine chemokine receptor 7 activation in head and neck cancer: implications for therapy.
J Natl Cancer Inst 100(7): 502-512
- Wang L, Qin H, Li L, Zhang Y, Tu Y, Feng F, Ji P, Zhang J, Li G, Zhao Z (2012):
Overexpression of CCL20 and its receptor CCR6 predicts poor clinical prognosis in human gliomas.
Med Oncol 29(5): 3491-3497
- Wen DS, Zhu XL, Guan SM, Wu YM, Yu LL, Wu JZ (2008):
Silencing of CXCR4 inhibits the proliferation, adhesion, chemotaxis and invasion of salivary gland mucoepidermoid carcinoma Mc3 cells in vitro.
Oral Oncol 44(6): 545-554
- Wild S (2001):
Strukturelle und funktionelle Eigenschaften neuer cis-Platin-Chelatkomplexe und ihrer DNA-Addukte: Relevanz für die cytotoxische Wirkung.
Chemisch-pharmazeutische Dissertation München 2001
- Wolff HA, Overbeck T, Roedel RM, Hermann RM, Herrmann MK, Kertesz T, Vorwerk H, Hille A, Matthias C, Hess CF (2009):
Toxicity of daily low dose cisplatin in radiochemotherapy for locally advanced head and neck cancer.
J Cancer Res Clin Oncol 135(7): 961-967
- Wolff HA, Gaedcke J, Jung K, Hermann RM, Rothe H, Schirmer M, Liersch T, Herrmann MK, Hennies S, Rave-Fränk M (2010):
High-grade acute organ toxicity during preoperative radiochemotherapy as positive predictor for complete histopathologic tumor regression in multimodal treatment of locally advanced rectal cancer.
Strahlenther Onkol 186(1): 30-35
- Wolff HA, Raus I, Jung K, Schüler P, Herrmann MK, Hennies S, Vorwerk H, Hille A, Hess CF, Christiansen H (2011a):
High-grade acute organ toxicity as a positive prognostic factor in primary radiochemotherapy for anal carcinoma.
Int J Radiat Oncol Biol Phys 79(5): 1467-1478

- Wolff HA, Rolke D, Rave-Fränk M, Schirmer M, Eicheler W, Doerfler A, Hille A, Hess CF, Matthias C, Rödel RM (2011b):
Analysis of chemokine and chemokine receptor expression in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell lines.
Radiat Environ Biophys 50(1): 145-154
- Wong MM, Fish EN (2003):
Chemokines: attractive mediators of the immune response.
Semin Immunol 15(1): 5-14
- Wu YY, Tsai HF, Lin WC, Hsu PI, Shun CT, Wu MS, Hsu PN (2007):
Upregulation of CCL20 and recruitment of CCR6+ gastric infiltrating lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis.
Infect Immun 75(9): 4357-4363
- Yang H, Diao LQ, Shi M, Ma R, Wang JH, Li JP, Xiao F, Xue Y, Xu M, Zhou B (2013):
Efficacy of intensity-modulated radiotherapy combined with chemotherapy or surgery in locally advanced squamous cell carcinoma of the head-and-neck.
Biologics 7: 223-229
- Yeudall WA, Miyazaki H (2007):
Chemokines and squamous cancer of the head and neck: targets for therapeutic intervention?
Expert Rev Anticancer Ther 7(3): 351-360
- Yu Q, Lou XM, He Y (2015):
Preferential Recruitment of Th17 Cells to Cervical Cancer via CCR6-CCL20 Pathway.
PLoS One 10(3): e0120855
- Zhou W, Jiang Z, Song X, Liu Y, Wen P, Guo Y, Xu F, Kong L, Zhang P, Han A (2008):
Promoter hypermethylation-mediated down-regulation of CXCL12 in human astrocytoma.
J Neurosci Res 86(13): 3002-3010
- Zlotnik A (2006a):
Chemokines and cancer.
Int J Cancer 119(9): 2026-2029
- Zlotnik A (2006b):
Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis.
Contrib Microbiol 13: 191-199
- Zlotnik A, Yoshie O (2012):
The chemokine superfamily revisited.
Immunity 36(5): 705-716
- Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H (2006):
The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution.
Genome Biol 7(12): 243

Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn PD Dr. med. Hendrik Wolff für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Er hat mich während meiner Promotion begleitet, stand mir immer mit Rat und Tat bei allen Fragen zur Seite.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Margret Rave-Fränk. Ihr danke ich für die sachkundige, erfahrene und wertvolle Beratung und Begutachtung meiner Arbeit. Ihre Anregungen und konstruktiven Kommentare haben zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen.

Außerdem danke ich Herrn Dr. med. Markus Schirmer für die professionelle und geduldige Einführung in das Gebiet der Genexpression sowie für seine Beratung und Unterstützung.

Dank auch an Herrn Prof. Hess für die Möglichkeit, in seiner Abteilung zu arbeiten und zu forschen.

David Rolke danke ich für die immer fröhliche und harmonische Zusammenarbeit sowie für das Einlernen im Bereich der Zellkultur und die Bereitstellung seiner erhobenen Daten.

Juliane Kasten-Krapp, Alexandra Bitter und Sandra Hoffmeister danke ich ganz besonders für ihr jederzeit tatkräftiges und herzliches Entgegenkommen.