

Aus dem Lehrstuhl
für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
Klinikdirektor Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Einfluss adrenerger Faktoren bei Kopf-Hals-Tumoren

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nils Gade

2024

Aus dem Lehrstuhl
für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
Klinikdirektor Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Einfluss adrenerger Faktoren bei Kopf-Hals-Tumoren

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nils Gade

2024

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Richard Bauer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Carola Kolbeck

Tag der mündlichen Prüfung:

27.11.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	8
1.1 Das orale Plattenepithelkarzinom	8
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	8
1.1.2 Lokalisation, Symptome und Diagnose	10
1.1.3 Therapie und Prognose von Kopf-Hals-Tumoren	11
1.2 Adrenerger Stoffwechsel	13
1.2.1 Adrenozeptoren, deren Funktionsweise und Beeinflussung	13
1.2.2 Adrenerger Stoffwechsel in gesunden Keratinozyten	15
1.3 Tumorstoffwechsel	16
1.3.1 Adrenerger Stoffwechsel im Tumor	16
1.3.2 Wachstum	16
1.3.3 Knochenstoffwechsel	17
1.3.4 Metastasierung	18
1.4 Therapieansätze	20
1.5 Der β -Blocker Propranolol	22
1.6 Zielsetzung der Arbeit	23
2 Material	24
2.1 Zelllinien	24

2.2	Kulturmedium	25
2.3	Kits	25
2.4	Reagenzien und Lösungen	25
2.5	Verbrauchsmaterialien	28
2.6	Geräte	29
2.7	Puffer und Lösungen	31
2.7.1	Zellkultur	31
2.7.2	Lebend Todfärbung	31
2.7.3	Western Blot	32
2.7.4	qPCR	37
2.8	Software	38
3	Methoden	39
3.1	Zellkultur.....	39
3.1.1	2D-Zellkultur	39
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl	40
3.2	Lebend-Tod-Färbung	40
3.2.1	Inkubation mit Propranolol.....	41
3.2.2	Zählung der lebenden und abgestorbene Zellen.....	43
3.3	Proteinbiochemie	44
3.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	44

3.3.2	Western Blot	47
3.3.3	qPCR	52
4	Ergebnisse	57
4.1	Einfluss von Propranolol auf die Überlebensfähigkeit von HNSCC-Zellen .	57
4.1.1	Versuchsaufbau und Erklärung	58
4.1.2	Einfluss der Konzentration und Einwirkdauer von Propranolol auf Zellen der Linie D562	61
4.1.3	Einfluss der Konzentration und Einwirkdauer von Propranolol auf Zellen der Linie SCC9	67
4.1.4	Einfluss der Konzentration und Einwirkdauer von Propranolol auf Zellen der Linie SCC15	73
4.1.5	Einfluss der Konzentration und Einwirkdauer von Propranolol auf Zellen der Linie A253	79
4.1.6	Einfluss der Konzentration und Einwirkdauer von Propranolol auf Zellen der Linie FaDu	85
4.1.7	Zusammenfassung der Ergebnisse von 4.1	90
4.2	Proteinexpression im Western Blot	92
4.2.1	Proteinexpression von E-Cadherin und P-Cadherin.....	92
4.2.2	Proteinexpression von E-Cadherin	93
4.2.3	Proteinexpression von P-Cadherin	95
4.2.4	Proteinexpression von CD44	96
4.2.5	Proteinexpression von Twist.....	98

4.2.6	Proteinexpression GSK3 β	99
4.3	Genexpression in der qPCR	101
4.3.1	Genexpression von GSK3 β	102
4.4	Genexpression von MMP2 & MMP9	104
4.5	Expression von OPG und RANKL in der qPCR	108
4.6	Expression von EGFR in der qPCR	112
4.7	Genexpression von VEGFR1	114
5	Diskussion	117
5.1	Vorarbeiten und Grundlage	117
5.2	Adrenerge Faktoren als Einfluss auf das Überleben von HNSCC	118
5.3	Adrenerge Faktoren als Einfluss auf die Proliferation und Metastasierung von HNSCC	119
5.3.1	Überaktivierung bestimmter Signalwege und deren Beeinflussung durch Propranolol	120
5.3.2	Einfluss von Propranolol auf Matrixmetalloproteasen als wichtigen Faktor für das Wachstum in umliegendes Gewebe	121
5.3.3	Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch HNSCC nach der Behandlung mit Propranolol	122
5.3.4	Einfluss auf die Blutgefäßbildung des Tumors durch Propranolol	123
6	Zusammenfassung.....	125
7	Abbildungsverzeichnis	126
8	Abkürzungsverzeichnis	132

9	Tabellenverzeichnis	137
10	Literaturverzeichnis	139
11	Danksagung	149

1 Einleitung

1.1 Das orale Plattenepithelkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Krebs der Mundhöhle hat eine der zehn höchsten Inzidenzen weltweit und betrifft Männer mehr als doppelt so häufig wie Frauen.¹ Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei HPV-negativen Befunden mit 66 Jahren höher als das bei HPV-positiven mit 53 Jahren.² Zählt man zur Mundhöhle und dem nicht keratinisierten Bereich der Lippe noch die Nasenhöhle, die Nasennebenhöhlen, den Oropharynx und den Larynx, ergeben sich weltweit bis zu 700.000 neuen Fällen pro Jahr und bis zu 380.000 Toten pro Jahr.³ Histologisch gesehen, stellen sich 95 % der malignen Läsionen in der Mundhöhle als Plattenepithelkarzinome dar.⁴ Zu den wichtigsten Risikofaktoren gehören Tabak- und Alkoholkonsum, das Kauen der Betelnuss und eine Infektion mit einem Humanen Papillomavirus (HPV).² Während des Tabakkonsums, ob rauchfrei oder nicht, entstehen z.B. tabakspezifische Nitrosamine, die als karzinogen gelten. Dabei wird die DNA-Struktur der Zelle durch eine Bindung des karzinogenen Agens verändert. Durch Mutation bestimmter Gene innerhalb der Zelle und deren unkontrollierter Teilung entsteht dann im weiteren Verlauf ein Karzinom.⁵ Das gleiche gilt für das Betelnusskauen.⁶ Bei diesen HPV-negativen Tumoren spielen in der frühen Entstehung sogenannte Tumorsuppressorgene wie das TP53 und CDKNA2 eine entscheidende Rolle.^{7,8} Bei einer gesunden Mukosa kann das p16 Protein, das durch das CDKNA2-Gen kodiert wird, die cyklin-abhängige Kinase inhibieren, wodurch die Epithelzelle nicht von der G1 in die S-Phase während der Replikation übergehen kann. Bei Tumorzellen ist ein Verlust oder eine Inaktivierung des p16-Promotors durch Hypermethylierung in über 50 % der Tumoren zu beobachten.⁷ Ein weiteres wichtiges Gen ist das TP53. Im Bereich der vorderen Mundhöhle und der vorderen zwei Drittel der Zunge ist in über 75 % der Fälle eine Mutation des TP53-Gens zu finden. Das TP53 Gen kodiert das p53 Protein, welches bei einer Genschädigung der Zelle durch eine Phosphorylierung stabilisiert wird und sich durch eine Konformationsänderung

von seinem natürlichen Inhibitor löst und über eine Aktivierung von weiteren Genen, die den Zellzyklus und die Apoptose regulieren, einen Untergang der Zelle einleitet.⁸ Diese Inaktivierungen führen im frühen Stadium zu einem Übergang von einer normalen Mukosa über eine hyperplastische zu einer Mukosa mit dysplastischen Zellen². Beim Übergang von einer Dysplasie zu einem Carcinoma in situ spielt eine Überexpression des Cyclin D1 Proteins, welches durch das CCDN1 Gen kodiert wird, eine entscheidende Rolle. Bei 30 % bis 50 % der Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren findet man eine verstärkte Expression des CCDN1 Gens. Cyclin D1 sorgt dafür, dass die G1-Phase des Zellzyklus schneller abläuft, und ist damit für eine unkontrollierte Vermehrung der Zellen mitverantwortlich.⁹ Durchbrechen die Zellen die Basalmembran, spricht man von einem invasiven Karzinom.² Ein Faktor für die Migration der Karzinomzellen ist der Verlust des PTEN, eines weiteren Tumorsuppressorgens, das durch Dephosphorylierung des Membranlipids Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), ein Produkt der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI₃K), den PTEN/PI₃K/PKB-Signalweg hemmt. In seiner aktiven, phosphorylierten Form bindet PIP₃ die Serin/Threonin-Kinase Akt, ein Protoonkogen, und führt damit zu einer Vielzahl von Prozessen, zu denen auch das Zellwachstum und die Zellproliferation gehören. Weiterhin kann PI₃K durch das Protoonkogen Ras aktiviert werden.^{10,11} Bei HPV-positiven Tumoren sind Hochrisikotypen, wie 16 und 18 des HP-Virus (HPV16 und HPV18), an der Entstehung beteiligt.¹² Durch das virale Onkoprotein E6 kommt es in den virusinfizierten Keratinozyten zu einer Herunterregulierung des Tumorsuppressorproteins p53. E7, ein weiteres virales Onkoprotein, bindet an pRb (Retinoblastomprotein), wodurch letztendlich eine vermehrte, unkontrollierte Replikation der Zelle stattfinden kann.¹³ Weitere Faktoren, die eine Entstehung von oralen Plattenepithelkarzinomen begünstigen, sind zahn- und zahnhalteapparatbezogene. Zu nennen sind hierbei Bakterien, die zum sogenannten roten Komplex gehören, wie Porphyromonas gingivalis, die im parodontal geschädigten Gebiss anzufinden sind. Wegen einer Überregulierung der inflammatorischen Antwort auf diese Erreger und des dadurch entstehenden oxidativen Stresses in den Epithelzellen, resultiert daraus eine Schädigung der DNA der Zellen.¹⁴ Diskutiert wird auch der Einfluss von schlecht sitzendem Zahnersatz. Entsteht ein chronisches Trauma der Mukosa, kann dies über eine direkte Irritation

oder eine Entzündungsreaktion zu Schäden in der DNA führen und somit die Entstehung eines Karzinoms begünstigen.¹⁵ Ein weiterer Hinweis auf die Rolle chronischer Gewebereizungen könnte sein, dass ohne Risikofaktoren wie Rauchen das Karzinom in knapp 60 % der Fälle am Zungenrand entstehen. Dort, wo am häufigsten Traumata durch schlechten Zahnersatz oder scharfe Kanten entstehen.¹⁶ Darüber hinaus haben Personen mit einem geschwächten Immunsystem ein erhöhtes Risiko, einen malignen Tumor zu entwickeln, sei diese durch eine Krankheit wie das HI-Virus ausgelöst oder durch Medikamente bei Organtransplantierten. Abschließend kann man sagen, dass die genetische Prädisposition an der Entstehung oder der Verhinderung eines Karzinoms beteiligt ist. Die Verstoffwechslung der Karzinogene oder die Fähigkeit zur Reparatur von DNA-Schäden sind hier zu betrachten. Als beispielhaft kann man das Cytochrom-P450-Enzym in seiner Verstoffwechslung der Tabakkarzinogene sehen. Es wird vermutet, dass eine genetische Veränderung im Enzym in verschiedenen Individuen auch eine unterschiedliche Verstoffwechslung zur Folge hat, die im Endeffekt einen positiven oder negativen Einfluss auf die Karzinogenese hat.¹⁷

1.1.2 Lokalisation, Symptome und Diagnose

Die Mundhöhle umfasst die Schleimhäute der Zunge, des Mundbodens, der Wangen, des Gaumens und die des Alveolarkams.² In über 25 % der Fälle ist das Karzinom am Zungenrand lokalisiert.¹⁸ Betrachtet man die HPV-positiven Befunde isoliert, sind diese häufiger im Oropharynx, speziell in der Schleimhaut der Gaumenmandeln, lokalisiert.^{19,20} Anfänglich finden sich potenziell maligne Veränderungen (PMD), beispielsweise in Form von Leukoplakien, Erythroleukoplakien oder eines oralen Lichen planus dar.²¹ Eine Leukoplakie wird als eine nicht abwischbare, weißliche Veränderung der Mundschleimhaut bezeichnet.²² Sie kann sich als verrukös, oder glatt präsentieren, bei der Erythroleukoplakie mit roten, makulösen Veränderungen dazwischen.²³ Eine Erythroplakie, ein roter Bereich, der nicht anders zu definieren ist, stellt sich zu über 90 % als schwer oder mild dysplastisch oder Karzinom, in situ wie invasiv dar.²⁴ Klinisch stellt sich ein Karzinom unterschiedlich dar. Es tritt häufig als Ulkus in Erscheinung, kann sich aber auch durch eine Blutungsquelle, einen lockeren Zahn oder eine nicht heilende Extraktionswunde manifestieren.²⁵ Im fortgeschrittenen

Stadium können sich bei den Betroffenen auch Schmerzen, Taubheit, Schluckbeschwerden, oder vergrößerte Lymphknoten in der Halsregion, sowie körperliche Symptome, wie Gewichtsverlust und Nachtschweiß bemerkbar machen.²⁶ Wird das Karzinom in einem frühen Stadium entdeckt, sind die Erfolgsaussichten auf eine Heilung höher, als wenn es in einem späteren Stadium entdeckt wird.²⁷ Daher kommt der frühen Diagnose eine besondere Rolle zu. Hierbei ist der Zahnarzt besonders gefordert, eine PMD zu erkennen und weiter abzuklären.²² Eine Läsion der Mundhöhle, die nach zwei bis drei Wochen nicht abheilt, sollte weiteren Diagnoseschritten zugeführt werden.²⁵ Um solche Läsionen zu entdecken, muss die gesamte Mundhöhle des Patienten durch den Zahnarzt untersucht werden. Suspekte Veränderungen sollten vom Behandler genau beschrieben und dokumentiert werden. Auch extraoral wird die Submandibulär- und Halsregion nach vergrößerten Lymphknoten palpirt.²⁶ Sollte ein Befund zur Abklärung identifiziert werden, gilt die Biopsie als Goldstandard.²⁸ Routinemäßig wird bei einem positiven Befund eine Computertomographie (CT) durchgeführt, um kortikale Zerstörungen und Infiltrationen zu erkennen, aber auch um weitere suspekte Lymphknoten und Metastasen zu identifizieren.²⁵ Der Befund wird dann per TNM-Klassifikation (T=Tumor, N=Nodal status, M=Metastases) in ein Stadium eingeteilt.²⁶

1.1.3 Therapie und Prognose von Kopf-Hals-Tumoren

Als Therapie der Wahl gilt die operative Entfernung des Primärtumors. Dadurch kann nach der Operation genau festgestellt werden, ob das gesamte erkrankte Gewebe entfernt wurde.²⁹ Als Ziel gilt es, in allen Dimensionen 5 mm breite gesunde Geweberänder um den Tumor herum zu erreichen. Dies wird mit Hilfe der Histologie am Mikroskop kontrolliert. Für den Behandler stellt sich dieser Bereich makroskopisch ungefähr zehn bis 15 mm breit dar.²⁵ Orale Plattenepithelkarzinome metastasieren schnell in die zervikalen Lymphbahnen, ipsilateral und seltener auch kontralateral.²⁴ Von dieser Annahme leitet sich auch die Therapieempfehlung ab, dass selbst bei unauffälligem radiologischen Befund eine Ausräumung der zervikalen Lymphknoten im Rahmen einer Neck Dissection angestrebt werden sollte. Dies gilt für Tumore der

Stadien T2-T4 und auch für Tumore im Stadium T1, wenn der Befund größer als drei Millimeter ist.²⁵ Je nach Größe und Lokalisation des Befundes wird dann anhand von anatomischen Grenzen entschieden, wie großflächig die Lymphknoten ausgeräumt werden.³⁰ Bei 20-30 % der Patienten mit klinisch unauffälligem zervikalen Befund (cN0) wird in der späteren mikroskopischen Untersuchung eine oder mehrere Lymphknotenmetastasen gefunden, was die Überlebensprognose drastisch um 50 % senkt.²⁹ Zusätzlich zur Operation besteht die Möglichkeit, den Patienten einer adjuvanten Radiotherapie zuzuführen.³⁰ Durch die hochdosierten Röntgenstrahlen werden die Krebszellen beschädigt oder zerstört. Die Radiotherapie kann dementsprechend als kurative Therapieform oder als palliative Unterstützung genutzt werden.²⁵ Die Chemotherapie ist eine weitere Therapieform, die zusätzlich mit der Radiotherapie genutzt werden kann, sollte sich der Tumor bereits in das extrakapsuläre Gewebe ausgedehnt haben.²⁵ Bei den HPV-positiven Befunden ist das Standardprozedere eine Chemotherapie mit dem Medikament Cisplatin und zeitgleich eine Radiotherapie.³¹ Ein weiteres Medikament ist Cetuximab. Dieser monoklonale Antikörper ist gegen den EGF-Rezeptor gerichtet³², der in Krebszellen vermehrt exprimiert wird und dadurch einen regulatorischen Einfluss auf das Überleben und die Proliferation der Zellen hat.³³ Für den Patienten hat jede dieser Therapiemöglichkeiten verschiedene Nebenwirkungen. Durch eine Operation und Entfernung wichtiger oraler Strukturen können sich im Nachhinein beim Patienten trotz des Versuchs einer Rekonstruktion der betroffenen Strukturen Schluckbeschwerden, Sprach- und Mastikationsbeschwerden auf tun. Wird der Patient zusätzlich bestrahlt, können sich durch das Zugrundegehen der gesunden Zellen im Zielgebiet, z.B. der Speicheldrüsen, eine Hypersalivation einstellen, die im weiteren Verlauf mit einem vermehrten Auftreten von Karies vergesellschaftet ist.³⁴ Durch den Einsatz von Chemotherapeutika kann es aufgrund einer Thrombozytopenie im Verlauf zu spontanen Blutungen kommen.³⁴ Eine recht neue Therapiemethode ist die Gabe des Immun-Checkpoint-Inhibitors Pembrolizumab, eines IgG4-Antikörpers gegen PD-1.² Dadurch wird dieser besetzt und kann nicht mehr mit dem PD-1-Liganden (PDL1) interagieren, der von der Tumorzelle exprimiert wird. Durch eine Bindung würde sich die Tumorzelle vor einer Immunantwort schützen.³⁵ Nebenwirkungen bei immunmodulierenden Medikamenten wie Pembrolizumab können Hautirritationen sein. In schweren Fällen kann die Überaktivierung des Immunsystems zu einem Diabetes Typ 1 führen.³⁶ Trotz der neuen Therapieansätze und immer weiterer

Forschung auf dem Gebiet der Kopf-Hals-Tumoren konnte die 5-Jahres-Überlebensrate von rund 55 % in den Jahren vor 1996² nur auf rund 64 % in den letzten Jahren gesteigert werden.³⁷

1.2 Adrenerger Stoffwechsel

1.2.1 Adrenozeptoren, deren Funktionsweise und Beeinflussung

Adrenozeptoren im menschlichen Körper gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und sind in α - und β -adrenerge unterteilt.³⁸ Liganden für die adrenergen Rezeptoren sind die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. Die postganglionären sympathischen Nervenzellen im Nebennierenrindenmark produzieren auf ein Stresssignal hin Adrenalin und Noradrenalin und geben es direkt in den Blutkreislauf. Zusätzlich wird in den sympathischen Nervenenden Noradrenalin als Neurotransmitter ausgeschüttet.³⁹ Das heterotrimere G-Protein besteht aus einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit.⁴⁰ Mit der Bindung eines Liganden am GPCR wird an der α -Untereinheit, ein GDP durch ein GTP ausgetauscht. Dies führt zu einer Trennung der α - und $\beta\gamma$ -Einheit. Die α -Untereinheit löst sich von der $\beta\gamma$ -Untereinheit wodurch weitere Signalkaskaden angestoßen werden.⁴⁰ Durch GTPasen wird das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert. Die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten vereinigen sich wieder, womit die Signalweiterleitung endet.⁴¹

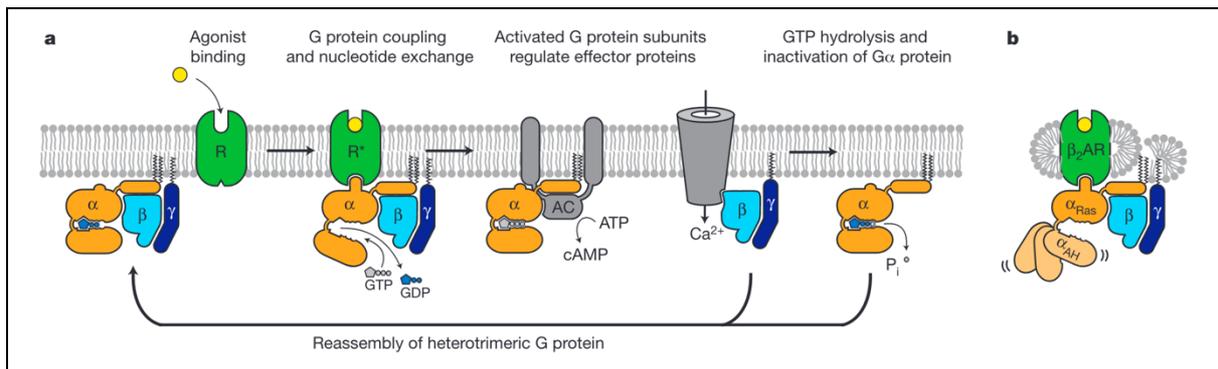


Abbildung 1: Dargestellt ist die Funktionsweise des G-Protein gekoppelten Rezeptors. Hier am Beispiel des β_2 -AR dargestellt.

Quelle: [Nature. 2011 Sep 29; 477\(7366\): 549–555.](#)⁴¹

Im Gehirn und im Herzen finden sich α -Adrenozeptoren (α -AR). Die α_1 -Adrenozeptoren im Gehirn sind an der Neurogenese beteiligt, im Herzen können sie an pathologischen Prozessen wie einer Hypertrophie oder Ischämie mitwirken.⁴² Im zentralen Nervensystem sitzen α_2 -Adrenozeptoren und dämpfen über eine negative Feedbackschleife Funktionen und sorgen dadurch für beispielsweise eine Hypotension, Bradykardie und zentrale Sedierung.⁴² Ein hochselektiver α_2 -Rezeptoragonist, der zur Sedierung genutzt wird, ist Dexmedetomidin.⁴³ Die Familie der β -Adrenozeptoren (β -AR) funktioniert wie die der α -AR durch eine Bindung der Agonisten Adrenalin und Noradrenalin.⁴⁴ Im Herzen beispielsweise führt eine Aktivierung des β_1 -Adrenozeptors (β_1 -AR) zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP und damit zu einer erhöhten Herzschlagrate und einer erhöhten Kontraktilität, während in der Niere die glatten Muskelzellen des juxtaglomerulären Apparats kontrahieren und zu einer vermehrten Reninfreisetzung führen.⁴⁵ Der β_2 -Adrenozeptor (β_2 -AR) wirkt ebenfalls über diesen Mechanismus.⁴¹ Damit diese Signalkaskaden nicht unkontrolliert ablaufen, hat die Zelle zwei entscheidende inhibierende Mechanismen. Eine Phosphorylierung des GPCR durch GPCR-Kinasen und β -Arrestin. Ein Protein, das direkt am GPCR binden kann oder durch Rekrutierung zyklischer Nucleotid-Phosphodiesterasen (PDE) zu einer Verringerung des intrazellulären cAMP führt, indem die PDE cAMP in AMP umwandeln.⁴⁶ In den Bronchien sorgt eine Stimulierung von β_2 -AR für eine Dilatation. Diesen Effekt macht man sich bei Patienten mit Asthma oder COPD zunutze, indem man Medikamente nutzt, die Am β_2 -AR als Agonisten

wirken. Isoprenalin wirkt unselektiv an β_1 - und β_2 -AR. Salbutamol wirkt selektiv am β_2 -AR.⁴⁷ Propranolol ist ein wichtiger Vertreter der β -AR-Antagonisten⁴⁸, auf den im Kapitel 1.5 noch genauer eingegangen wird.

1.2.2 Adrenerger Stoffwechsel in gesunden Keratinozyten

Keratinozyten sind in der Lage, Adrenalin und Noradrenalin zu produzieren. Sie enthalten die Enzyme Tyrosinhydroxylase (TH), das in der Katecholaminsynthese geschwindigkeitsbestimmende Enzym, und Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (PNMT), welches die Reaktion von Noradrenalin zu Adrenalin katalysiert.⁴⁹ Außerdem exprimieren Keratinozyten den β_2 -AR. In Anwesenheit eines Stimulus des β_2 -AR kommt es zu einer cAMP-vermittelten Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Diese führt zu einer verminderten Proliferation, aber zu einer erhöhten Differenzierung der Keratinozyten.⁵⁰ Bei einer Aktivierung des β_2 -AR ist bei Keratinozyten während der Wundheilung eine Verringerung der Motilität zu beobachten.⁴⁹ Die Aktivierung der Proteinphosphatase 2A (PP2A), die durch den β_2 -AR vermittelt wird, führt zu einer Dephosphorylierung der p44/42 MAPK (ERK1/2) und dadurch zu einer Hemmung der Keratinozytenmigration.⁵¹ Die Antagonisierung des β_2 -AR führte zu einer erhöhten Migration und Reepithelialisierung.⁵² Bei Keratinozyten konnte auch der α_2 -AR nachgewiesen werden. Bei niedrigen Konzentrationen von Adrenalin (0,1 nM), was noch im physiologischen Bereich liegt, konnte eine durch den α_{2b} -AR vermittelte erhöhte Phosphorylierung der ERK 1/2 beobachtet werden. Vermutlich wird somit die β_2 -AR vermittelte Migrationshemmung der Keratinozyten moduliert.⁵¹

1.3 Tumorstoffwechsel

1.3.1 Adrenerger Stoffwechsel im Tumor

In Tumorzellen der Mundhöhle werden im Vergleich zu gesundem Gewebe vermehrt β_2 -AR nachgewiesen. Dies mag daran liegen, dass die Speicheldrüsen, die in der Mundhöhle anzutreffen sind, vermehrt β_2 -AR exprimieren, da sie durch das sympathische Nervensystem gesteuert werden.⁵³ Für den Tumor ist es trotzdem von Vorteil, vermehrt β_2 -AR zu exprimieren, denn durch den adrenergen Stoffwechsel werden zelluläre Prozesse wie das Wachstum und die Vermehrung des Tumors, die Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe und die Regulierung der Blutversorgung zugunsten des Tumors verändert.⁵⁴ Die Lebensfähigkeit der Tumoren der Mundhöhle und deren Fähigkeit zur Proliferation konnten in eine Dosisabhängigkeit zum Neurotransmitter Noradrenalin gebracht werden.⁵³

1.3.2 Wachstum

Damit der Tumor wachsen kann, bedient er sich körpereigener Enzyme und Signalwege. Wichtig hierbei ist der Signalweg, der über den EGFR ausgelöst wird. EGFR ist ein extrazellulärer Rezeptor, gekoppelt an eine Tyrosinkinase im Zytoplasma. Zwei wichtige Liganden sind TGF- α und EGF. TGF- α wird unter anderem in Makrophagen und Keratinozyten gebildet. EGF-Bildung findet in verschiedenen Drüsen statt, darunter auch in der Glandula submandibularis. Durch Bindung an den EGFR lösen sie eine Proliferation von Zellen im Zusammenhang mit der Wundheilung aus. TGF- α beeinflusst zusätzlich die Tumorgenese und wird mit der Angiogenese in Verbindung gesetzt.⁵⁵ In Kopf-Hals-Tumoren konnte gezeigt werden, dass der EGFR auch einen Einfluss auf die Aktivierung des Komplementsystems hat.⁵⁶ Bei oralen Plattenepithelkarzinomen exprimieren über 80 % den Rezeptor.⁵⁵ EGFR, mutiert oder überexprimiert, trägt zu einer unkontrollierten Vermehrung des Tumors bei.

Eine Mutation des EGFR ist mit einer schlechteren Überlebensprognose und einer verschlechterten Therapierbarkeit vergesellschaftet.⁵⁷ Die Serin/Thyrosin-Kinase

GSK3 β spielt eine wichtige Rolle in Signalwegen. Vermittelt durch EGFR wird im späteren Verlauf des Signalwegs GSK3 β phosphoryliert und damit inaktiviert. Das führt dazu, dass mTOR nicht mehr durch GSK3 β phosphoryliert wird und daraus ein erhöhtes Zellwachstum folgt.⁵⁸ Um ein Wachstum des Tumors zu generieren, muss Gewebe entfernt werden, damit der Tumor dort hineinwachsen kann. Der Tumor bedient sich dabei der Matrix-Metalloproteasen (MMP). Diese Enzyme sorgen für einen Abbau von Kollagen Typ IV und spielen somit eine Rolle für das Wachstum des Tumors. Die zwei wichtigsten MMP sind MMP2 und MMP9, die mit dem Wachstum von Krebs in Verbindung gebracht werden. Bei Patienten mit OSCC konnten erhöhte Serumwerte von MMP2 und MMP9 im Vergleich mit gesunden Patienten festgestellt werden.⁵⁹ Da Kollagen Typ IV Bestandteil der Basalmembran ist, kommt den MMP auch eine wichtige Rolle in Bezug auf die Metastasierung zu. Es konnten auch in den Metastasen MMP2 und MMP9 nachgewiesen werden, was hier ebenfalls für ein invasives Wachstum spricht.⁶⁰ Um schnell und effektiv wachsen zu können, benötigt der Tumor für Sauerstoff und Nährstoffe eine erhöhte Blutversorgung. Diese wird über eine Überexpression des VEGFR gewährleistet. VEGFR1 wird in hämatopoetischen Stammzellen, Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen exprimiert. VEGFR2 wird hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert. VEGF kann von Tumorzellen exprimiert werden und führt dann durch Bindung an VEGFR zu einer erhöhten Neoangiogenese und Gefäßpermeabilität.⁶¹

1.3.3 Knochenstoffwechsel

Für den Knochenstoffwechsel im gesunden Menschen ist in erster Linie das RANKL/RANK/OPG-System zuständig. RANK ist ein homotrimeres Transmembranprotein, das den RANK-Liganden (RANKL) bindet. RANK gehört zur TNF-Rezeptor-Familie und wird von Osteoklasten-Vorläuferzellen, Osteoklasten und dendritischen Zellen exprimiert.⁶² Mit der Bindung des RANK-Liganden an den RANK werden Osteoklasten-Vorläuferzellen zur Differenzierung angeregt.

Die entstehenden Osteoklasten resorbieren mineralisiertes Knochengewebe.⁶³ Orale Plattenepithelkarzinomzellen haben die Möglichkeit, RANKL zu bilden. Eine vermehrte Differenzierung, Aktivierung und Überlebensrate⁶³ von Osteoklasten ist das Ergebnis.⁶⁴ RANKL wird von Osteoblasten und aktivierten T-Zellen sezerniert. Das Protein gehört ebenfalls zur Familie der TNF. RANKL wird außerdem von epithelialen Zellen im Gewebe der laktierenden Mamma exprimiert und führt dort zu einer Hyperplasie der Zellen.⁶² Dieser proliferative Effekt konnte auch bei oralen Plattenepithelzellen *in vitro* gezeigt werden. Die Zellen konnten RANKL und RANK gleichzeitig exprimieren.⁶⁵ Osteoprotegerin (OPG) ist ein Rezeptor der TNF-Familie.⁶³ OPG bindet RANKL und verhindert somit eine Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten und damit einen Abbau von Knochengewebe.⁶⁶ OPG wird mehrheitlich von Osteoblasten und B-Zellen sezerniert. In Osteoblasten sind für die Regulation die gleichen Faktoren zuständig, wie auch für die Expression von RANKL. Trotzdem kann es zu einem Ungleichgewicht kommen, bei dem OPG zu wenig und RANKL überexprimiert werden, was in einer Überaktivität der Osteoklasten resultiert.⁶² Der knochenschützende Effekt des OPG konnte auch im Hinblick auf den Tumorstoffwechsel im Mäusen beobachtet werden. Dort führte eine Therapie mit OPG zu einer reduzierten Osteoklastenaktivierung durch die Tumorzellen und zu einem verminderten invasiven Wachstum des Tumors im Vergleich zur Kontrollgruppe.⁶⁷ Mit einer Unterdrückung der Expression von OPG aus primären Osteoblasten können die OSCC-Zellen diesen protektiven Effekt im Sinne des Tumors möglichst gering halten.⁶³

1.3.4 Metastasierung

Damit ein Tumor Metastasen bilden kann bedarf es eines sehr komplexen Vorgangs, bestehend aus einer Lösung der Zell-Zell-Kontakte vom Primärtumor, einer Zellbeweglichkeit und dem Infiltrieren in andere Strukturen wie Blut- und Lymphgefäße, um sich über diese Bahnen in entfernte Gewebe zu verbreiten.⁶⁸ Der Tumor bedient sich dabei der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), einem Vorgang in der embryonalen Entwicklung, bei dem Epithelzellen ihre Zell-Zell-Kontakte auflösen und ihre Motilität erhöhen.⁶⁹

Eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Zell-Zell-Kontakte spielen Cadherine wie das epitheliale Cadherin (E-Cadherin), ein kalziumabhängiges Transmembranprotein, zuständig für den Erhalt der normalen Epithelpolarität und damit für den Erhalt der Verankerung des Zytoskellets benachbarter Epithelzellen.⁷⁰ E-Cadherin ist seltener in der basalen Schicht der gesunden oralen Mukosa zu finden, dafür aber vermehrt in der parabasalen Schicht und dem Stratum Spinosum.⁶⁹ Im Gewebe der Primärtumoren eines OSCC kann man eine deutliche Verringerung von E-Cadherin beobachten, aber eine vermehrte Expression in Metastasen.⁷⁰ E-Cadherin kann somit als ein wichtiger Faktor für invasives Wachstum und Metastasierung gelten. Des Weiteren ist eine reduzierte E-Cadherin Expression mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet.⁷¹ Das plazentale Cadherin (P-Cadherin) gehört wie E-Cadherin zur Familie der Cadherine. Es wird im gesunden Gewebe in den basalen Epithelschichten exprimiert und ist dort vermutlich auch für die Regulation der Zell-Zell-Kontakte mitverantwortlich.⁷² In Epithel mit geringen Zellumsatzraten wurde kein P-Cadherin exprimiert.⁷³ Zusätzlich wird eine Beteiligung von P-Cadherin bei der Differenzierung und dem Wachstum von Zellen diskutiert.⁷² P-Cadherin wird im initialen Wachstumsstadium des Tumors überexprimiert und könnte so zu einem progressiven Wachstum und Metastasierung führen. Im Stratum spinosum kann eine Anomalie in der P-Cadherin-Expression ein Marker für atypische prä-maligne Keratinozyten sein.⁷⁴ Twist ist während der Metastasierung des Tumors ein weiterer Faktor von hoher Relevanz. Twist ist ein Transkriptionsfaktor, der in Tumorzellen überexprimiert wird. Er sorgt durch seine Aktivierung für ein Runterregulieren der Expression von E-Cadherin und damit zu einem Verlust der Zell-Zell-Kontakte.⁶⁹ Vermehrte Expression von Twist konnte mit Lymphknotenmetastasen und einem schlechteren Differenzierungsgrad in Verbindung gebracht werden, was gleichzeitig zu einer schlechteren Prognose führt.^{75,76} Bei oralen Leukoplakien wurde Twist in parabasalen und basalen Schichten nachgewiesen.⁷⁷ Bei schweren Dysplasien konnte Twist auch in den höheren Schichten des Epithels nachgewiesen werden.⁶⁹ Ein entscheidender Transmembranrezeptor, um mit dem extrazellulären Gewebe zu kommunizieren, ist der Cluster of Differentiation 44 (CD44). Über seinen Liganden Hyaluron kann CD44 eine Reihe von Signalkaskaden anstoßen. Durch Interaktion mit dem Zytoskelett entsteht beispielsweise ein CD44-EGFR-Komplex.⁷⁸

Eine hyaluronvermittelte Phosphorylierung des EGFR führt zu einer Aktivierung der EGFR-Tyrosinkinase, woraufhin Signalwege angestoßen werden, die zu einem verbesserten Überleben der Tumorzellen führt. Hyaluron/CD44 vermittelte Aktivierung des EGFR und dadurch Phosphorylierung der MAP-Kinase, resultiert in einem erhöhten Tumorwachstum.^{78, 79} CD44 wird vermehrt in Krebsstammzellen (CSC) exprimiert. Dies sorgt für eine erhöhte Resistenz gegen Radio- und Chemotherapien. Im Zusammenspiel mit dem epithelspezifischen Antigen (ESA) konnte beobachtet werden, dass die Zellen des soliden Tumors, ortsständig und proliferativen Charakters, CD44 und ESA vermehrt exprimieren. Bei beweglichen Zellen wird vermehrt CD44 exprimiert, ESA dagegen weniger.⁷⁹ Ein weiterer wichtiger Faktor für die Regulierung der Metastasierung ist die Serin/Thyrosin-Kinase GSK3 β . Eine Aktivierung der MAP-Kinase durch die Hemmung von GSK3 β wird diskutiert, außerdem phosphoryliert GSK3 β p65, welches in metastasierten OSCC gefunden wurde. Das spricht dafür, dass eine negative Regulierung von GSK3 β mit dem Wachstum und der Metastasierung von oralen Plattenepithelkarzinomen in Verbindung steht.⁸⁰ Auf der anderen Seite steht GSK3 β in Verdacht, auf Ebene der DNA durch Phosphorylierung der Faktoren, die für eine Reparatur zuständig sind, diese zu fördern. Es wird vermutet, dass dadurch die Radio- und Chemoresistenz erhöht wird.⁸¹ Invasion, durch das Zinkfingerprotein SNAIL vermittelt, kann über eine Phosphorylierung durch GSK3 β verhindert werden.⁵⁸ Durch Aktivierung könnte sogar der Vorgang der EMT umkehren.⁸⁰

1.4 Therapieansätze

Obwohl in den letzten Jahren viel geforscht wurde und neue Therapieansätze diskutiert wurden und werden, zeigt das OSCC keine signifikant verbesserte Überlebensrate.¹ Verantwortlich für eine schlechte Prognose sind die lokale Aggressivität und Metastasierung der Tumorzellen.⁷⁴ Eine Operation und damit eine Entfernung des Primärtumors und, falls vorhanden, der Metastasen durch Ausräumen der Halslymphknoten sind das primäre Ziel beim kurativen Therapieansatz. Adjuvant

kann nach der resektiven Therapie je nach TNM-Klassifikation des Primärtumors eine Radiatio eingeleitet werden, bei der das betroffene Gebiet im Kopf-Hals-Bereich mit hochdosierten Röntgenstrahlen behandelt wird. Die Radiatio kann kurativ und palliativ eingesetzt werden. Ist die Metastase durch die Kapsel des Lymphknoten durchgebrochen, wird zusätzlich zur Radiatio eine Chemotherapie eingeleitet.²⁵ Ein gängiges Chemotherapeutikum, das in der Therapie des OSCC eingesetzt wird, ist Cisplatin. Dieses führt in der Zelle über verschiedene intrazelluläre Vorgänge zu einer Apoptose.⁸² Eine neuere Gruppe von Medikamenten stellt Antikörper dar, die gezielt Moleküle angehen und dadurch zelluläre Prozesse unterdrücken. Der monoklonale Antikörper Cetuximab inhibiert den, über EGFR gesteuerten Signalweg.⁵⁵ Weitere, in vorherigen Kapiteln genannte Rezeptoren wie der VEGFR können mit Hilfe von Antikörpern wie Nintedanib und Dovitinib inhibiert werden und dadurch zu einem geringeren Wachstum der Tumorzellen führen.⁸³ Zellen, die CD44 vermehrt exprimieren, zeigen eine erhöhte Resistenz in Bezug auf herkömmliche Chemotherapeutika wie Cisplatin oder 5-Flourouracil.⁷⁹ Da die Inaktivierung von GSK3 β in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung epithelialer Tumoren steht, ist hier auch ein Therapieansatz zu sehen.⁸⁴ Ein weiterer Therapieansatz ist das Eingreifen in den adrenergen Stoffwechsel der Tumorzellen. In Brustkrebszellen führte eine Agonisierung des β -AR durch Isoprenalin zu einer Inhibierung des Tumorstwachstums.⁸⁵ Doch auch die Blockade durch einen Antagonisten könnte in Brustkrebszellen zu einem Benefit in Bezug auf Metastasenbildung und Invasion führen.⁸⁶ Bei Kopf-Hals-Tumoren konnte ein Effekt von β -AR-Blockern auf die Noradrenalin vermittelte, erhöhte Aktivität der MMP-2 und MMP-9 gezeigt werden.⁸⁷

1.5 Der β -Blocker Propranolol

Propranolol, (1-isopropylamino-3-(naphthyloxy)propan-2-ol hydrochloride)⁸⁸, ist ein nicht-selektiver β -AR-Blocker. Das Medikament wird beispielsweise zur Therapie von Bluthochdruck am Herzen angewendet. Nebenwirkungen können Übelsein, Durchfall oder auch die Erhöhung des Atemwiderstands sein, worauf bei Asthmatikern zu achten ist.⁸⁸ Weitere Indikationsbereiche sind die Anxiolyse oder die Migräneprophylaxe.⁸⁹ Es konnte festgestellt werden, dass Propranolol in manchen Regionen als Agonist an den β -AR fungiert. An Tumorzellen des Mamma-CA konnte eine verminderte Zellproliferation bei Konzentrationen von 10 – 50 μ M beobachtet werden. Es ist sogar eine Arretierung des Zellzyklus bei Brustkrebszellen und damit eine Apoptose durch Inhibierung des ERK1/2 beschrieben worden, dies allerdings bei deutlich höheren Konzentrationen von 100 – 200 μ M. Es wird vermutet, dass höhere Konzentrationen Propranolol ihre Wirkung nicht nur rein β -AR vermitteln, sondern über das membranstabilisierendes Verhalten.⁹⁰ In Kopf-Hals-Tumorzellen konnte Propranolol als Antagonist an den β -AR zu einer Blockade der Noradrenalin-vermittelten Zellzyklus stimulierenden Effekte führen. Außerdem führte Propranolol zu einer verringerten Lebensfähigkeit und Proliferation der Zellen, so wie die β -AR vermittelte IL-6 Ausschüttung in OSCC-Zellen.⁵³ In Hinblick auf die Noradrenalin induzierte vermehrte Expression von MMP-2 und MMP-9 konnte Propranolol hier auch inhibierend wirken. Hingegen konnte kein direkter Propranolol-vermittelter Effekt auf die Invasivität der Zellen gezeigt werden.⁸⁷ Es wird im Hinblick auf Mamma-CA vermutet, dass β -Blocker wie Propranolol einen positiven Effekt auf prometastatische β -AR-vermittelte Effekte hat.⁸⁶ Propranolol wird durch seine vielschichtigen Effekte auf Signalkaskaden und β -AR als potentielles Medikament in der Therapie des OSCC gesehen.⁹¹

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Studien haben gezeigt, dass verschiedene Konzentrationen von Propranolol an Zellen unterschiedlich wirken. Manche Studien zeigen einen Effekt auf die β -AR als Antagonisten.^{53,87,86} Es wurden aber auch agonistische Effekte von Propranolol beobachtet.⁹⁰ In Krebszellreihen konnten weiterhin Zusammenhänge zwischen β -AR und den dadurch stimulierten Vorgängen wie Überregulierungen von Signalkaskaden und Überexpression von Proteinen gefunden werden, die das Wachstum, die Metastasierung, die Invasivität, wie eine verbesserte Lebensfähigkeit des Tumors und damit eine schlechtere Prognose für den Patienten verursachen.^{92,90} Andere Faktoren, die über- oder unterexprimiert zu einer schlechten Prognose führen, stehen noch nicht in Zusammenhang mit β -AR oder dem Medikament Propranolol. Hier setzt die Arbeit an. Es wurde in Experimenten mit verschiedenen Krebszelllinien des Kopf-Hals-Bereichs versucht, einen Einfluss verschiedener Konzentrationen des Medikaments Propranolol auf die Expression von Faktoren, die an der Entstehung, dem Wachstum und der Metastasierung des Tumors beteiligt sind, zu zeigen. Die konzentrationsabhängige Expression der unterschiedlichen Proteine durch die Tumorzellen wurde über Western Blots und qPCR nachgewiesen.

2 Material

2.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien entstammen dem Head and Neck Cancer Panel der American Type Culture Collection (ATCC TCP-1012, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA). Sie entstammen verschiedenen Geweben der Kopf-Hals-Region. Die Zelllinien enthalten mindestens eines der mutierten Gene CDKNA2, TP53, PIK3CA oder KDM5C, entsprechend der Sanger-COSMIC-Datenbank. ATCC richtet seine Biosicherheitskriterien nach der Biosafety in microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL), U.S. Department of Health and Human Services.

Tabelle 1: Zelllinien

Zelllinie	Lokalisation	Geschlecht	Alter	Stadium
A-253	Unterkiefer	Männlich	54	Primärtumor
Detroit 562	Pharynx	Weiblich	Keine Angabe	Metastase
FaDu	Pharynx	Männlich	56	Primärtumor
SCC-15	Zunge	Männlich	55	Primärtumor
SCC-9	Zunge	Männlich	25	Primärtumor

2.2 Kulturmedium

Tabelle 2: Kulturmedium

Reagenz/Lösung	Hersteller
DMEM 1,0 g/L Glucose	PAN-Biotech, Aidenbach, D
Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Alle Reagenzien wurden zusammengemischt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.3 Kits

Tabelle 3: Kits

Kit	Hersteller
RNeasy-Minikit	Qiagen, Hilden, D
Transkriptor First Strand cDNA Synthesekit	Roche Diagnostics, Basel, CH

2.4 Reagenzien und Lösungen

Tabelle 4: Reagenzien und Lösungen

Reagenz oder Lösung	Hersteller
2-Propanol	Merck, Darmstadt, D
2x Brilliant III QPCR MasterMix	Stratagene Agilent Technol.s, Santa Clara, CA, USA
40 % Acrylamide/Bis Solution	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Accutase-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aceton	Merck, Darmstadt, D

Albumin Standard	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ATX Ponceau S red staining solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BCA Solution	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V	Biomol, Hamburg, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calcein	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calcein AM	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cryo-SFM	PromoCell GmbH, Heidelberg, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM 1,0 g/L Glucose	PAN-Biotech, Aidenbach, D
DPBS 10x (CaCl, MgCl)	Gibco, Carlsbad, CA, USA
DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Glycerol 87 %	Applichem GmbH, Darmstadt, D
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
H ₂ O DNase und RNasefrei, sterilfiltriert	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magermilch	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol, MeOH	Carl Roth, Karlsruhe, D
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid, NaCl	VWR Chemicals, Randor, PA, USA

Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Precision Plus Dual Color Protein Standards Größenmarker	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Propidium iodide	Merck, Darmstadt, D
ReBlot Plus Mild Ab Stripping Solution	Merck, Darmstadt, D
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, D
Roti Lumin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan™ Schneller Advanced Master-Mix	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt, D
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, D

2.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
24-Well-Platte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
6-Well Platte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
96-Well Quali-PCR-Platte	Kisker Biotech, Steinfurt, D
96-Well-Platte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Absaugpipette, 2 ml	Corning, NY, USA
BZO Seal Film	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, D
Cedex Smart Slides	Roche Diagnostics, Basel, CH
Corning CentriStar ZentrifugenRöhrchen 15 ml, 50 ml	Corning, NY, USA
Cryoröhrchen, Rundboden, 2 ml	VWR International GmbH, Ismaning, D
Eppendorf PCR-Tube 0,2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorf Pipettenspitzen ohne Filter, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Eppendorf Tube 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorf Tube 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Filter-Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Kisker Biotech GmbH & Co.KG, Steinfurt, D
Gel loading pipette 200 µl	Nerbe plus GmbH & Co. KG Winsen/Luhe, D
Kulturflaschen T25, T75	Corning Inc., Corning, USA
Microflex NeoTouch Neoprene	Ansell, Richmond, AUS
Microlance 3 20G Kanüle	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Milan Prospekthüllen glasklar 803	InterES GmbH, Nürnberg, D

Omnifix ® 100 Solo 1,0 ml Spritze	B. Braun, Melsungen, D
Parafilm M	Bemis Company Inc., Neenah, WI, USA
Peha-soft Nitrile	Paul Hartmann AG, Heidenheim, D
Petrischale, 10 cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
PVDF Western Blotting Membrane	Roche Diagnostics, Basel, CH
Schwamm	EDEKA Zentrale Stiftung & Co. KG, Hamburg, D
Seife Manisoft	Ecolab GmbH, Wien, AT
Serologische Pipette, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG &Co, Nümbrecht, D
T75-Zellkulturflasche	Corning, NY, USA
Whatman 46x57cm	GE Healthcare GmbH, Solingen, D

2.6 Geräte

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Hersteller
AriaMx Real-Time PCR System	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Brutschrank HERAcCell 240	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Cedex XS Analyzers	Roche Diagnostics, Basel, CH
ChemiDoc XRS+ Imaging System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Eppendorf Research plus, Einkanalpipette, variable 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE2000-U	Nikon, Tokyo, J

HLC Heizblock BT 130-2	DITABIS AG, Pforzheim, D
IKA Magnetrührer RCT Basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, D
Magnetständer	Merck, Darmstadt, D
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Stand & Clamps	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini-PROTEAN® Gel releaser	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini-PROTEAN® Glass plates für 1,5 mm Gele	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini-PROTEAN® Kamm für 15 Taschen, 1,5 mm Gele	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini-PROTEAN®Tetra Handcast Systems	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Minispinzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, D
Netzgerät PowerPac™ Basic	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Nikon E995 Digitalkamera	Nikon, Tokyo, J
Nikon Eclipse TS100 Lichtmikroskop	Nikon, Tokyo, J
Pipetgirl	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, D
Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Präzisionswaage Talent TE2101	Sartorius AG, Göttingen, D
ProBlot Rocker 25XLD	Labnet International, NJ, USA
Sicherheitswerkbank Heraeus HERAsafe	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen, D

Vortex Genie2	Scientific Industries, New York, NY, USA
Wippschüttler Mini-Rocker Typ MR-1	BioSan, Riga, LVA
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S-R	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
Zentrifuge Rotanta 320	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D

2.7 Puffer und Lösungen

2.7.1 Zellkultur

Tabelle 7: Trypsin-EDTA, 1x, 50 ml

Komponente	Menge
PBS	45 ml
Trypsin-EDTA 10x	5 ml

2.7.2 Lebend Todfärbung

Tabelle 8: Lebend- und Todfärbung

Komponente	Menge
Calcein AM	3 μ M
Propium-iodide	2 μ M

2.7.3 Western Blot

2.7.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Tabelle 9: Lämmli-Puffer, 5x

Komponente	Menge
1,5 M Tris pH 6,8	4 ml
Bromphenolblau 1 %	1 ml
Glycerol	10 ml
SDS	2 g
β -Mercaptoethanol	5 ml

Tabelle 10: Acrylamid-Trenngel 10 %, 1,5 mm dick

Komponente	Menge
1 M Tris pH 8,8	2,92 ml
10 % APS	75 μ l
20 % SDS	37,5 μ l
Acrylamid, 40 %	1,88 ml
Entionisiertes H ₂ O	2,6 ml
TEMED	7,5 μ l

Tabelle 11: Acrylamid-Sammegel 4 %, 1,5 mm dick

Komponente	Menge
1 M Tris pH 6,8	0,5 ml
10 % APS	40 µl
20 % SDS	20 µl
Acrylamid, 40 %	0,4 ml
Entionisiertes H ₂ O	3,03 ml
TEMED	3,5 µl

Tabelle 12: SDS-PAGE Elektrodenpuffer, 10x

Komponente	Menge
Glycin	1,92 M
SDS	1 %
Tris pH 8,5	250 mM

Tabelle 13: SDS-PAGE Elektrodenpuffer, 1x

Komponente	Menge
Bidestilliertes H ₂ O	9 Teile
SDS-PAGE-Elektrodenpuffer	1 Teil

Tabelle 14: Blotpuffer, 10x

Komponente	Menge
Glycin	1,92 M
Tris pH 8,5	250 mM

Tabelle 15: Blotpuffer, 1x

Komponente	Menge
Bidestilliertes H ₂ O	8 Teil
Blotpuffer, 10x	1 Teil
MeOH	1 Teil

Tabelle 16: TBS, 10x pH 7,5

Komponente	Menge
Bidestilliertes H ₂ O	ad 1 L
Konzentrierte HCl	Bis pH 7,5
NaCl	1,5 M
Tris	200 mM

Tabelle 17: TBST, 1x

Komponente	Menge
Bidestilliertes H ₂ O	1000 Teile
TBS, 10x	100 Teile
TWEEN® 20	1 Teil

Tabelle 18: 3 % BSA

Komponente	Menge
BSA	3 Teile
TBST, 1x	97 Teile

Tabelle 19: 5 % Milch

Komponente	Menge
Milchpulver	5 Teile
TBST, 1x	95 Teile

Tabelle 20: Antikörperlösung 5 % Milch

Komponente	Menge
Milchpulver	5 Teile
Antikörper	Siehe Tabelle 26 für Verdünnung
TBST, 1x	95 Teile

Tabelle 21: Antikörperlösung 3 % BSA

Komponente	Menge
BSA	3 Teile
Antikörper	Siehe Tabelle 26 für Verdünnung
TBST, 1x	97 Teile

2.7.3.2 Primärantikörper

Tabelle 22: Primärantikörper

Antikörper	Bestellnr.	Hersteller
Beta Actin	ab8227	Abcam, Cambridge, UK
CD44 Mouse (156-3C11)	#3570	Cell Signaling Technol., Danvers, MA, USA
E-Cadherin	610182	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
GSK-3beta (27C10)	#9315	Cell Signaling Technol., Danvers, MA, USA
P-Cadherin (H-105)	Sc-7893	Santa Cruz Biotechnol. Inc., Dallas, TX, USA
Twist	Sc-81417	Santa Cruz Biotechnol. Inc., Dallas, TX, USA.

2.7.3.3 Sekundärantikörper

Tabelle 23: Sekundärantikörper

Antikörper	Bestellnr.	Hersteller
Goat anti-Mouse IgG	32430	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Goat anti-Rabbit IgG	32460	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

2.7.4 qPCR

Tabelle 24: Primer & Sonden

Primer/Sonde	Hersteller
Eurofins Primer #147 reverse, forward	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, D
Eurofins Primer #149 reverse, forward	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, D
Eurofins Primer #150 reverse, forward	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, D
Eurofins Primer #71 reverse, forward	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, D
Eurofins Primer #75 reverse, forward	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, D
TaqMan Assay 20x (Primer+Sonde) 18S	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan Assay 20x (Primer+Sonde) EGFR	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan Assay 20x (Primer+Sonde) OPG	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan Assay 20x (Primer+Sonde) RANKL	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
TaqMan UPL-Sonde Nr. 40	Roche Diagnostics, Basel, CH
TaqMan UPL-Sonde Nr. 48	Roche Diagnostics, Basel, CH
TaqMan UPL-Sonde Nr. 61	Roche Diagnostics, Basel, CH
TaqMan UPL-Sonde Nr. 7	Roche Diagnostics, Basel, CH

2.8 Software

Tabelle 25: Software

Software	Hersteller
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Software Cedex XS	Roche Diagnostics, Basel, CH
AriaMx	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Image Lab Software 5.2.1	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
NIS-Elements AR 3.2	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, NL
GraphPad Prism 6/8 Software	GraphPad Inc., San Diego, CA, USA

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 2D-Zellkultur

Die in den Versuchen verwendeten Zelllinien wurden zur Vermehrung in T75-Zellkulturflaschen (Corning Inc., Corning, USA) gegeben. Dort konnten sie im Beisein des Zellkulturmediums adhärent wachsen. Für das Zellkulturmedium (Tabelle 2) wurde DMEM mit 1 g/L Glucose (PAN-Biotech) mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) (Life Technologies), 1 % L-Glutamin (Sigma-Aldrich) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich) angereichert. Damit die Zellen sich im weiteren Verlauf der Kultur entsprechend vermehren konnten, wurden sie im Brutschrank (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Um eine optimale Nährstoffversorgung zu gewährleisten, wurde drei Mal pro Woche das Kulturmedium ausgetauscht. Dabei wurde das alte Medium bis auf die adhärennten Zellen abgesaugt und im Nachgang neues Kulturmedium in die Flasche (Corning Inc., New York, USA) gegeben. Außerdem wurden die Zellen drei Mal pro Woche im Mikroskop (Nikon Eclipse TS100 Lichtmikroskop, Nikon, Tokyo, Japan) auf ihre Konfluenz untersucht. Bei einer Konfluenz von 70 – 80 % wurden die Zellen aus den Kulturflaschen (Corning Inc.) gelöst und in neue Kulturflaschen (Corning Inc.) mit neuem Kulturmedium gegeben, um ein Überwachsen und Absterben der Zellen zu verhindern. Bei der erreichten Konfluenz wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Kulturflasche (Corning Inc.) mit einem Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline, PBS) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gewaschen, um abgestorbene Zellen, die nicht mehr festgewachsen sind, abzutrennen. Der Puffer wurde dann abgesaugt und der Flaschenboden (Corning Inc.) mit 1 ml 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) bedeckt, für 10 Minuten (min) im Inkubator (Thermo Scientific) aufbewahrt, um die Zellen vom Boden abzulösen. Um die

Trypsinierungsreaktion zu stoppen, wurde neues Medium in die Flaschen (Corning Inc.) gegeben. Nun konnte die Menge an Zellen, die weiter inkubiert wurden, mittels Pipette (Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland) in eine neue, mit neuem, auf 37 °C erwärmtem Medium angereicherte T75-Kulturflasche (Corning Inc.) gegeben werden und zur Adhäsion und Vermehrung in den Brutschrank (Thermo Scientific) gegeben werden.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Das Kulturmedium wird aus den Flaschen (Corning Inc.) abgesaugt und mit Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline, PBS) gewaschen. Zum Lösen der Zellen wird 1 x Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Die gelösten Zellen werden wieder mit Kulturmedium resuspendiert, um die Reaktion des Trypsins zu stoppen. Danach werden aus der Zellsuspension 25 µl entnommen und auf eine Zellzählkammer des Smart Slides (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) gegeben. Dies wird in das Zellzählgerät Cedex XS (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) überführt. Die Auswertung geschieht am Gerät Cedex XS (Roche Diagnostics) mit der Einstellung 1:1 VD und Standardsize im Programm Cedex XS Software Version 1.0.4 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Dort wird die Zellzahl pro Milliliter (ml) ausgewertet. Dabei wird vom Programm zwischen lebendigen und abgestorbenen Zellen unterschieden, um später im weiteren Verlauf des Versuchs genauere Ergebnisse zu erhalten. Nach der Zellzählung wird im Dreisatz errechnet, wie viel ml der Suspension eingesetzt werden müssen, um die gewünschte Zellanzahl für den Versuch zu erhalten.

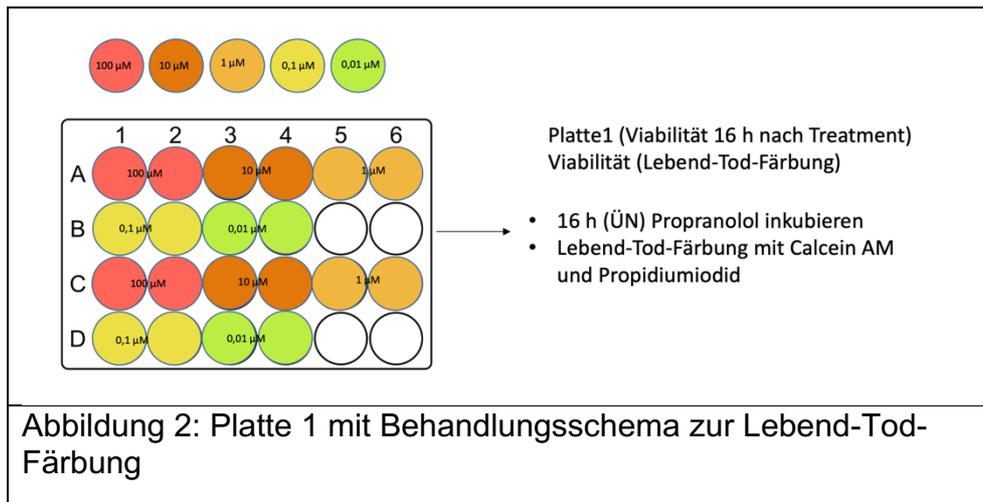
3.2 Lebend-Tod-Färbung

Bei der Lebend-Tod-Färbung wurde in Versuchen getestet, was die Inkubation der Zellreihen mit dem β -AR-Blocker Propranolol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in verschiedenen Konzentrationen für Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen hat.

In drei Versuchsreihen wurden auf je einer 24-Well-Platte (Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT) 20000 Zellen pro Well in 1 ml Nährmedium ausgesät. Diese wurden dann für 24 h bei 37 °C im Brutschrank (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) inkubiert.

3.2.1 Inkubation mit Propranolol

Die Proben wurden mit Konzentrationen von 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM und 100 µM inkubiert. Als Kontrolle wurde nur EtOH ohne den Zusatz von Propranolol gewählt. Je zwei Wells wurden mit einer Konzentration mit einem Volumen von 1 ml befüllt. Zur Herstellung der Lösung wurden zuerst 1,5 g Propranolol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 5 ml EtOH (99 %) (Merck, Darmstadt, D) gelöst, um eine Propranololkonzentration von 1000 mM zu erreichen. Diese wurde dann nach und nach verdünnt, um auf die gewünschten Konzentrationen zu kommen. Nachdem die Zellen im Nährmedium 24 h wachsen konnten, wurden alle drei Platten mit den vorher festgelegten Konzentrationen für 16 h inkubiert. Danach wurde bei der ersten Platte eine Lebend-Tod-Färbung durchgeführt. Im Folgenden werden die Zellbehandlungen schematisch dargestellt.



Für die erste Platte wurden die Zellen für 16 h in den verschiedenen Konzentrationen Propranolol inkubiert und anschließend einer Lebend-Tod-Färbung zugeführt. Abbildung 2 zeigt das Behandlungsschema.

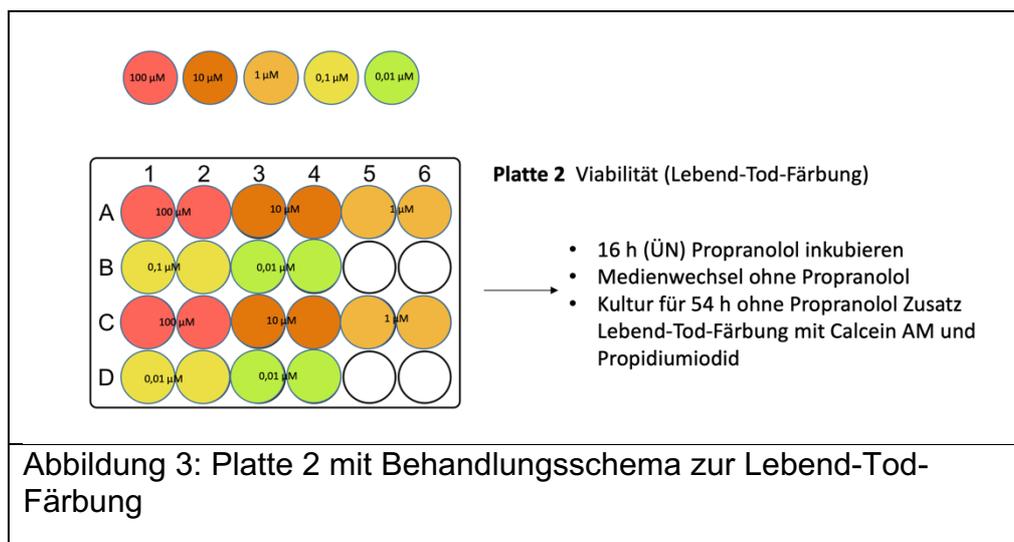
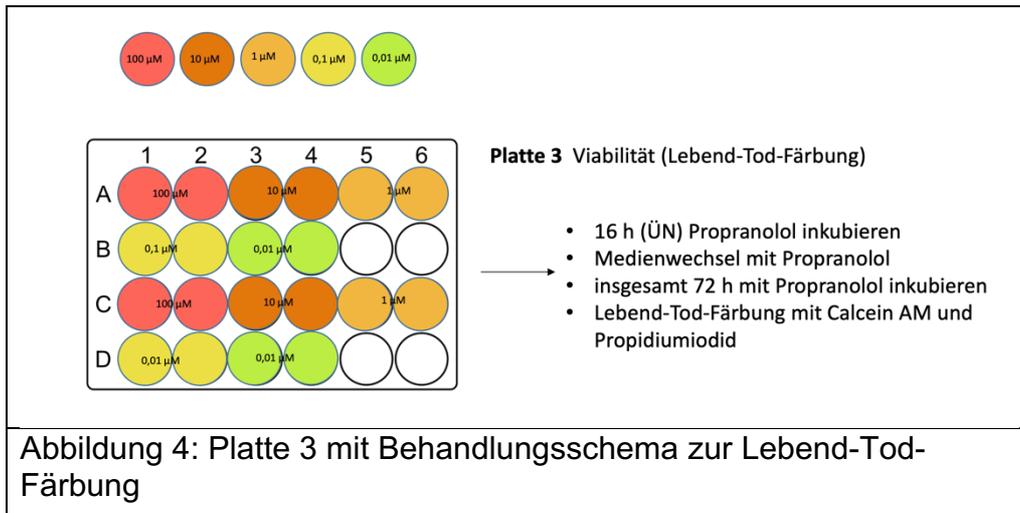


Abbildung 3 zeigt Platte zwei. Hier wurde ein Medienwechsel ohne Propranolol durchgeführt und die Platte weitere 54 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde eine Leben-Tod-Färbung durchgeführt.



Die dritte Platte, in Abbildung 4 dargestellt, erhielt einen Medienwechsel mit der jeweils für die Wells festgelegten Konzentration an Propranolol und wurde weitere 54 h im Brutschrank inkubiert, bevor sie einer Lebend-Tod-Färbung zugeführt wurde.

3.2.2 Zählung der lebenden und abgestorbene Zellen

Als Stoffe für die Zählung der Zellen wurde Calcein-acetoxymethylester (Calcein-AM) für lebende und Propidiumiodid für abgestorbene Zellen genutzt. Calcein-AM wird von lebenden Zellen aufgenommen und durch Esterasen gespalten. In Folge chemischer Prozesse entsteht ein grünes, fluoreszierendes Signal.⁹³ Da Propidiumiodid keine intakten Plasmamembranen passieren kann, kann es lebende Zellen und frühe apoptotische nicht anfärben. Sind die Membranen der Zellen aber so weit zerstört, dass Propidiumiodid sie passiert, bindet es an die DNA der Zelle und erzeugt ein rot fluoreszierendes Signal.⁹⁴ Nach der vorher festgelegten Inkubationszeit wurde das Medium in den Wells abgesaugt. Auf ein Waschen wurde verzichtet, um abgestorbene Zellen nicht vom Nährboden zu waschen und dadurch das Ergebnis zu verfälschen. Die Platten wurden für die Auswertung im Mikroskop fotografiert. Von jedem Well wurden 4 Bilder in 10-Facher Vergrößerung angefertigt. Im Ergebnisteil ist in der Fotodokumentation jeweils ein Bild mit einem Messbalken eingefügt. Die Länge des

Balkens beträgt immer 0,05 mm und kann auf jedes Bild angewendet werden. Für die Proben der Zellreihe SCC 15 gibt es für die Behandlungen mit Propranolol für 16 h und anschließender Auswertung sowie für die Proben, die 16 h behandelt wurden, mit anschließendem Wachstum ohne Einfluss von Propranolol mit einer Kultur von insgesamt 54 h keine Kontrollbilder. Anschließend wurden die Fotos für die Auszählung der Zellanzahl genutzt. Die Auszählung erfolgte manuell am Bildschirm und wurde in ein Microsoft-Excel-Dokument übertragen. Die Anzahl der Zellen in den unterschiedlichen Konzentrationen wurde verglichen und anhand dessen Diagramme in Microsoft Excel erstellt, die den Verlauf der Anzahl an lebenden und toten Zellen in den ansteigenden Konzentrationen darstellen.

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Um die Proteine voneinander zu trennen, wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Bei diesem Vorgehen wird den Proteinen ein negativ geladenes Molekül angehängt. Die Proteine verlieren dadurch ihre Eigenladung und wandern theoretisch mit einer negativen Ladung vom Minus- zum Pluspol. Dabei müssen sie das Gel durchlaufen. Schwere Moleküle können das Gel dabei langsamer als leichte Moleküle durchlaufen. Nach einer bestimmten Zeit wird die Spannung vom Gel genommen und das Durchlaufen des Gels gestoppt.⁹⁵ Nun sind schwere Proteine näher am Minus- und leichte Proteine näher am Pluspol angeordnet. Der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) enthält bekannte Molekulargewichte und lief parallel zu allen Proben im Gel. So konnte eine Bestimmung der Gewichte der in den Proben enthaltenen Proteine getroffen werden und daraufhin die Proteine bestimmt werden.

3.3.1.1 Probenvorbereitung

Die Proben wurden in den Konzentrationen 0,1 μM , 0,5 μM und 1 μM mit Propranolol für 16 h inkubiert. Von jeder Probe wurden 30 μg Protein entnommen. Dieser Teil wurde mit 5 μl 5 x Lämmli, inklusive β -Mercaptoethanol und Wasser (Tabelle 9) auf 25 μl aufgefüllt. Im Falle der Wiederholung des Versuchs mit dem Antikörper CD44 wurden 40 μg Protein eingesetzt. Die Probe wurde wie alle anderen auf 25 μl mit 5 x Lämmli, inklusive β -Mercaptoethanol und Wasser aufgefüllt. Danach wurden die Proben in den Heizblock (DITABIS AG – Digital Biomedical Imaging Systems AG) gegeben. Dort wurden die Proteine für 10 min bei 70 °C aufbewahrt, um sie zu denaturieren. Die Proteine verlieren dadurch ihre Sekundär- und Tertiärstruktur und liegen entfaltet vor.

3.3.1.2 Gießen der Gele

Zur Formgebung der Gele kamen zwei saubere, mit destilliertem Wasser gereinigte Glasplatten (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) zur Anwendung. Die Glasplatte wurde in die Gelkammer (Mini-PROTEAN®Tetra Handcast Systems, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) eingespannt. Zur Herstellung wurde auf Eis gearbeitet, damit das Ammoniumpersulfat (APS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) nicht wärmer als 4 °C werden konnte, wodurch es inaktiv geworden wäre. Es wurden zwei 50 ml Tubes (Corning CentriStar Zentrifugenröhrchen, Corning, NY, USA) nach Trenn- und Sammelgel beschriftet und darin alle Reagenzien (Tabelle 10, Tabelle 11) außer TEMED (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gemischt, nicht im Vortex, um eine Schaumbildung durch SDS (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D) zu vermeiden. Vor dem Einfüllen in die Kammer wurde zuerst TEMED (Sigma-Aldrich, USA) in das Trenngel gegeben und die Kammer (Mini-PROTEAN®Tetra Handcast Systems, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) bis zur eingezeichneten Markierung aufgefüllt. Das Sammelgel wurde weiter auf Eis gelagert. Das eingefüllte Trenngel wurde daraufhin mit 70 % 2-Propanol (Merck, Darmstadt, D) überschichtet und 20 min ausgehärtet. Nach der Aushärtung wurde das 2-Propanol (Merck, Darmstadt, D) rückstandslos

abgegossen. Nun konnte TEMED (Sigma-Aldrich, USA) in das Sammelgel gegeben werden und das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert werden. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm für 15 Taschen (Mini-PROTEAN®, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) eingesetzt und das Gel ausgehärtet.

3.3.1.3 Gelelektrophorese

Das Gel für die SDS-PAGE besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die Herstellung der verschiedenen Gele ist im Kapitel 3.3.1.2 genau beschrieben. Das Sammelgel trägt dazu bei, dass sich die Proteine auf einer Ebene konzentrieren können. Das Trenngel sorgt für das Auftrennen der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Es wurden 1,5 Millimeter (mm) dicke Gele verwendet, mit jeweils 15 Taschen. Die gegossenen Gele wurden in eine Kammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) eingespannt. Die Kammer wurde bis zum oberen Rand mit 1 x Elektrodenpuffer (Tabelle 13) aufgefüllt und die Käme (Bio-Rad Laboratories GmbH) sorgfältig unter Vorsicht entfernt. Andererseits könnten die Taschen zerstört werden. Mit einer kleinen, 2 ml fassenden Spritze mit Kanüle wurden die Taschen noch einmal gespült und von Gelrückständen und Luftblasen befreit. Die erste Tasche wurde bei jedem Gel mit 10 µl Precision Plus Dual Color Protein Standards (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) als Standardmarker befüllt, die restlichen Taschen mit jeweils 30 µg der Proteine, die kurz vor dem Pipettieren gemischt und zentrifugiert wurden. Um einer Verwechslung der Gele vorzubeugen, wurde notiert, in welcher Kammer welche Proben liefen. Zur Befüllung fand eine Pipette (Pipetgirl, Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland) mit Spezialpipettenspitzen (Gel loading pipette 200 µl, Nerbe plus GmbH & Co. KG Winsen/Luhe, D) Verwendung. Damit die Taschen nicht überliefen und die Proben sich vermischen konnten, erfolgte das Pipettieren langsam und sorgfältig. Danach wurden die befüllten Kammern (Bio-Rad Laboratories GmbH) in das Elektrophoresegerät (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) übertragen und bis zur eingezeichneten Markierung mit 1 x Elektrodenpuffer (Tabelle 13) aufgefüllt. Zum Konzentrieren der Proteine am Übergang von Sammel- zu Trenngel wurde eine Spannung von 70 V angelegt, die nach 20 min auf 140 V erhöht und für 90 – 120 min

gehalten wurde. Sobald die erwünschte Durchlauftiefe der Lauffront erreicht war, wurde die Spannung vom Gerät (Bio-Rad Laboratories GmbH) genommen.

3.3.2 Western Blot

Der Western-Blot fand im Wet-Blot-Verfahren statt. Zur Vorbereitung wurden vier Whatman®-Blottingpapiere (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und zwei Schwämmchen (Bio-Rad Laboratories GmbH) in 1 l frisch angesetztem Blotpuffer, 1 x (Tabelle 15) eingelegt. Für den Western Blot wurden die Blotkassetten (Bio-Rad Laboratories GmbH) aufgeklappt und jede Seite mit jeweils einem Schwämmchen (Bio-Rad Laboratories GmbH) und zwei Whatman®-Blottingpapiere (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) belegt. Nach dem Durchlauf der SDS-PAGE wurde die, das Gel enthaltende Glasplatte aus der Kammer (Bio-Rad Laboratories GmbH) genommen und geöffnet. Das Gel landete auf der Dünneren der beiden Glasplatten. Nun konnte das Sammel- vom Trenngel entfernt und entsorgt werden. Danach wurde das Trenngel mit einem Schaber (Bio-Rad Laboratories GmbH) vorsichtig, um ein Reißen zu verhindern, von der Glasplatte (Bio-Rad Laboratories GmbH) gehoben und auf das vorbereitete, nasse Whatman®-Blottingpapiere (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) übertragen. Eine PVDF-Membran (Roche Diagnostics GmbH) musste zur Aktivierung kurz in 100 % Methanol (Merck Chemicals) geschwenkt werden, um die Proteine aus dem Gel aufnehmen zu können. Danach wurde sie in Blotpuffer 1 x (Tabelle 15) bis zur Verwendung gelagert. Zur Kennzeichnung wurde die PVDF-Membran (Roche Diagnostics GmbH) so beschriftet, dass im weiteren Verlauf die Seite erkennbar war, auf der sich die geblotteten Proteine befinden. Die Membran (Roche Diagnostics GmbH) wurde im nächsten Schritt auf das vorbereitete Gel gelegt. Um alle Proteine sauber vom Gel auf die Membran (Roche Diagnostics GmbH) zu übertragen, war es wichtig, dass die Membran (Roche Diagnostics GmbH) blasenfrei auflag. Dies wurde dadurch erreicht, dass das Gel kurz mit Blotpuffer 1 x (Tabelle 15) übergossen wurde, die Membran (Roche Diagnostics GmbH) auf dem Gel positioniert wurde und mit einem nassen Zentrifugenröhrchen (Corning, NY, USA) unter minimalem Druck ausgestrichen wurde. Nachdem ein blasenfreies Aufliegen

gewährleistet wurde, konnte die Blottingkassette (Bio-Rad Laboratories GmbH) zugeklappt werden und in den Blottank (Bio-Rad Laboratories GmbH) eingespannt werden. Zum vollständigen Zusammenbau vgl. Abbildung 5.

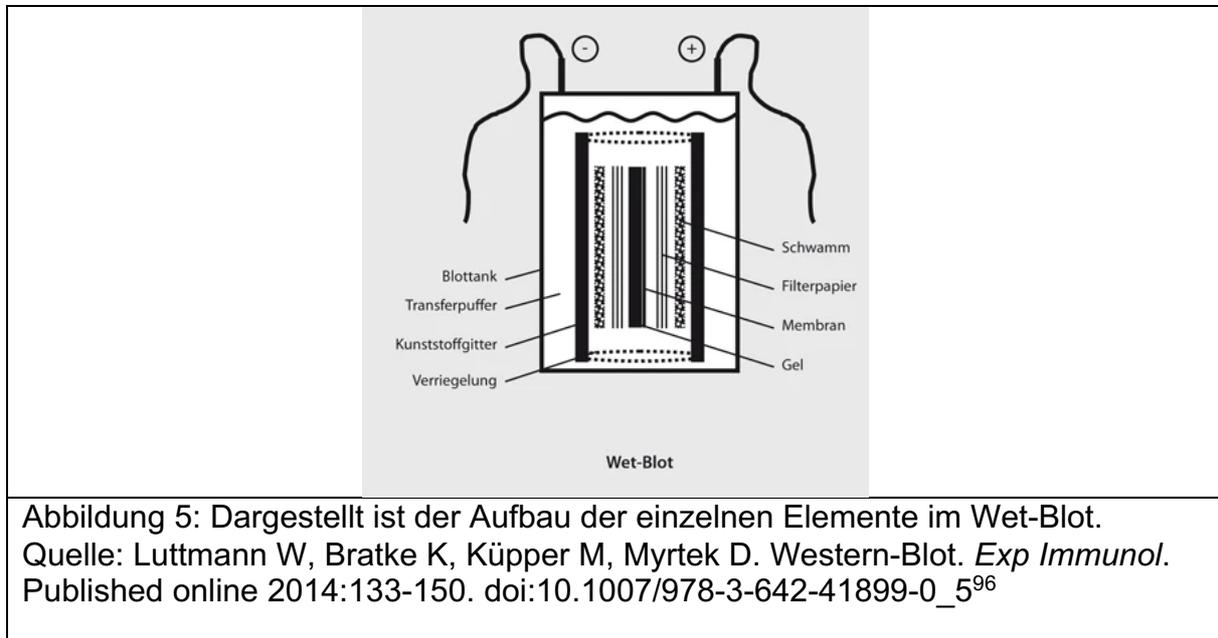


Abbildung 5: Dargestellt ist der Aufbau der einzelnen Elemente im Wet-Blot. Quelle: Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Western-Blot. *Exp Immunol.* Published online 2014:133-150. doi:10.1007/978-3-642-41899-0_5⁹⁶

Beim Zusammenbau der einzelnen Komponenten und dem nachfolgenden Einbau in den Blottank (Bio-Rad Laboratories GmbH) war zu beachten, dass das Gel und die Membran so einzuspannen, dass die Proteine von der Kathode zur Anode wandern. Der Tank wurde mit der Kassette beladen und mit 1 l Blotpuffer 1 x (Tabelle 15) befüllt. Zusätzlich wurden noch zwei handelsübliche Kühlakkus in den Tank gegeben. Danach konnte der Deckel aufgesetzt werden. Hierbei war darauf zu achten, dass die Stromanschlüsse richtig angeschlossen wurden. Die angelegte Stromstärke betrug 140 Milliampere (mA) und wurde für 60 – 80 min gehalten. Bei größeren zu detektierenden Proteinen, die langsamer laufen, oder bei dickerem Gel musste etwas länger geblottet werden. Alle benutzten Materialien wurden nach der Benutzung mit einem Schwamm (EDEKA Zentrale Stiftung & Co. KG, Hamburg, D) und mit Spülmittel (Ecolab GmbH, Wien, AT) gereinigt und mit destilliertem Wasser abgespült. Zur Vorbereitung für den später folgenden Antikörpernachweis wurden Blocklösungen hergestellt. Diese dienten dazu, die noch freien Bindungsstellen auf der Membran zu besetzen, damit diese später nicht vom Antikörper besetzt werden konnten und damit einen Nachweis des gesuchten Proteins unmöglich machten. Die Blocklösung wurde auf die Antikörperlösung abgestimmt. Wurde der Antikörper in 3 % BSA-Lösung (Tabelle 18) inkubiert, wurde 3 % BSA (BIOMOL) in TBST 1 x (Tabelle 17) gelöst und

als Blocklösung genutzt. Fand die Inkubation in 5 % Milchlösung (Tabelle 19) statt, wurde die Blocklösung aus 5 % Milchpulver (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in TBST 1 x (Tabelle 17) gelöst hergestellt. Abgewogen wurde die Menge an Milchpulver und BSA-Pulver auf der Präzisionswaage Talent TE2101 (Sartorius AG, Göttingen, D) mit Petrischalen, 10 cm (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D). Für jede Membran wurden 7 ml der Blocklösung hergestellt. Nach dem fertigen Übertrag der Proteine auf die PVDF-Membran (Roche Diagnostics GmbH) wurde diese in die vorbereitete Blocklösung eingelegt und für 45 – 60 min auf dem Wippschüttler (BioSan, Riga, LVA) auf niedriger Stufe geschüttelt, um auf die gesamte Membran einzuwirken. Damit im nächsten Schritt die gesuchten Proteine vom Primärantikörper besetzt werden konnten, wurde eine Lösung hergestellt. Je nach Antikörper wurde dieser in 3 % BSA-Lösung (Tabelle 18) oder in 5 % Milchlösung (Tabelle 19) gelöst. Pro PVCF-Membran (Roche Diagnostics GmbH) wurden 7 ml der Antikörper-Lösung (Tabelle 20, Tabelle 21) genutzt.

Tabelle 26: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Molekulargewicht	Herkunft	Lösung	Verdünnung
CD44	80 kDa	Mouse IgG	5 % Milch	1:1000
E-Cadherin	120 kDa	Mouse IgG	3 % BSA	1:5000
P-Cadherin	130 kDa	Mouse IgG	5 % Milch	1:1000
GSK-3 β	40-50 kDa	Rabbit IgG	3 % BSA	1:1000
β -actin	42 kDa	Rabbit IgG	3 % BSA	1:5000
Twist	28 kDa	Mouse IgG	5 % Milch	1:800

β -actin wurde als Standard verwendet, da es im Zytoskelett von Zellen vorkommt und dadurch in allen Proben nachgewiesen werden konnte. Je nach Primärantikörper wurde β -actin daher in 3 % BSA-Lösung (Tabelle 18) oder in 5 % Milchlösung (Tabelle 19) zusätzlich zum Primärantikörper eingefügt. Die Menge der eingesetzten Antikörper entsprach den Verdünnungen, wie sie in Tabelle 26 gezeigt sind. Nach dem Blocken der unbesetzten Stellen auf der PVDF-Membran (Roche Diagnostics GmbH) wurde die Blocklösung abgegossen und die Membran (Roche Diagnostics GmbH) in 7 ml der vorbereiteten Antikörperlösungen eingelegt. Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, wurden die eingelegten Membranen (Roche Diagnostics GmbH) über Nacht auf einem Wippschüttler bei 4 °C inkubiert. Damit im nächsten Schritt ungebundene Antikörper von der Membran (Roche Diagnostics GmbH) gewaschen werden konnten, wurde die Antikörperlösung abgegossen und die Membran (Roche Diagnostics GmbH) drei Mal mit TBST, 1 x (Tabelle 17) gewaschen. Jeder Waschvorgang dauerte 5 min. Nach jedem Waschvorgang wurde die Lösung erneuert. Um möglichst alle ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurde auf dem Wippschüttler (BioSan, Riga, LVA) gewaschen. Zur Vorbereitung auf den nächsten Schritt wurde der Sekundärantikörper (Tabelle 23) in 7 ml Blocklösung verdünnt (Tabelle 27).

Tabelle 27: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Herkunft	Lösung	Verdünnung
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Goat	5 % Milch / 3 % BSA	1:1000
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Goat	5 % Milch / 3 % BSA	1:1000

Für den Sekundärantikörper wurde die gleiche Blocklösung verwendet, in der auch der Primärantikörper verdünnt wurde. Die vorbereitete Lösung wurde zur Inkubation auf die gewaschene, mit dem Primärantikörper inkubierte Membran (Roche Diagnostics GmbH) gegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der abgelaufenen Zeit wurde wie beim Primärantikörper dreimal 5 min mit TBST 1x (Tabelle 17) gewaschen, um ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Währenddessen wurde zur Sichtbarmachung der Antikörper das Entwicklerreagenz SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) vorbereitet. Das Entwicklerreagenz Roti Lumin (Carl Roth, Karlsruhe, D) fand bei einem der ersten Versuche Anwendung, wurde aber wegen zu schwacher Deutlichkeit der nachzuweisenden Banden danach nicht mehr verwendet. Zur Aktivierung des Entwicklerreagenz (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) wurden jeweils 1 ml der beiden zu vermischenden Bestandteile auf Raumtemperatur gebracht und gemischt. Jeweils eine gewaschene Membran (Roche Diagnostics GmbH) ließ man kurz auf einem trockenen, sauberen Zellstofftuch abtropfen. Danach wurde sie in ein sauberes Schälchen überführt. Die vorbereiteten 2 ml des Entwicklerreagenz (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) wurden mit einer Pipette (Eppendorf AG, Hamburg, D) gleichmäßig über die Membran (Roche Diagnostics GmbH) verteilt und bei leichtem Schwenken aus der Hand für 1 – 2 min inkubiert. Die nasse Membran (Roche Diagnostics GmbH) wurde blasenfrei in eine Klarsichtfolie (InterES GmbH, Nürnberg, D) überführt. Noch vorhandene Blasen wurden im Nachgang mit einem Zellstofftuch ausgerieben und überschüssige Flüssigkeit am Rande der Folie abgesaugt. Damit das Entwicklerreagenz (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) nicht vor dem eigentlichen Entwicklungsvorgang mit Licht reagiert, war es wichtig, die Folien bis dahin vor Licht zu schützen. Für die Entwicklung der Bilder wurde der ChemiDoc XRS+ Imaging

System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mit der Software Image Lab Software 5.2.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) genutzt. Im Entwickler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) wurden die Membranen (Roche Diagnostics GmbH) für 20 – 600 Sekunden (sec) belichtet. Die Auswertung der Bilder fand ebenfalls mit der Software Image Lab Software 5.2.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) statt. Einen Spezialfall bildete der Primärantikörper GSK-3 β , da er ein ähnliches Molekulargewicht wie β -actin besitzt und eine gemeinsame Inkubation falsche Ergebnisse geliefert hätte. Er wurde zuerst ohne β -actin inkubiert und es wurde ein Bild erzeugt. Danach wurde der Primärantikörper, in diesem Fall GSK-3 β mit Hilfe der ReBlot Plus Mild Ab Stripping Solution (Merck, Darmstadt, D) von der Membran (Roche Diagnostics GmbH) gelöst. Dafür wurde dreimal 5 min mit TBST 1 x (Tabelle 17) gewaschen und danach mit ReBlot Plus Mild Ab Stripping Solution (Merck, Darmstadt, D) für 10 min inkubiert. Danach wurde noch dreimal mit TBST 1 x (Tabelle 17) für jeweils 5 min gewaschen. Danach konnte β -actin als Primärantikörper inkubiert werden. Diese Schritte fanden wie oben beschrieben statt. Als letzter Schritt wurden alle Proteine auf der Membran (Roche Diagnostics GmbH) mit Ponceau-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) angefärbt. Diese konnte gleichermaßen zur Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt werden.

3.3.3 qPCR

Mit der quantitativen Polymerase Kettenreaktion (qPCR) lassen sich exprimierte Gene quantitativ in Zellen nachweisen. Da bei der qPCR nur doppelsträngige DNA nachgewiesen werden kann, mussten die Gene, die in einzelsträngiger RNA vorliegen, zuerst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.⁹⁷

3.3.3.1 Schreiben der cDNA

In Vorbereitung auf den Versuch wurde von der AG Bauer RNA aus den verschiedenen Proben isoliert. Alle Arbeiten zum Schreiben der cDNA wurden auf Eis durchgeführt. Die Reagenzien wurden in Eppendorf PCR-Tube 0,2 ml (Eppendorf AG, Hamburg, D)

pipettiert. Es wurde berechnet, wie viel μl der Probe eingesetzt werden musste, um 1000 Nanogramm (ng) RNA zu erhalten. Dieses wurde dann mit Wasser (H_2O Dnase und Rnasefrei, sterilfiltriert, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) auf ein Volumen von 10 μl aufgefüllt. Hinzugegeben wurden 1 μl des 50 μM Oligo (dt) Primer und 2 μl des 600 μM Random Hexamer Primers. Damit betrug das Volumen 13 μl . Die Primer und weitere Reagenzien, die für das Schreiben der cDNA verwendet wurden, entstammen dem Transkriptor First Strand cDNA Synthesekit (Roche Diagnostics, Basel, CH). Der Ansatz wurde nun für 10 min bei 65°C denaturiert und danach zurück auf Eis gestellt. Danach wurden dem Ansatz 4 μl 5 x RT Reaction Buffer, 0,5 μl 40 U/ μl RNase Inhibitor, 2 μl 10 mM dNTPs und 0,5 μl 20 U/ μl Transcripase hinzugefügt, sodass im Ansatz ein Endvolumen von 20 μl erreicht wurde. Das Pipettieren wurde mit Filter-Pipettenspitzen, 10 μl (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, D) und Eppendorf Research plus, Einkanalpipette, variable 0,5-10 μl (Eppendorf AG, Hamburg, D) durchgeführt. Die Proben wurden in Eppendorf Tubes gefüllt und vor dem Schreiben in der Zentrifuge Rotanta 320 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D) abzentrifugiert. Das anschließende Protokoll zum Schreiben der cDNA ist in Tabelle 28 gezeigt. Der Vorgang fand im T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen, D) statt.

Tabelle 28: Cycle Protokoll

Vorgang	Temperatur	Dauer
Denaturieren	65°C	10 min
Pause	4°C	-
Transkribieren	25°C	10 min
Transkribieren	55°C	30 min
Inaktivieren	85°C	5 min
Pause	4°	-

3.3.3.2 Durchführung der qPCR

Tabelle 29: verwendete Gene für die qPCR

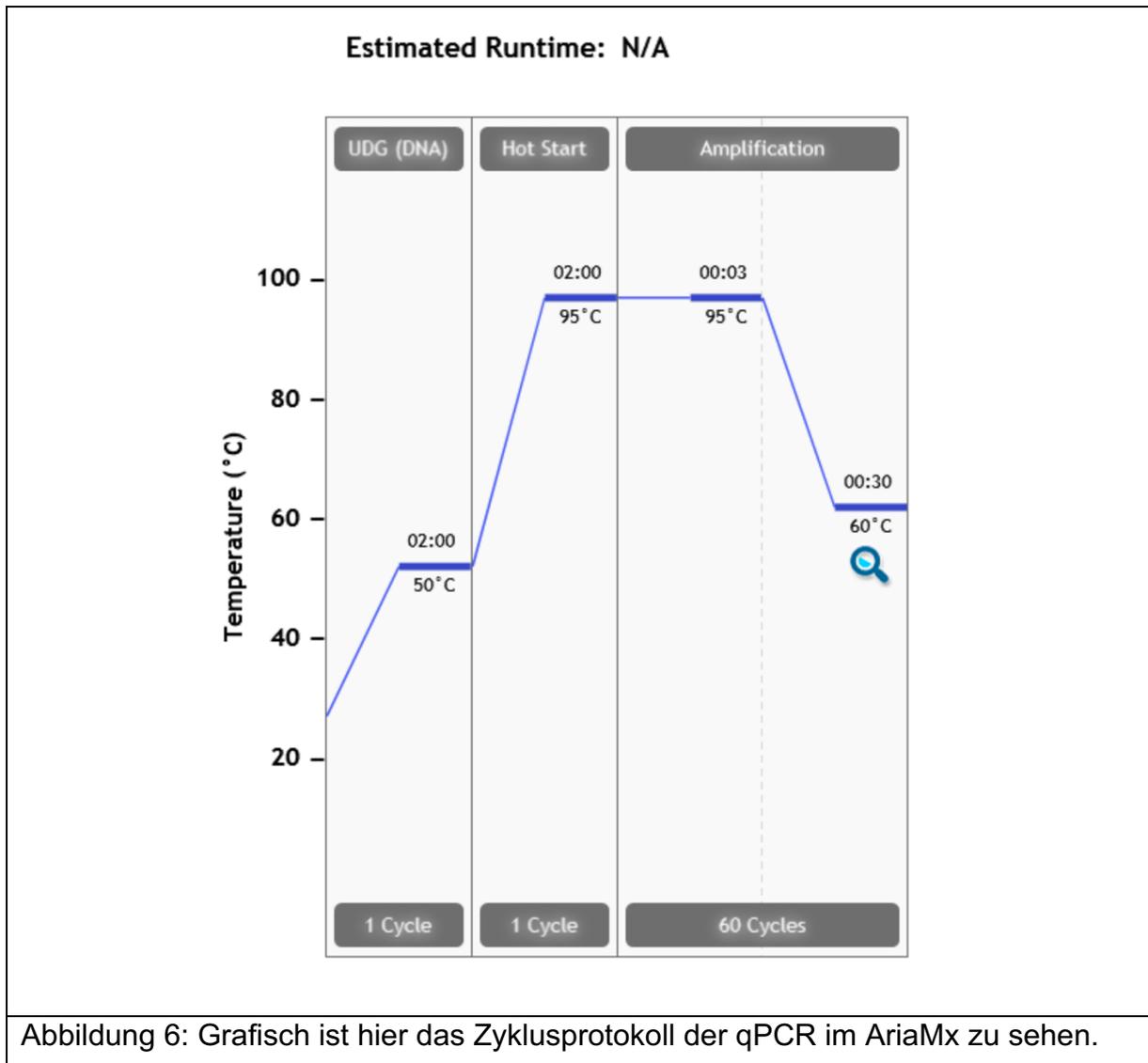
Gen
18S
GSK3 β
MMP2
MMP9
OPG
RANKL
EGFR
VEGFR1
VEGFR2

Die Liste der verwendeten Primer und Sonden ist in Kapitel 2.7.4, Tabelle 24 zu finden.

Bei der nachfolgenden qPCR wurde nachgewiesen, in welchen Proben sich wie viel der nachzuweisenden Gene befindet. Für jedes Gen gibt es hierbei eine spezielle Sonde und einen speziellen Primer, der an der cDNA ansetzt und diese dadurch vermehrt werden kann. Als Standard wurde das 18S Gen verwendet, da es in jeder eukaryotischen Zelle nachzuweisen ist. Für den Nachweis von MMP2, MMP9, VEGFR

und 18S mussten der Primer (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, D), bestehend aus Forward- und Reverseprimer, mit der Sonde (Roche Diagnostics, Basel, CH) vermischt werden. Für den Nachweis von RANKL, OPG, EGFR und 18S waren Primer und Sonde bereits zusammengemischt (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Im Cyclex (AriaMx Real-Time PCR System, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) sendet die Sonde ab einer bestimmten Menge DNA ein Fluoreszenzsignal aus, das vom Gerät gemessen werden kann. Ausschlaggebend ist die Anzahl von Zyklen, die benötigt wurden, um ein Signal zu messen. Je mehr Zyklen es braucht, desto weniger Genexpression ist in der Probe.⁹⁷ Zum Pipettieren wurden Filter-Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, D) mit Eppendorf Research plus, Einkanalpipette, variable 0,5-10 µl, 10-100 µl (Eppendorf AG, Hamburg, D) verwendet. Die Reagenzien, Proben, Primer und Sonden wurden auf 96-Well Quali-PCR-Platten (Kisker Biotech, Steinfurt, D) pipettiert. Für einen Ansatz, bei dem die Sonde und der Primer getrennt voneinander vorlagen, wurden 40 ng cDNA auf 3 µl mit Wasser (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) aufgefüllt. Zusätzlich wurden 10 µl 2 x Brilliant III QPCR MasterMix (Stratagene Agilent Technol.s, Santa Clara, CA), 0,5 µl Sonde (Roche Diagnostics, Basel, CH) jeweils 0,5 µl Forward- und Reverse-Primer (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, D), siehe auch Tabelle 24 und 5,5 µl Wasser (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet, um ein Endvolumen von 20 µl zu erhalten. Der Ansatz für die qPCR, bei dem Primer und Sonde schon zusammen vorlagen, setzte sich aus 40 ng cDNA, aufgefüllt mit Wasser (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) auf 9 µl, 1 µl TaqMan Assay 20x (Primer+Sonde) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) und 10 µl TaqMan™ Schneller Advanced Master-Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) zusammen. Alle Arbeiten fanden auf Eis statt. Die fertig pipettierten 96-Well-Quali-PCR-Platten (Kisker Biotech, Steinfurt, D) wurden mit einer Folie überklebt, um einen Flüssigkeitsverlust zu verhindern. Danach wurde die Platte in der Heraeus Multifuge 3S-R (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D) für 1 min bei 1000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Falls nach dem Zentrifugieren noch Tropfen am oberen Rand des Wells zu finden waren, wurde der Prozess wiederholt. Die 96-Well Platte (Kisker Biotech, Steinfurt, D) wurde zum Gennachweis in den AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) gegeben und mit der Software

AriaMx (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) gestartet. Das Zyklusprotokoll läuft ab, wie in Abbildung 6 gezeigt.



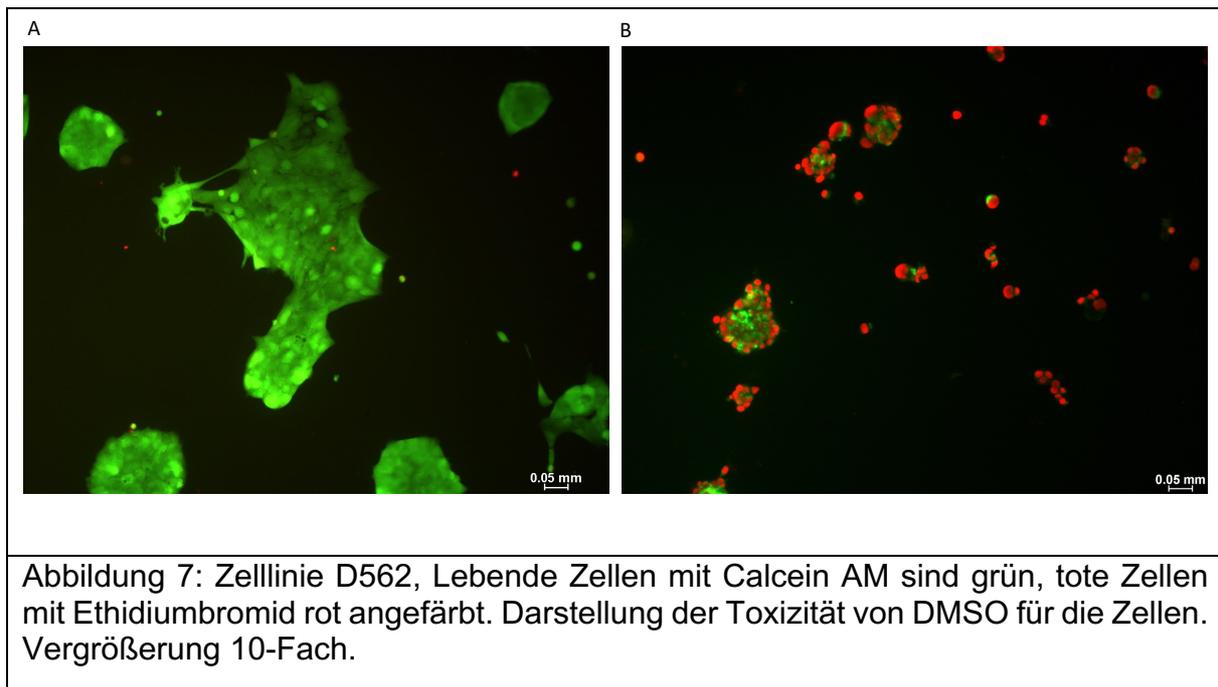
Nach dem Durchlaufen der Zyklen wurden die ermittelten CT-Werte (cycle threshold) in eine Excel-Tabelle übertragen. Dort werden die Werte der einzelnen Gene mit denen des Standards verglichen und in Diagrammen dargestellt.

4 Ergebnisse

In verschiedenen Publikationen wurden abmildernde Effekte von Propranolol auf die orale Karzinogenese in Tierversuchen⁹¹, eine Inhibition der β -AR vermittelten Effekte auf die Tumorprogression in Brustkrebszellen⁸⁶, sowie die Apoptose von gesunden Brustzellen⁹⁰ beschrieben. In vorläufigen Studien der Arbeitsgruppe Bauer wurde festgestellt, dass Propranolol einen signifikanten Effekt auf das Überleben und die Zell-Zell-Verbindungen hatte. In den hier durchgeführten Experimenten ging es nun darum, den Effekt von Propranolol auf die Vitalität und Morphologie von (head and neck cancer cells) HNC-Zellen zu testen. Uns hat insbesondere interessiert, welche Auswirkungen unterschiedliche Inkubationszeiten mit und ohne Propranolol auf HNC-Zellen haben. Darüber hinaus wurde geprüft, ob Propranolol einen Einfluss auf die Expression verschiedener für das Tumorwachstum und die Metastasierung relevanter Proteine ausübt. Diese Untersuchungen wurden mittels Western-Blot-Analysen und quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) durchgeführt. Die gewonnenen Ergebnisse verdeutlichten, dass bei den verwendeten Konzentrationen von Propranolol deutliche Effekte auf die verschiedenen Zelllinien beobachtet werden konnten.

4.1 Einfluss von Propranolol auf die Überlebensfähigkeit von HNSCC-Zellen

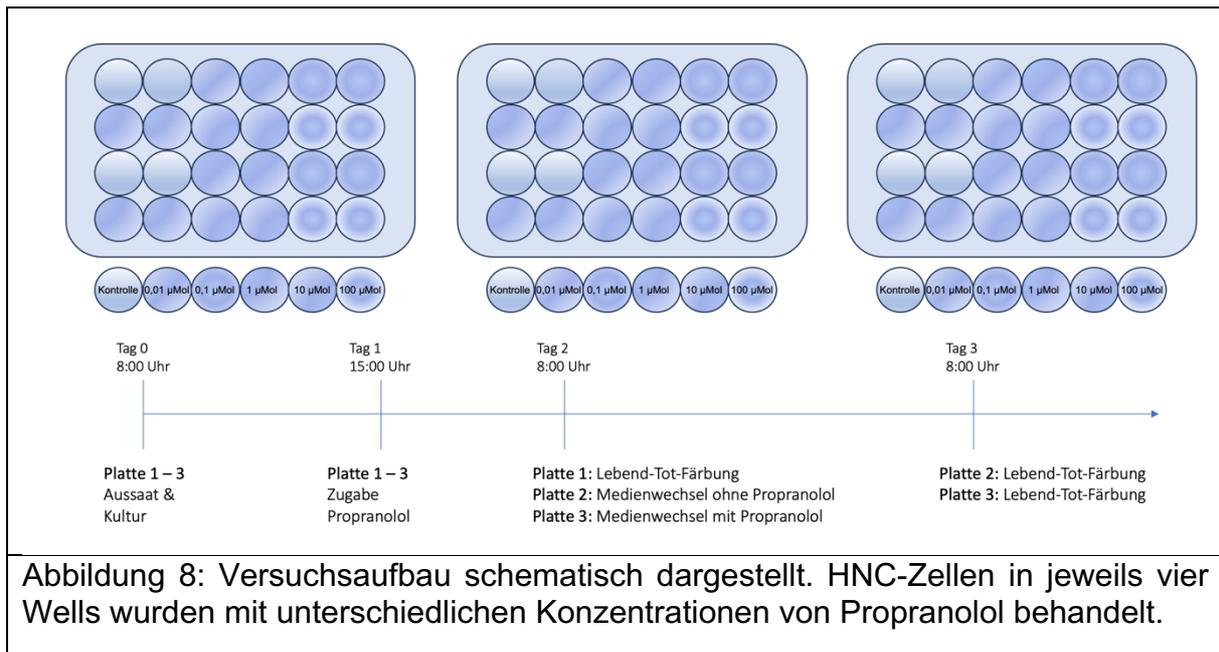
Da in Vorversuchen festgestellt wurde, dass die Verdünnung von Propranolol in 1 % Dimethylsulfoxid in diesem experimentellen Setup toxisch für die Zellen ist, wurde entschieden, Propranolol in Ethanol zu verdünnen, da hier keine toxischen Effekte auf die Zellen bei einer Konzentration von 0,01 % EtOH auftraten.



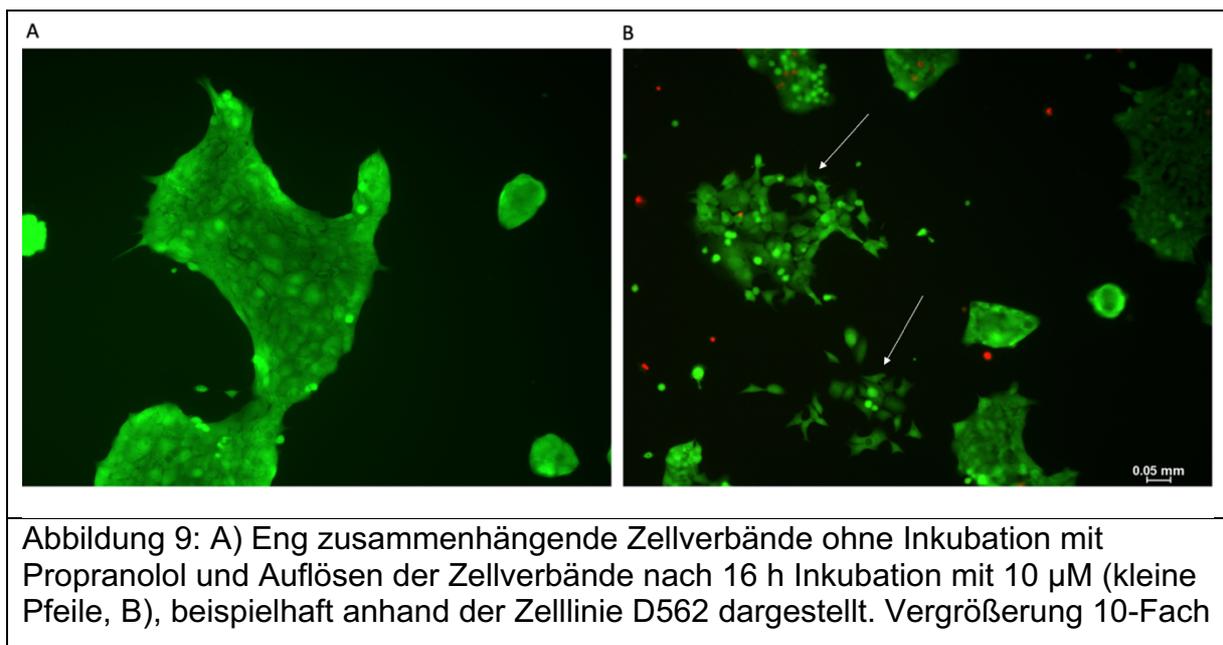
In Abbildung 7 sieht man im Bild A ein zellübliches Wachstum nach 16-stündiger Inkubationszeit mit Propranolol, gelöst in 0,01 % EtOH. Bild B zeigt eine 16-stündige Inkubation mit Propranolol, gelöst in 1 % DMSO. Hier sind großflächig abgestorbene Zellen zu erkennen, was auf die toxische Wirkung durch DMSO hinweist. Die weiteren Versuche wurden mit EtOH durchgeführt.

4.1.1 Versuchsaufbau und Erklärung

Abbildung 8 zeigt den Versuchsaufbau. Die Platten wurden für 16 h mit vorher bestimmten Konzentrationen Propranolol behandelt. Platte 1 wurde danach einer Lebend-Tot-Färbung unterzogen. Platte 2 wurde weiter mit Medium ohne Propranolol und Platte 3 mit gleicher Konzentration wie beim ersten Medienwechsel behandelt, bis insgesamt 72 h inkubiert wurde, bevor eine Lebend-Tot-Färbung durchgeführt wurde.



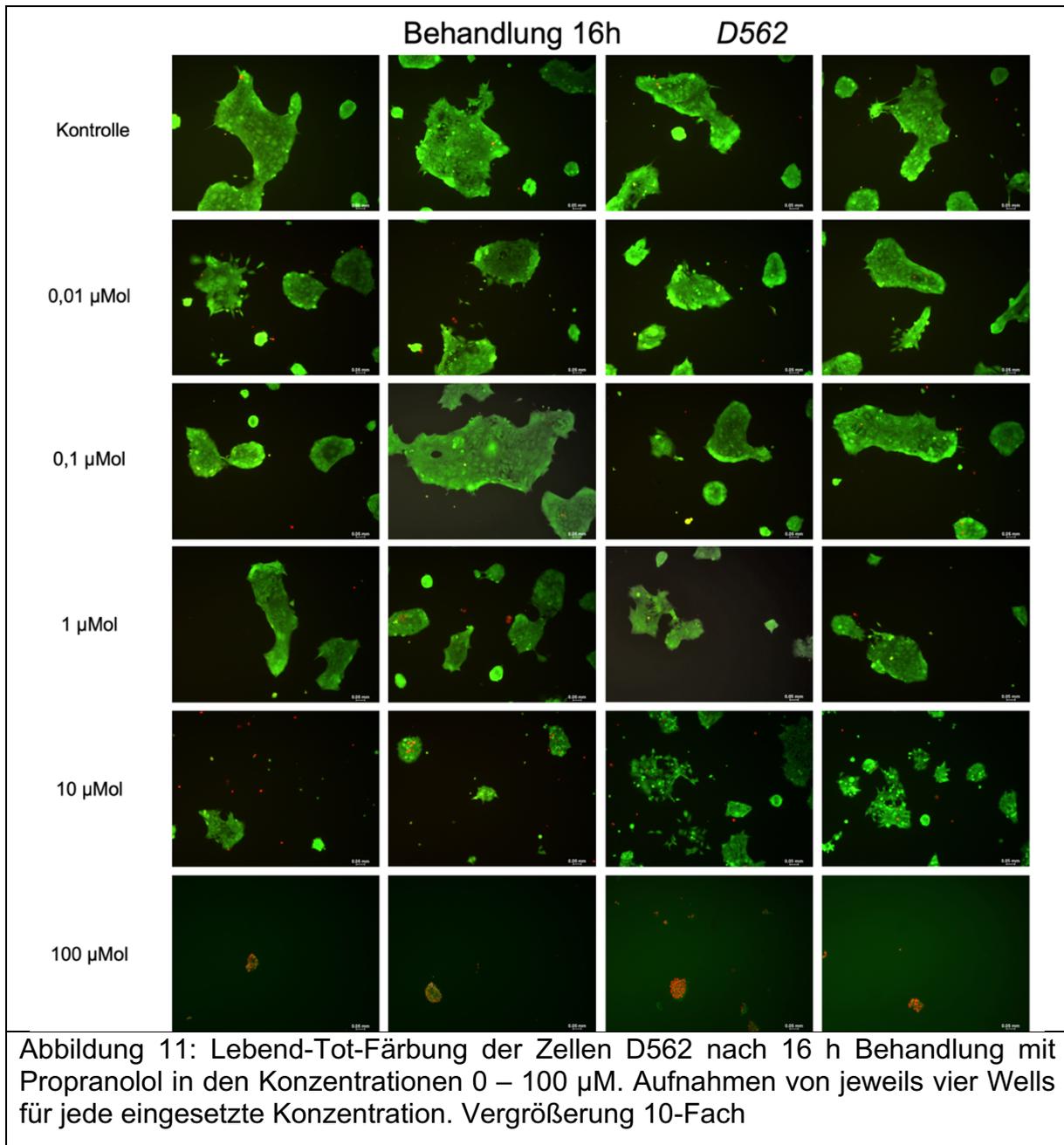
Bei der Auswertung wurden die Zellanzahl und die Morphologie der Zellen auf Veränderungen bei verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlichen Einwirkzeiten untersucht. Die Tumoren organisieren sich beim Wachsen in Zellverbänden. Dieses Wachstum wird durch den Einfluss von Propranolol ab gewissen Konzentrationen gestört, wodurch sich die engen Kontakte zwischen den Zellen lösen, gezeigt in Abbildung 9. Ab welcher Konzentration das stattfindet, wurde hier untersucht.



Zur Ermittlung der Zahl lebender Zellen wurde die Anfärbung mit Calcein AM gewählt. Diese stellen sich im Mikroskop grün dar. Tote Zellen wurden mit Ethidiumbromid rot angefärbt (Abbildung 10). Alle Bilder wurden mit 10-Facher Vergrößerung aufgenommen. Der sichtbare Balken in den Bildern besitzt eine Länge von 0,05 mm.

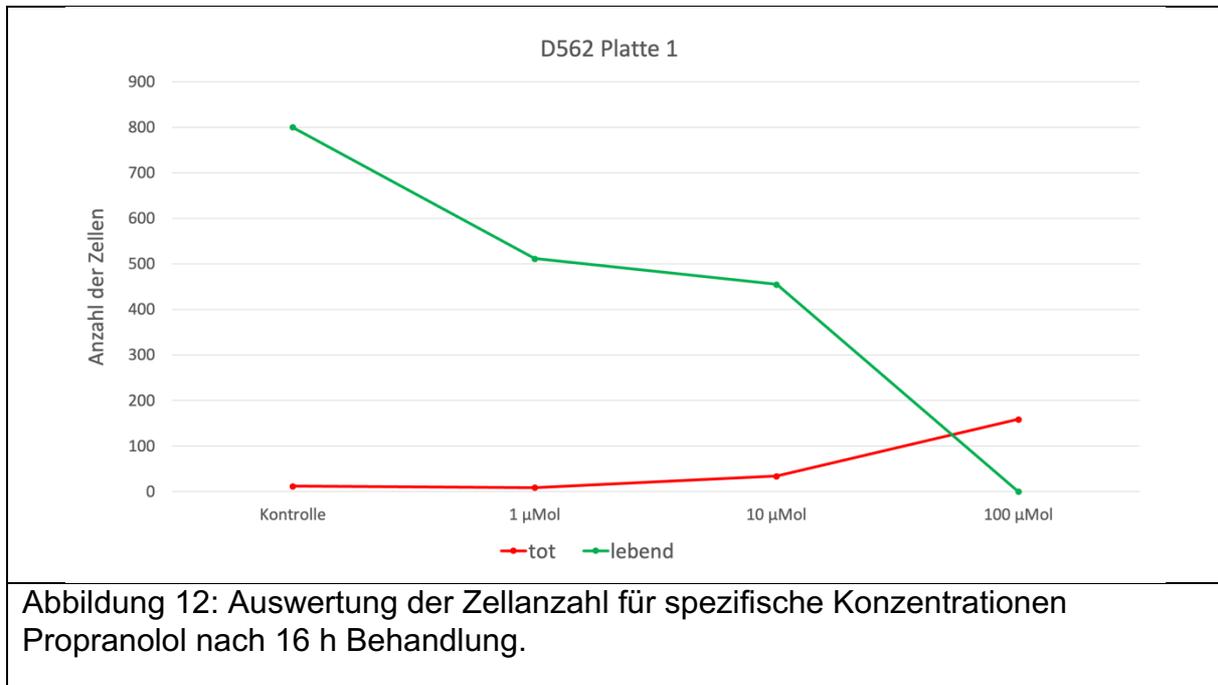


4.1.2 Einfluss der Konzentration und Einwirkdauer von Propranolol auf Zellen der Linie D562

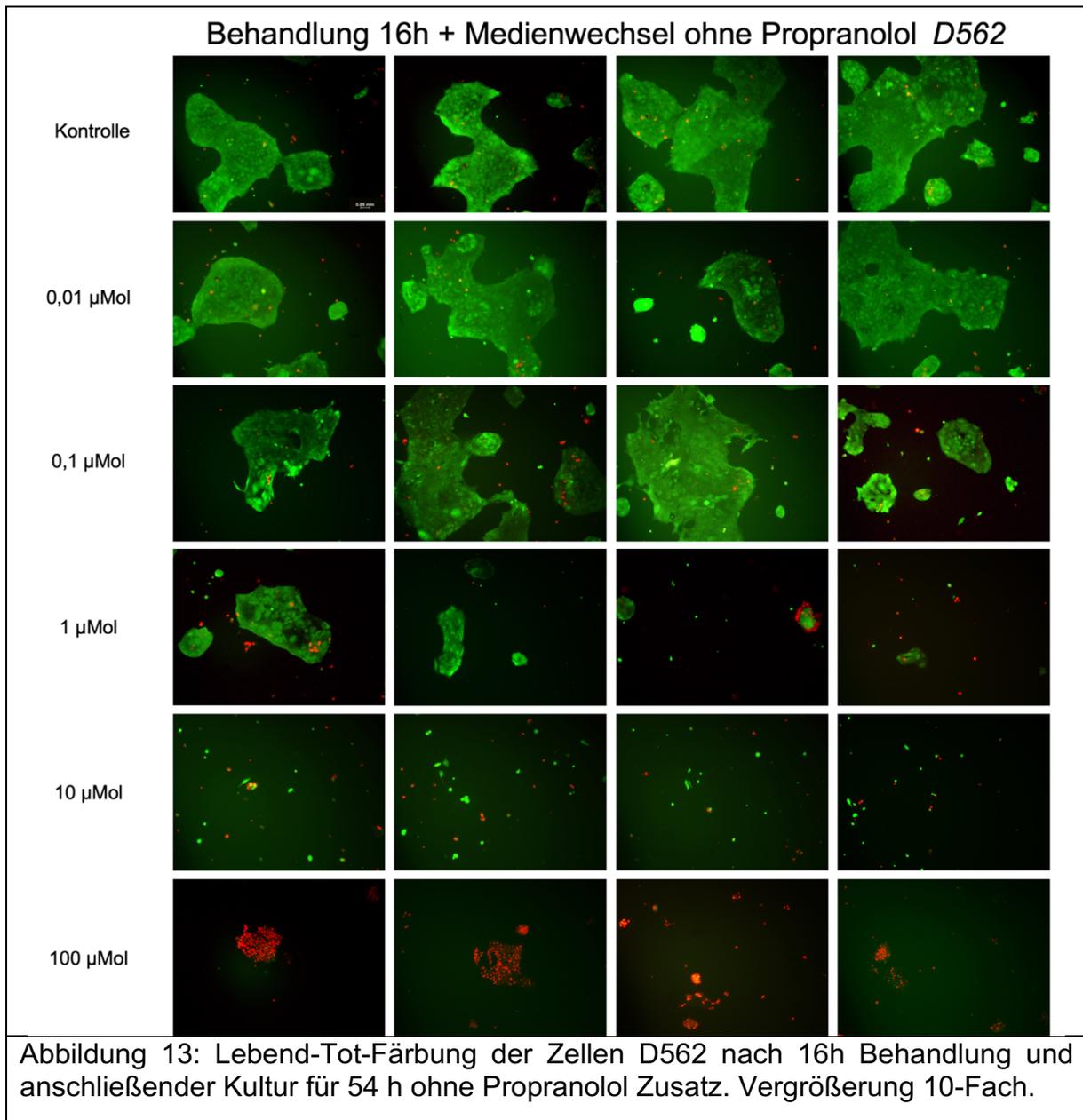


In Abbildung 11 kann bei der Kontrolle das für die Zellen D562 typische Wachstumsmuster in Zellverbänden beobachtet werden. Die Morphologie der Zellen ist denen anderer Tumorzellen ähnlich. Es finden sich stark vergrößerte Zellkerne und verschiedene Formen und Größen an Zellen. Konzentrationen bis 0,1 µM scheinen keinen Einfluss auf das Wachstum zu haben. Bei einer Konzentration von 1 µM nimmt

die Zellanzahl ab und es sind einzelne tote Zellen zu erkennen. Eine Konzentration von 10 μM sorgte für ein Auflösen der Zellverbände und eine Abnahme der Zellanzahl. Neben der Abnahme lebender Zellen, finden sich vermehrt tote Zellen. Bei einer Konzentration von 100 μM zeigte sich nach 16 h Propranolol-Behandlung eine deutliche Zunahme abgestorbener Zellen. Es sind keine lebenden Zellen zu erkennen.

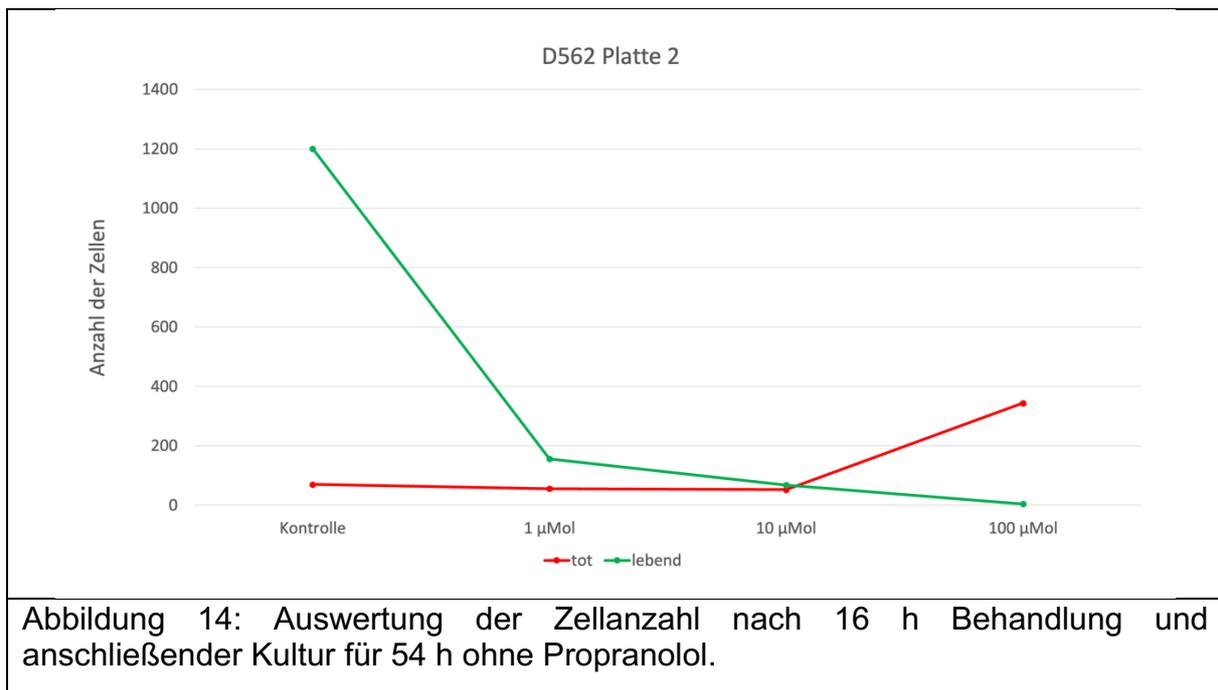


Die Auswertung der Anzahl an lebenden und toten Zellen zeigt in Abbildung 12 einen Effekt von Propranolol ab einer Konzentration von 1 μM im Vergleich zur Kontrolle bei einer Einwirkdauer von 16 h. Dieser negative Effekt auf die Zellanzahl wirkt sich mit jeder höheren Konzentration stärker auf die Zellen D562 aus.

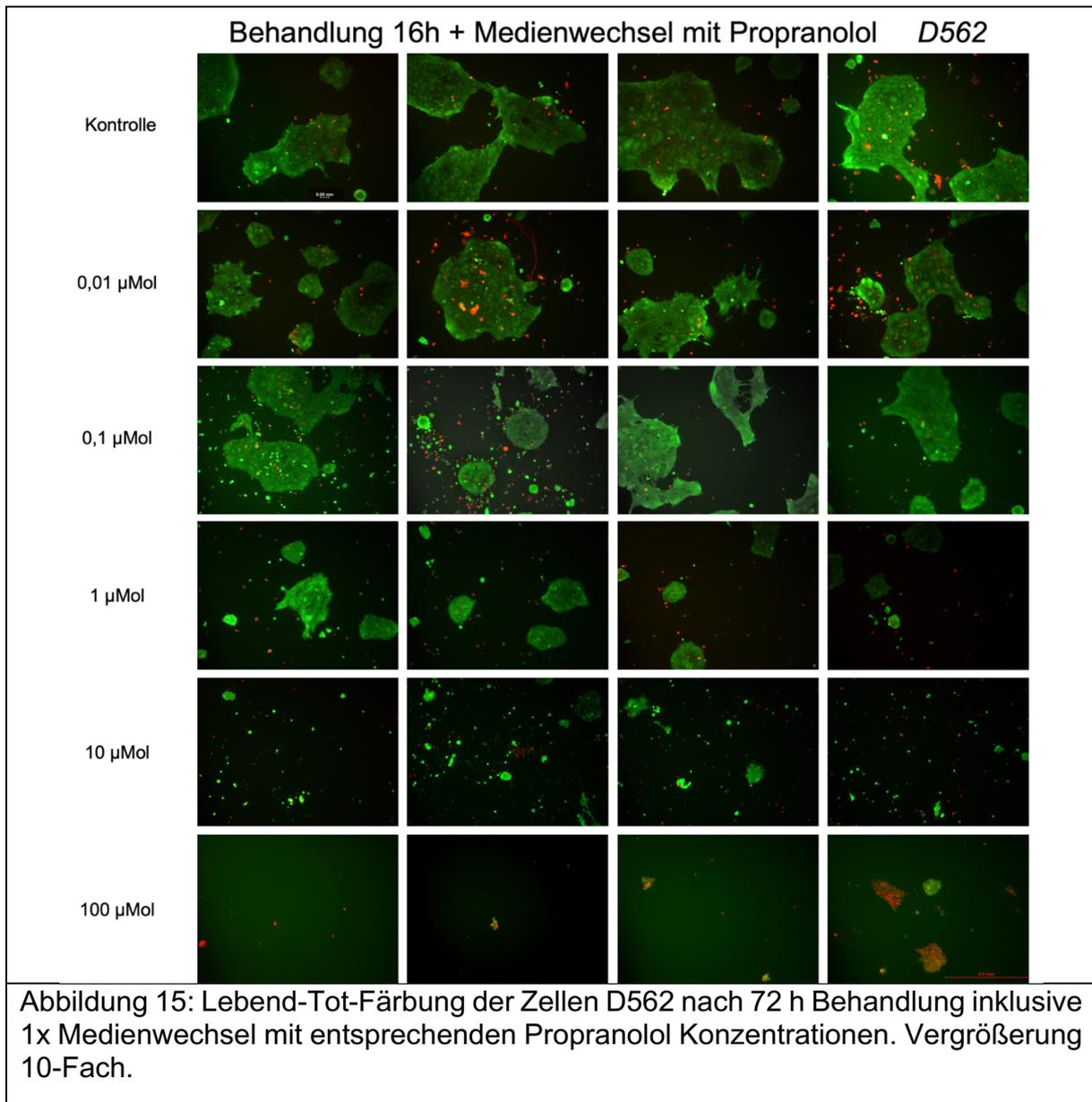


Als Nächstes wollten wir wissen, wie sich eine Nachkultur ohne Zusatz von Propranolol auf die initiale Behandlung auswirkt. Wie bereits 16 h Behandlung mit anschließender Lebend-Tot-Färbung in Abbildung 11 & Abbildung 12 zeigen konnte, hatten Konzentrationen bis 0,1 μM keinen Einfluss auf das Wachstum und die Morphologie der Zellen. Abbildung 7 zeigt einen bleibenden Effekt der initialen Behandlung mit Propranolol bei Konzentrationen von 1 μM und mehr. Man erkennt vergrößerte Zellkerne und morphologische Unterschiede, wie es bei Tumorzellen häufig zu beobachten ist. Ebenfalls ist das Wachstumsmuster in Zellverbänden zu beobachten.

Die Zellen, die anfangs mit 1 μM Propranolol behandelt wurden, zeigten diese Wachstumsmuster gleichermaßen, sind aber in ihrer Zellanzahl im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert und es finden sich im Verhältnis mehr tote Zellen. Bei 10 μM Propranolol und der beobachteten Auflösung der Zellverbände kann nach Medienwechsel ohne Zusatz keine Erholung des Wachstums beobachtet werden. Im Gegenteil finden sich lediglich vereinzelt lebende Zellen neben Toten, was auf einen anhaltenden Effekt des Agens schließen lässt. Bei einer Konzentration von 100 μM sind, wie nach 16 h Behandlung, nur tote Zellen zu erkennen.

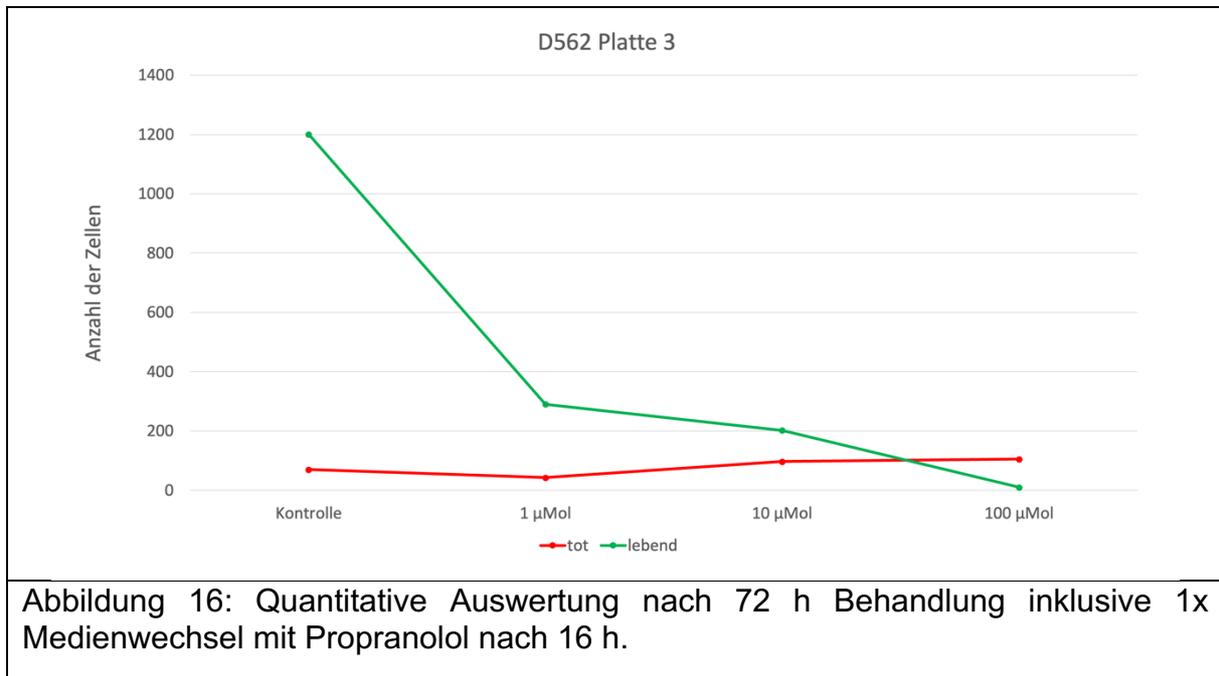


Die quantitative Auswertung in Abbildung 14 zeigt sehr deutlich den Effekt von Propranolol ab einer Konzentration von 1 μM nach 16 h Propranolol-Behandlung mit 54 h Nachkultur ohne Propranolol. Die Zahl lebender Zellen nahm ab dieser Konzentration deutlich ab. Ab 10 μM war hingegen eine erhöhte Anzahl verbleibender toter Zellen in den Wells zu beobachten.



Im dritten Versuchsaufbau wollten wir herausfinden, wie sich eine durchgehende Behandlung mit den jeweiligen Konzentrationen Propranolol für 72 h (inklusive 1 x Medienwechsel mit Propranolol) auf das Überleben der HNC-Zellen auswirkt. Wie in Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13 und Abbildung 14 dargestellt, zeigt auch die durchgehend 72-stündige Behandlung mit Propranolol, dargestellt in Abbildung **15**, dass erst ab einer Konzentration von 1 µM eine Veränderung der Zahl lebender Zellen beobachtet werden kann. Die Morphologie und das Wachstumsmuster bleiben bis zu dieser Konzentration unverändert. Ab 10 µM waren die Zellverbände aufgelöst und

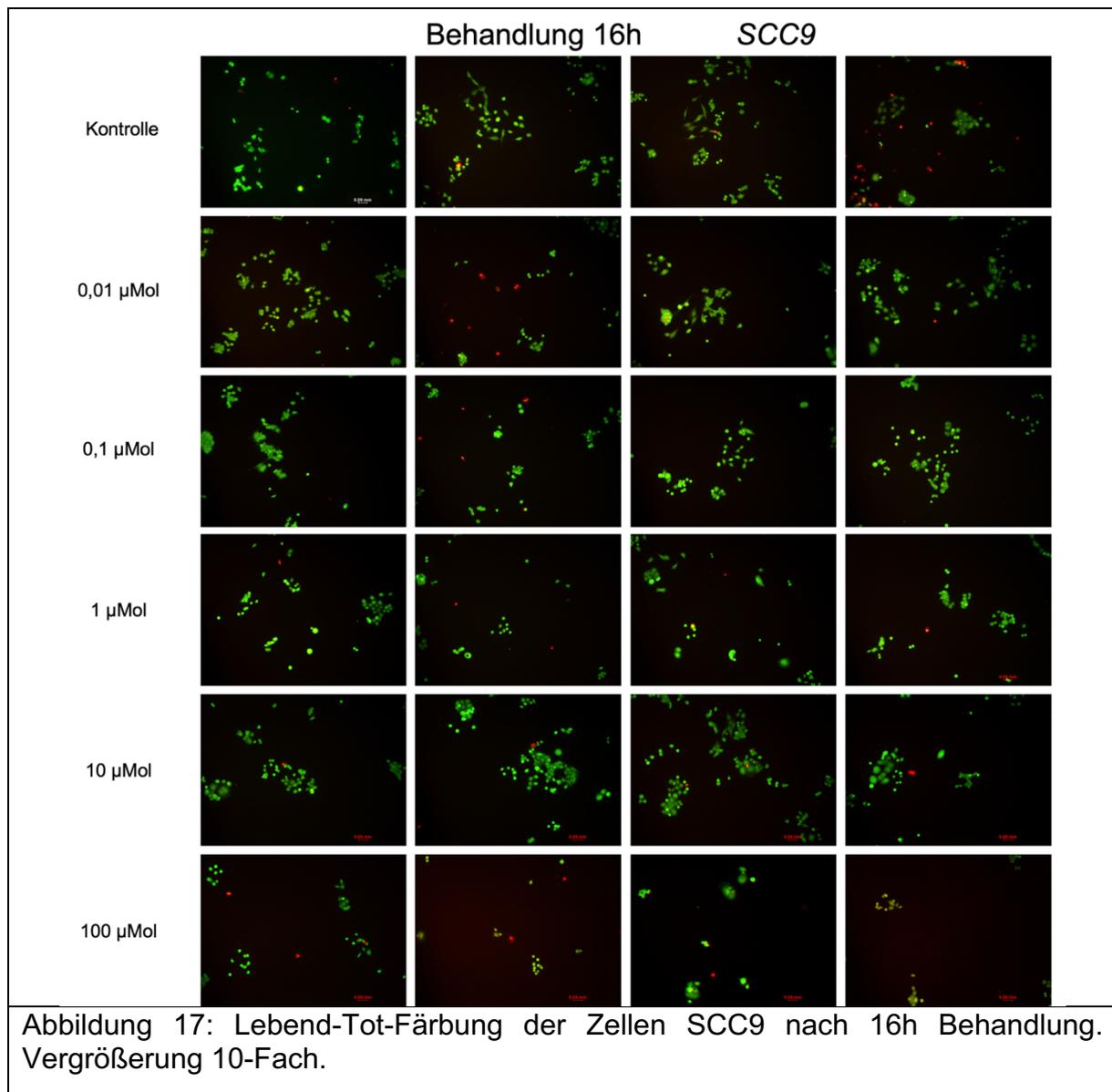
Zellen nur noch vereinzelt sichtbar. Bei einer Konzentration von 100 μM sind in Abbildung 15 fast ausschließlich sterbende Zellen zu erkennen.



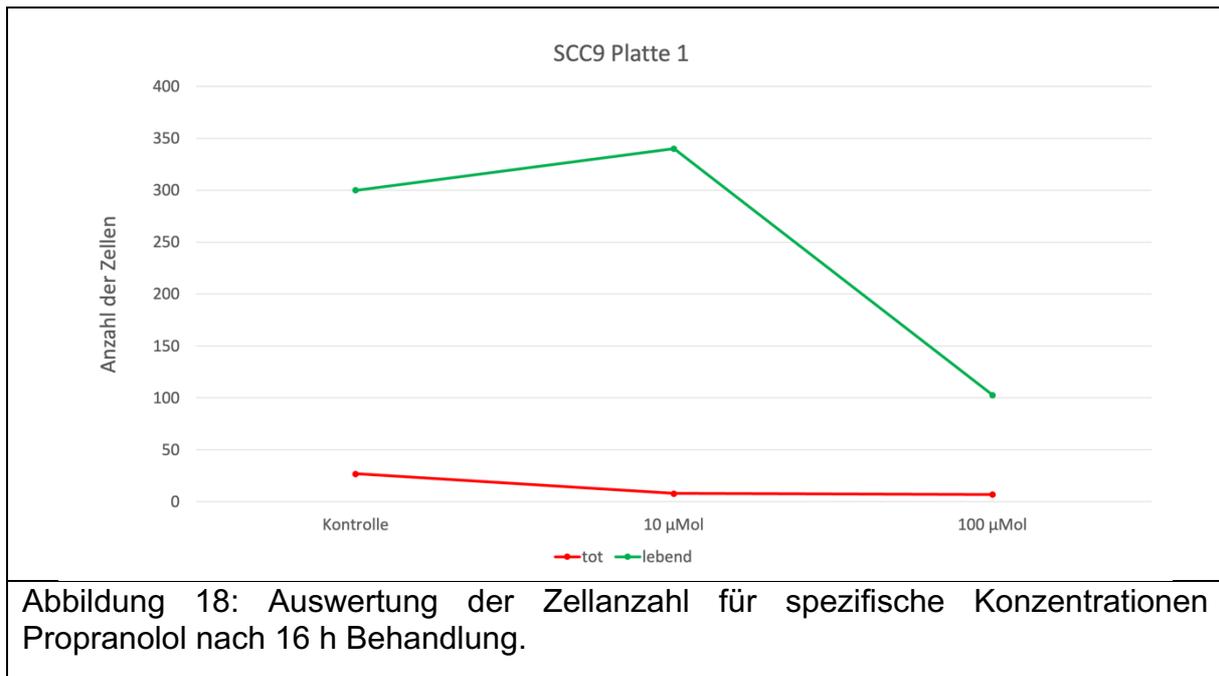
Die Auswertung in Abbildung 16 zeigt einen starken Rückgang der lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle ab einer Konzentration von 1 μM . Tote Zellen fanden sich vermehrt ab 10 μM . Bei 100 μM fanden sich mehr Tote als lebende Zellen. Es kann hierbei von einem starken Effekt des Propranolols ab einer Konzentration von 1 μM ausgegangen werden.

Die anschließenden Auswertungen der Zelllinien SCC9 und A253 wurden in der gleichen Weise durchgeführt.

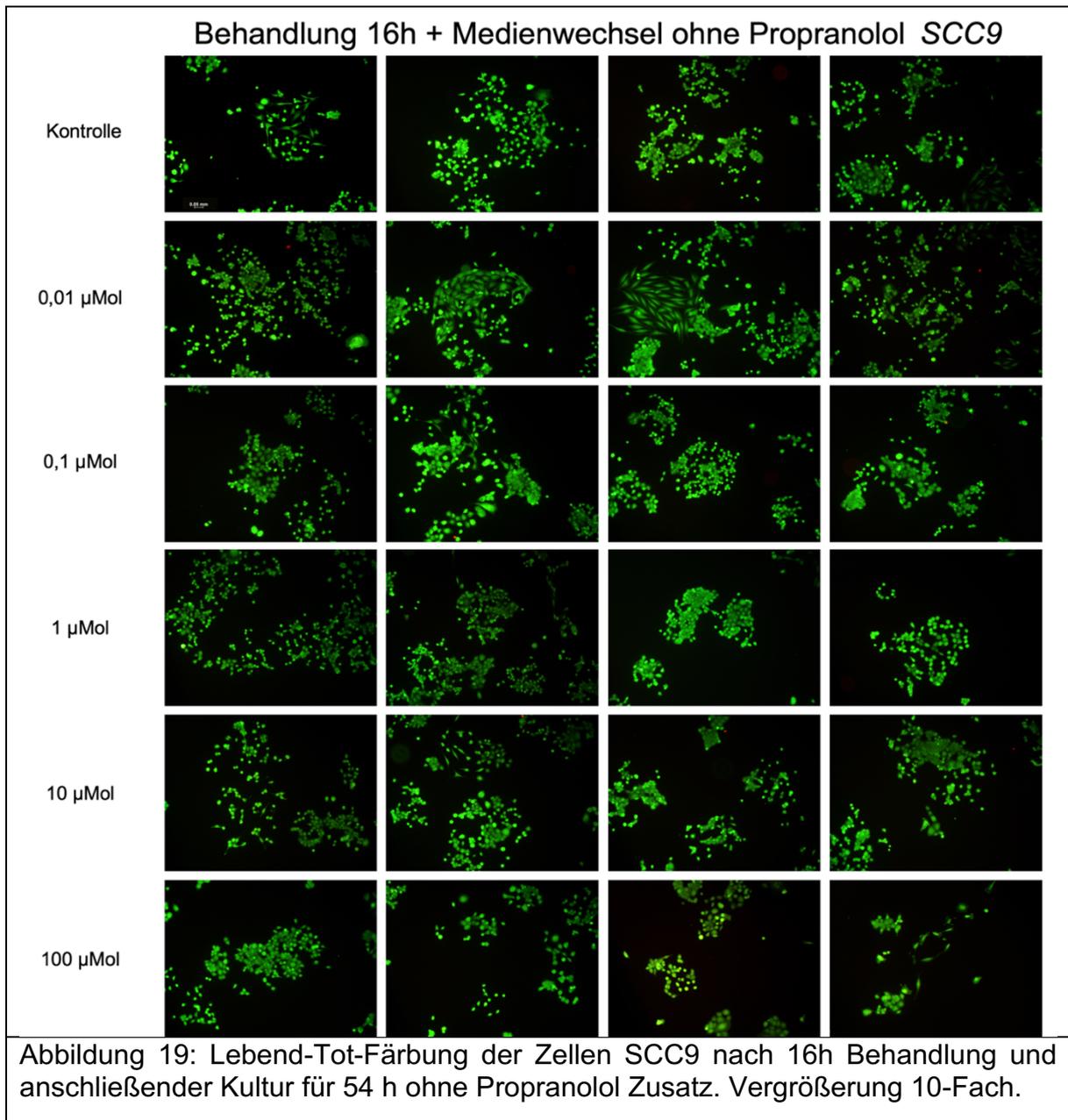
4.1.3 Einfluss der Konzentration und Einwirkdauer von Propranolol auf Zellen der Linie SCC9



Das Wachstum der Zellen in Abbildung 17 ist nach 16 h Behandlung bis zu einer Konzentration von 10 µM gleich stark ausgeprägt. In allen Proben sind vereinzelt tote Zellen zu erkennen. Ein Effekt auf das Wachstum der Zellen durch Propranolol stellt sich ab einer Konzentration von 100 µM dar. Die Zellen wuchsen in diesen Proben nicht so zahlreich wie in den restlichen Proben. Die quantitative Auswertung in Abbildung 18 bestätigt dies.



Im Diagramm zur quantitativen Auswertung lässt sich ablesen, dass die toten Zellen bei den ausgezählten Proben auf einem niedrigen Niveau bleiben, während die Anzahl der lebenden Zellen bis zu einer Konzentration von 10 µM leicht ansteigen und mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 100 µM deutlich abnehmen (Abbildung 18).



Man erkennt in Abbildung 19 nach 72 h ein ähnliches Wachstumsmuster bis zu einer Konzentration von 10 µM Propranolol, unabhängig der eingesetzten initialen Konzentration. Die höchste eingesetzte Konzentration von 100 µM schien einen bleibenden Effekt auf die Zellen und deren Wachstum zu haben. Wo anfänglich nach 16 h eine reduzierte Anzahl an lebenden Zellen zu erkennen war (Abbildung 17), ist nach Medienwechsel und weiterer Inkubation nur eine geringe Erholung zu sehen.

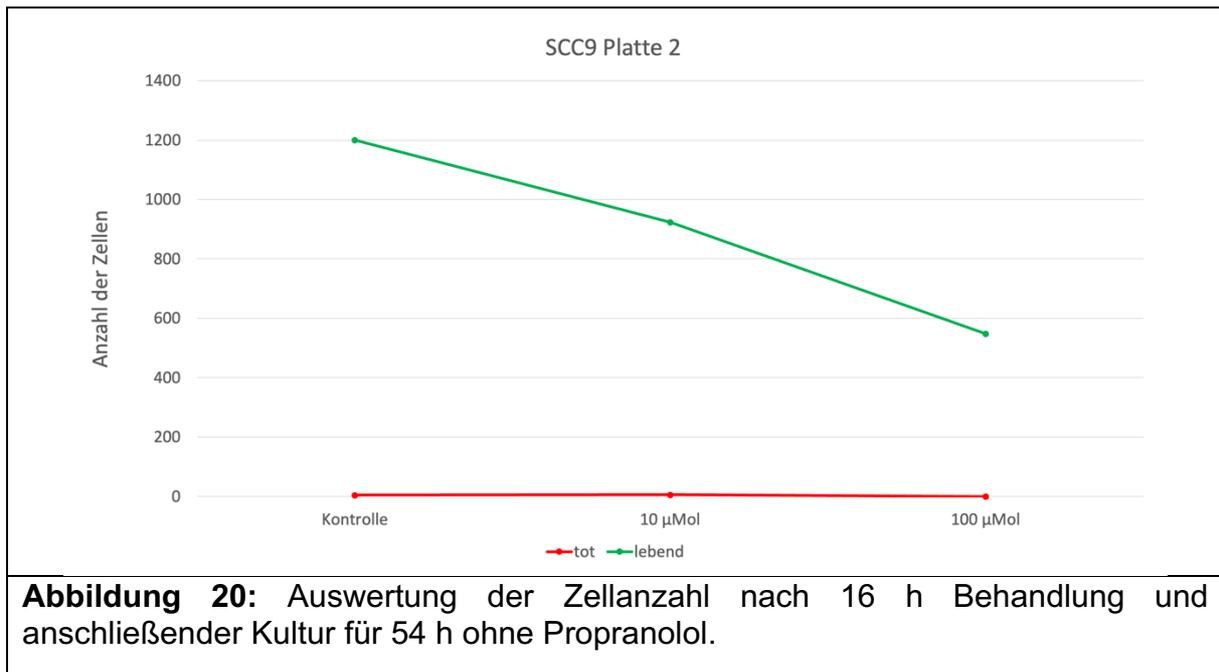
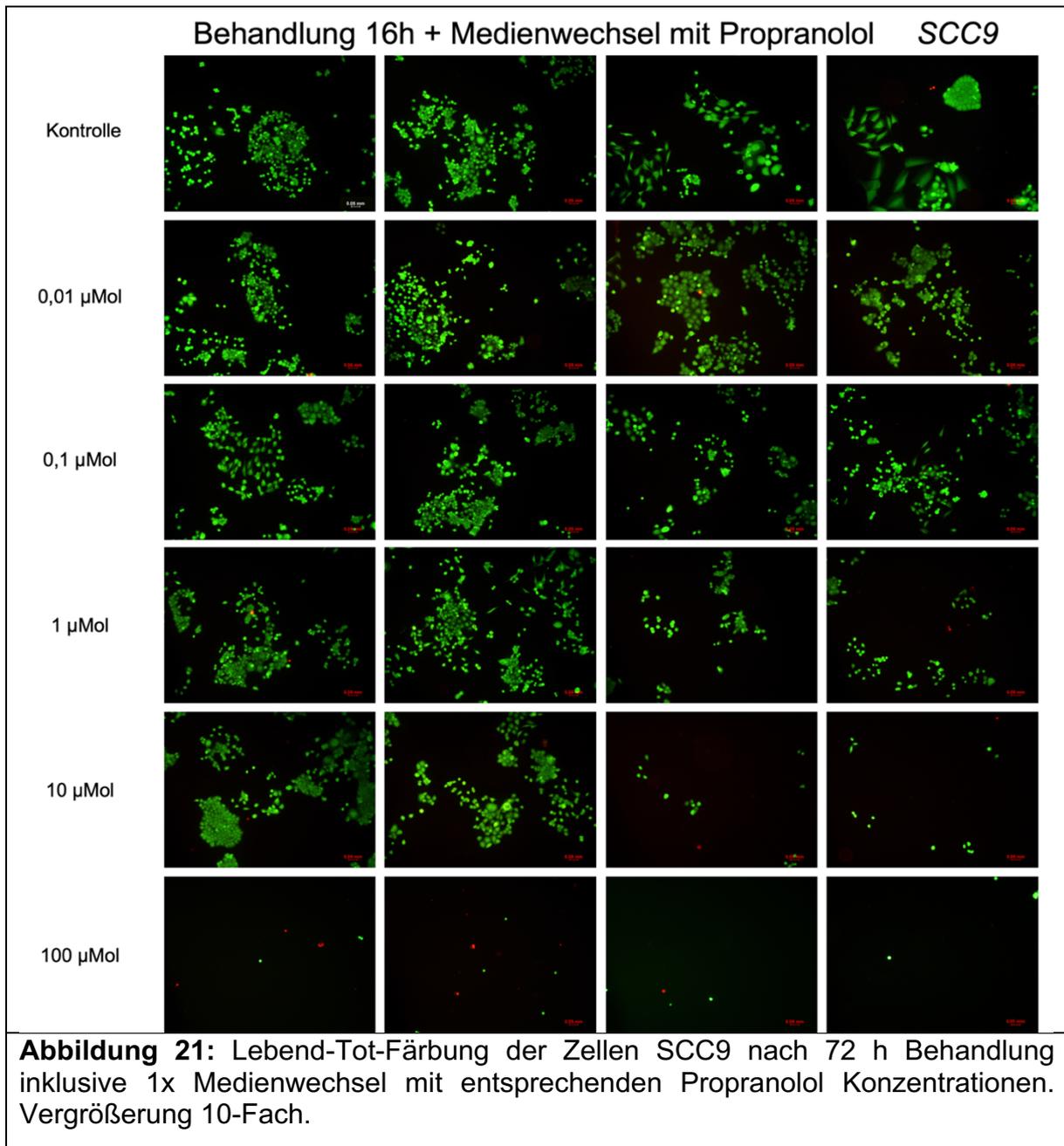


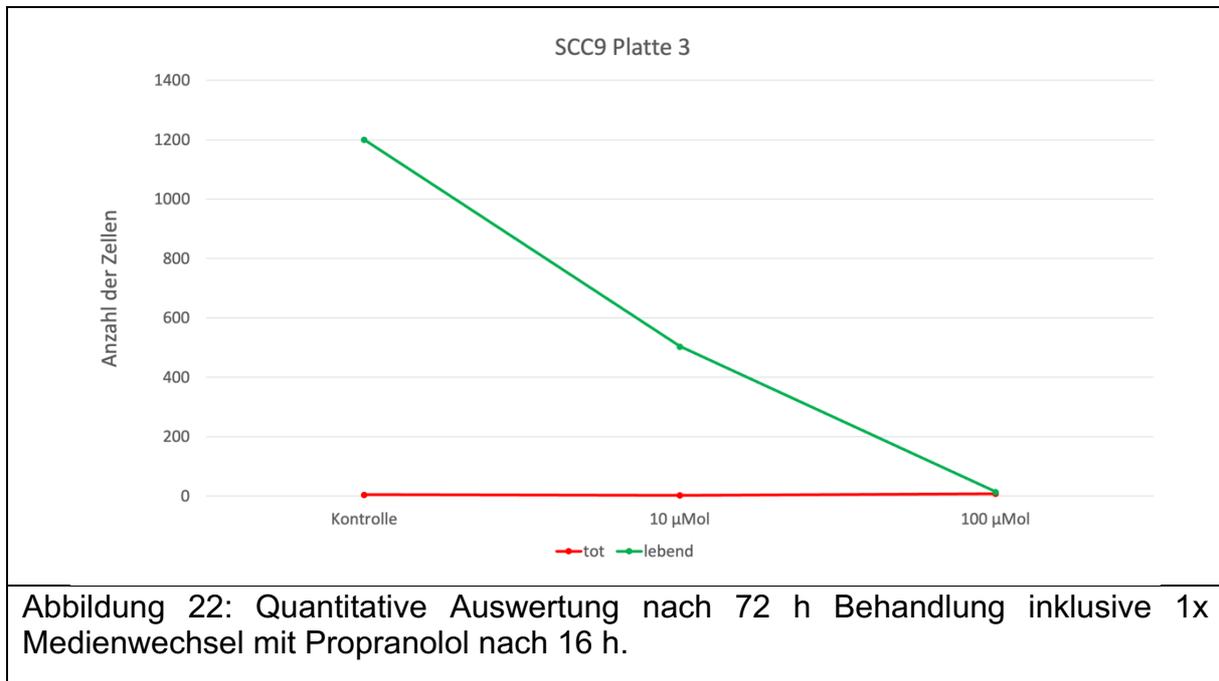
Abbildung 20: Auswertung der Zellanzahl nach 16 h Behandlung und anschließender Kultur für 54 h ohne Propranolol.

Die Analyse nach Zellzählung in Abbildung 20 zeigt, anders als es den Anschein in Abbildung 19 machte, dass es zu einem Abfall der Zellanzahl ab einer Konzentration von 10 µM kommt. Dieser Effekt verstärkt sich mit jeder höheren Konzentration, die gewählt wurde. Die toten Zellen bewegen sich auf einem niedrigen Niveau. Die initiale Behandlung mit Propranolol für 16 h hat scheinbar einen deutlichen Effekt auf die getesteten Zellen. Selbst wenn man das Agens aus dem Kulturmedium nimmt und den Zellen ein ungestörtes Wachstum ermöglicht.



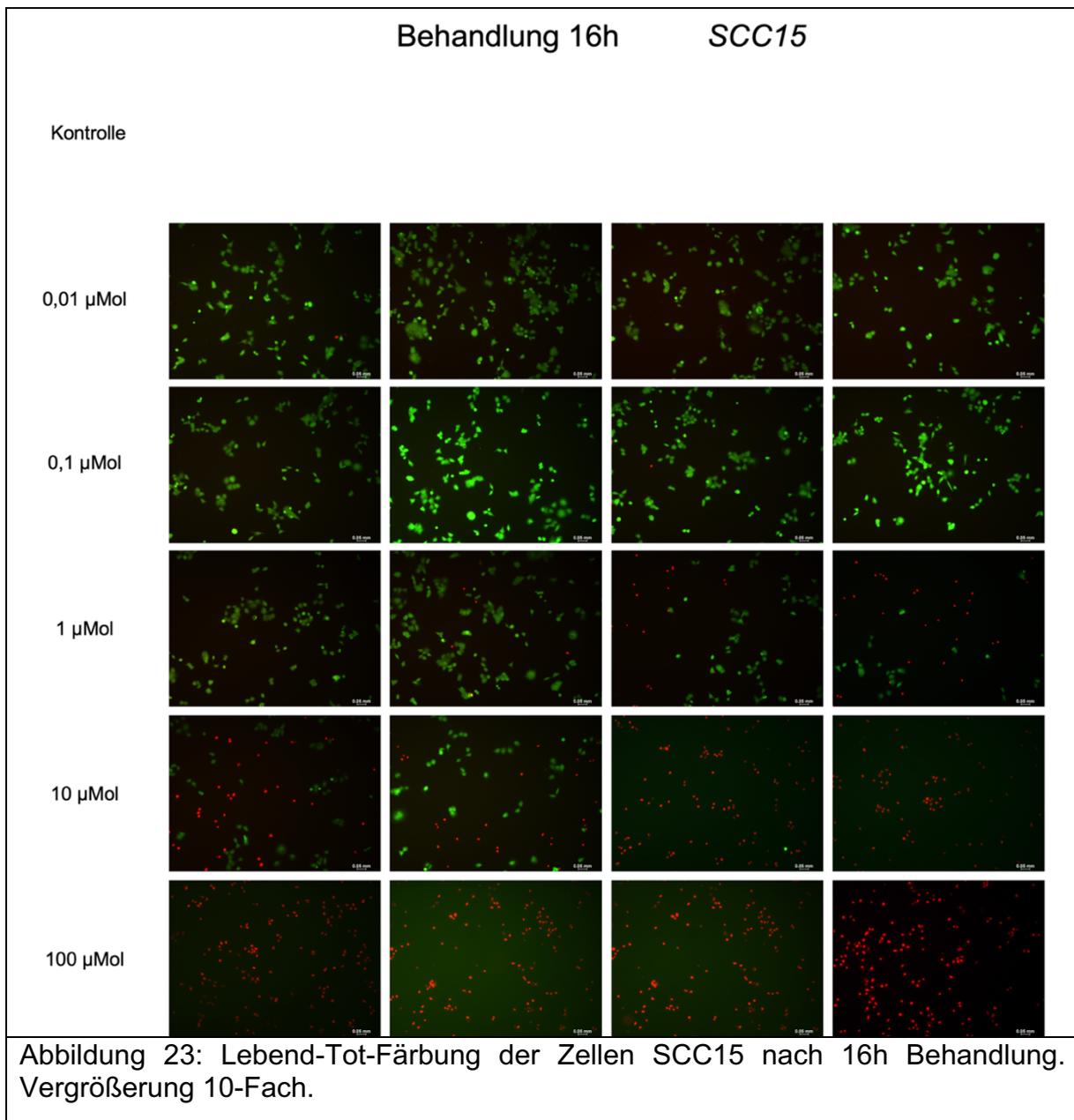
Im Vergleich mit den Abbildung 17 und Abbildung 19 sieht man in Abbildung 21 einen deutlich verstärkten Effekt durch die Behandlung mit Propranolol ab einer Konzentration von 1 µM. Das Einwirken von Propranolol über einen Zeitraum von 72 h führte zu einer Reduktion des Zellwachstums. In den Proben, die mit einer Konzentration von 1 µM behandelt wurden, zeigt sich eine Abnahme der Zellanzahl. Dies ist noch deutlicher ab einer Konzentration von 10 µM. In den Proben, die mit der

höchsten Konzentration von 100 μM behandelt wurden, sind nur noch einzelne lebende und tote Zellen dargestellt.



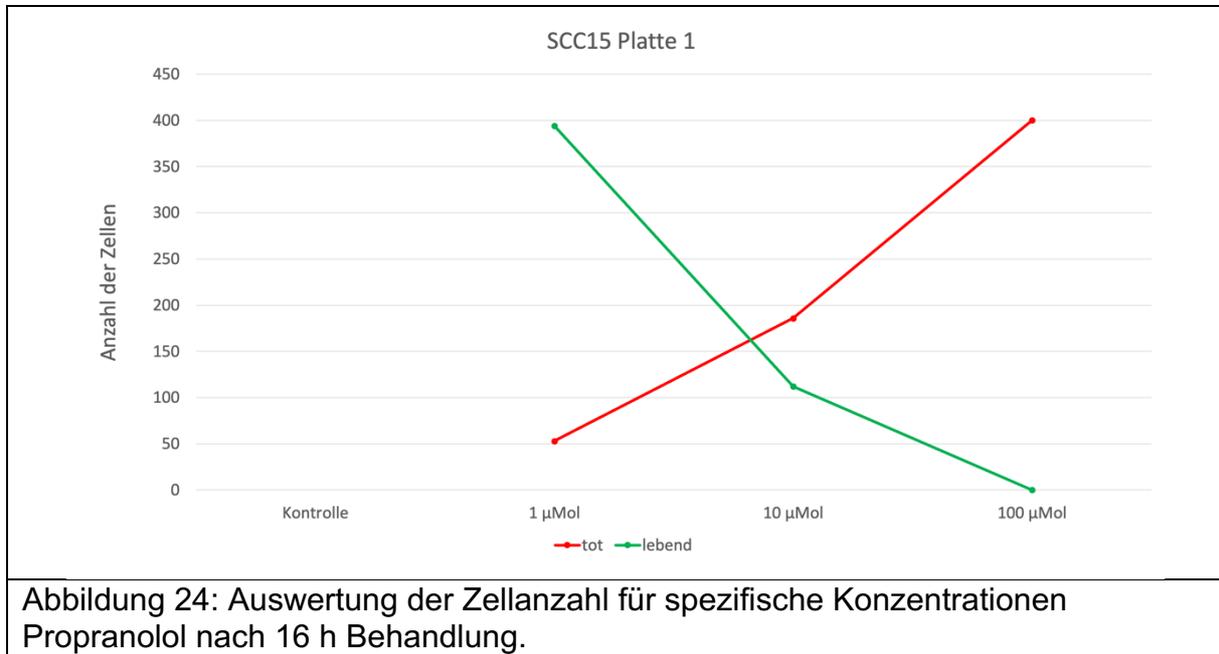
Die Zellzählung in Abbildung 22 bestätigt die sichtbare Abnahme des Wachstums der Zellen. Man kann im Diagramm erkennen, dass das Wachstum der Zellen mit hohen Konzentrationen weniger wird und nach 72 h bei 100 μM eingesetzter Konzentration fast gänzlich zum Erliegen kommt. Im vorliegenden Versuch konnte eindrücklich gezeigt werden, dass Propranolol einen großen Einfluss auf die Zellen der Reihe SCC9 hat. Mit jeder Verschärfung der Versuchsanordnung konnte ein geringeres Wachstum generiert werden. Hier ist ein vielversprechender Ansatz für weitere Forschung zu sehen.

4.1.4 Einfluss der Konzentration und Einwirkdauer von Propranolol auf Zellen der Linie SCC15



In Abbildung 23 gibt es keine Bilder der Kontrolle. Eine Konzentration von 0,01 wie auch 0,1 μM schien den Proben nichts anzuhaben. Hier wurde das Zellwachstum nicht beeinflusst. Ab 1 μM kann man Veränderungen im Wachstum der Zellen erkennen. Es sind zahlenmäßig weniger Zellen zu sehen. Ebenfalls stieg die Zahl an toten Zellen in diesen Proben an. Bei einer Konzentration von 10 μM sind mehr tote als lebende Zellen in der Probe auszumachen. Hier scheint ein deutlicher Effekt des Propranolols

einzutreten. Bei einer Konzentration von 100 μM ist der Effekt so stark, dass nur noch tote Zellen in den Wells zu erkennen sind. Man erkennt bei Konzentrationen oberhalb von 1 μM bereits nach 16 h deutliche Effekte.

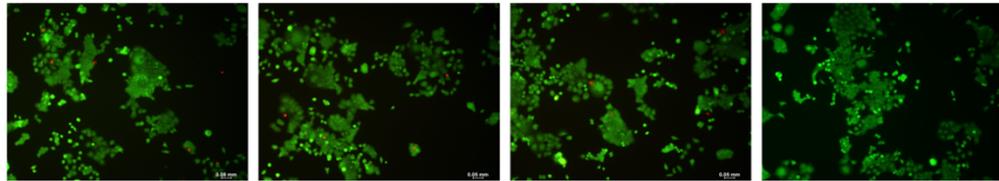


Die graphische Analyse der Zellanzahl in Abbildung 24 bestätigt, was Abbildung 23 bereits vermuten ließ, quantitativ. Ab einer Konzentration von 1 μM beginnt sich das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen umzukehren, bis in der letzten Probe bei 100 μM keine lebenden Zellen mehr anzutreffen waren, während die Anzahl der toten Zellen das Niveau der ursprünglich lebenden Zellen erreicht.

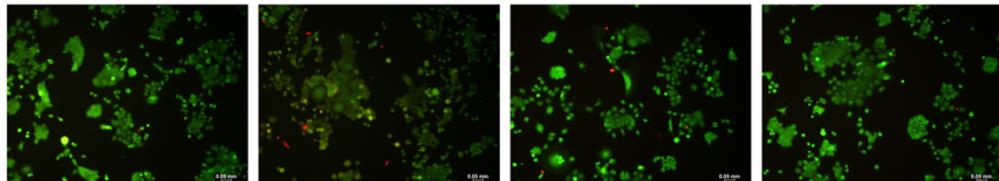
Behandlung 16h + Medienwechsel ohne Propranolol SCC15

Kontrolle

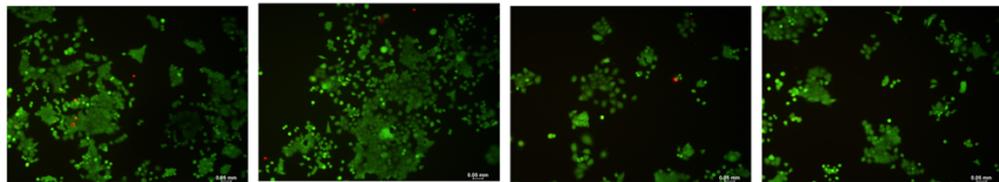
0,01 μ Mol



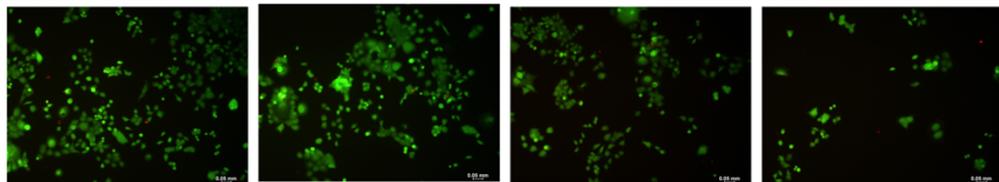
0,1 μ Mol



1 μ Mol



10 μ Mol



100 μ Mol

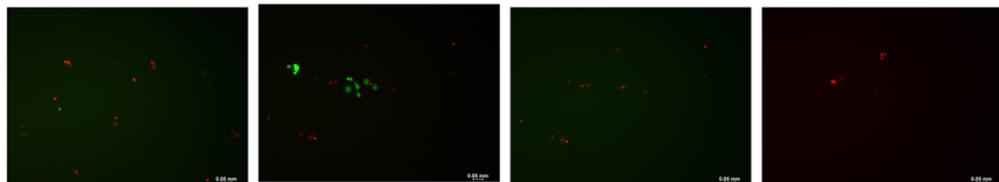
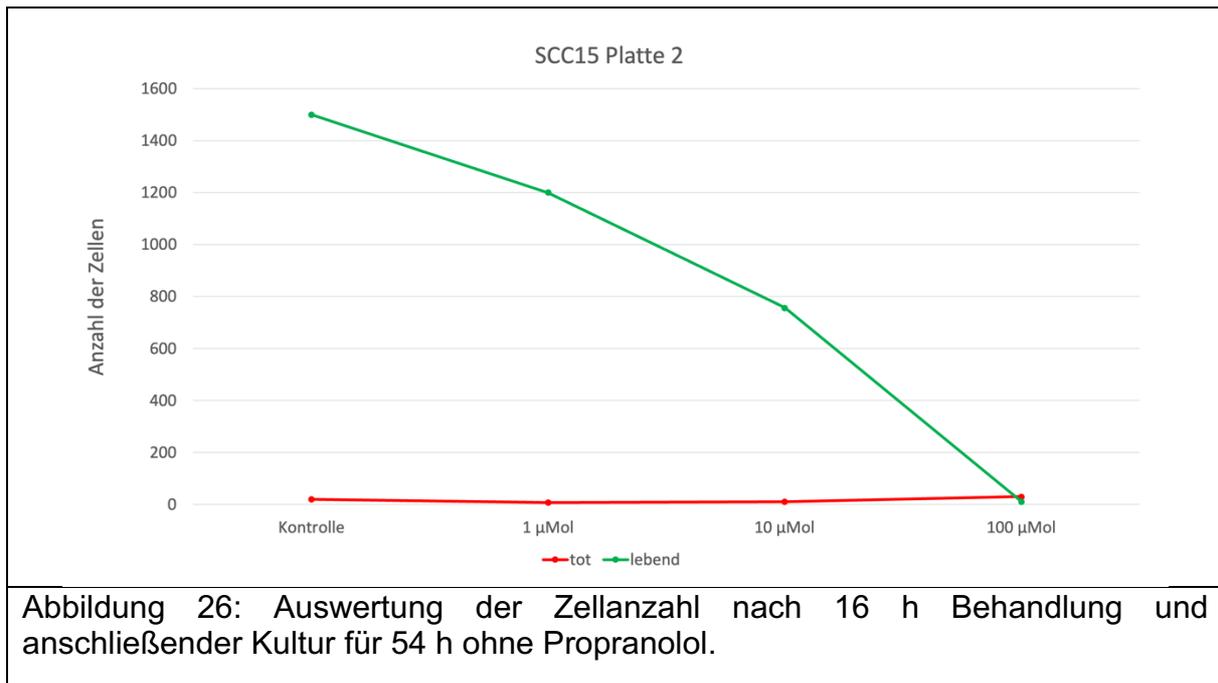
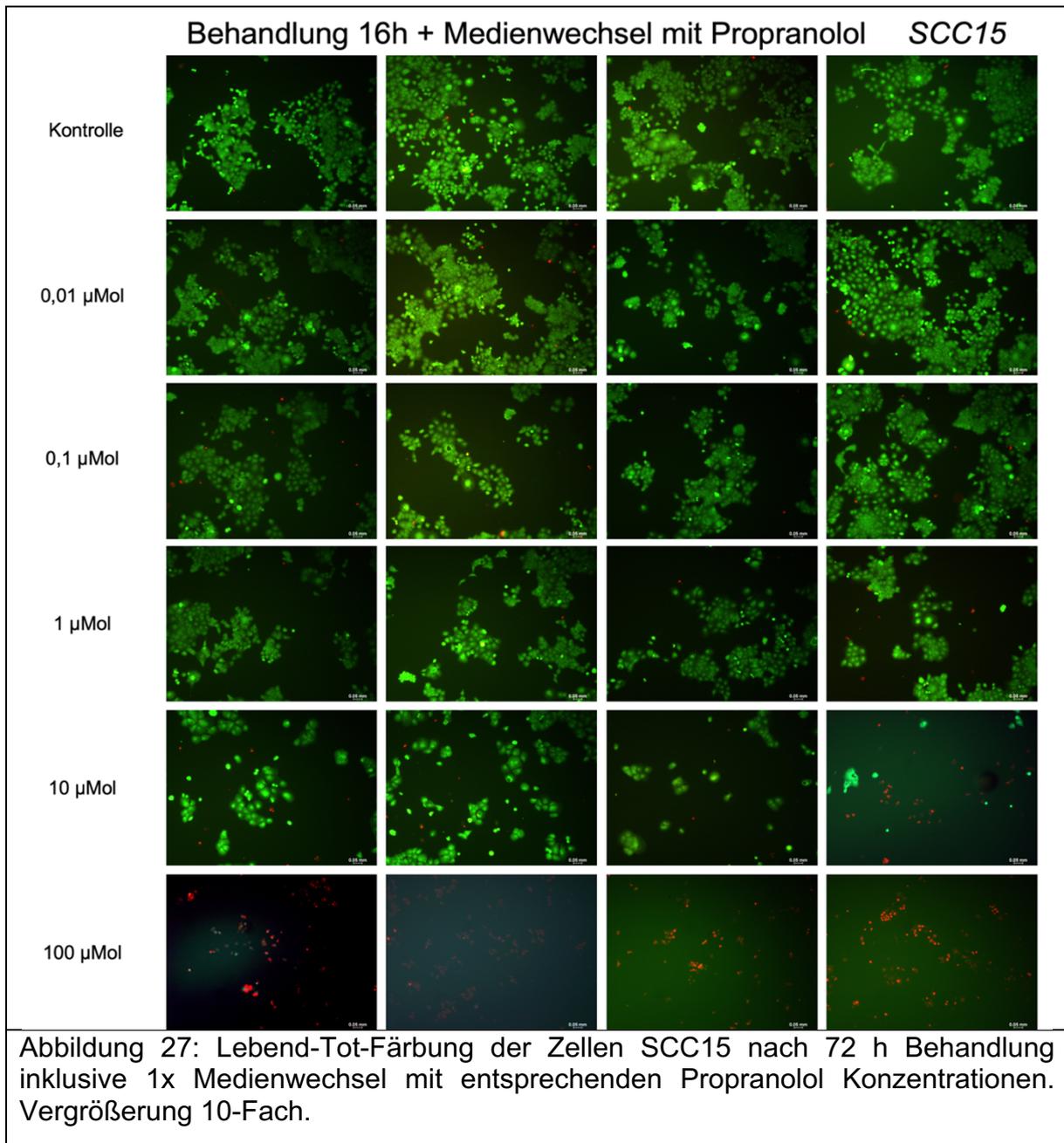


Abbildung 25: Lebend-Tot-Färbung der Zellen SCC15 nach 16h Behandlung und anschließender Kultur für 54 h ohne Propranolol Zusatz. Die Kontrolle fehlt. Vergrößerung 10-Fach.

Nimmt man den Einfluss der verschiedenen Konzentrationen Propranolol und kultiviert die Zellen in reinem Nährmedium, zeigt Abbildung 25, dass der wachstumshemmende Effekt nach 16 h Einwirkdauer teilweise von den Zellen kompensiert werden kann. Bis zu einer Konzentration von 10 μ M ist zu erkennen, wie sich die Zellen neu in Verbänden organisieren und ein zellübliches Wachstum zeigen. Lediglich bei den Proben, die zuvor mit 100 μ M behandelt wurden, ist keine Erholung zu erkennen. Es sind vermehrt tote Zellen zu erkennen, nur vereinzelt lebende.



Die Auswertung in Abbildung 26 zeigt einen bleibenden hemmenden Effekt auf die Anzahl der lebenden Zellen. Die Anzahl der lebenden Zellen ist bei den Proben, die mit 1 µM behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle um 20 % reduziert. Je höher die zuvor einwirkende Konzentration war, desto weniger lebende Zellen finden sich nach Kultivierung für 54 h ohne Zusatz des Agens in den Proben. Weitere Versuche sollten untersuchen, ob sich die Werte mit der Dauer der Abwesenheit von Propranolol wieder auf einem ähnlichen Niveau einpendeln.



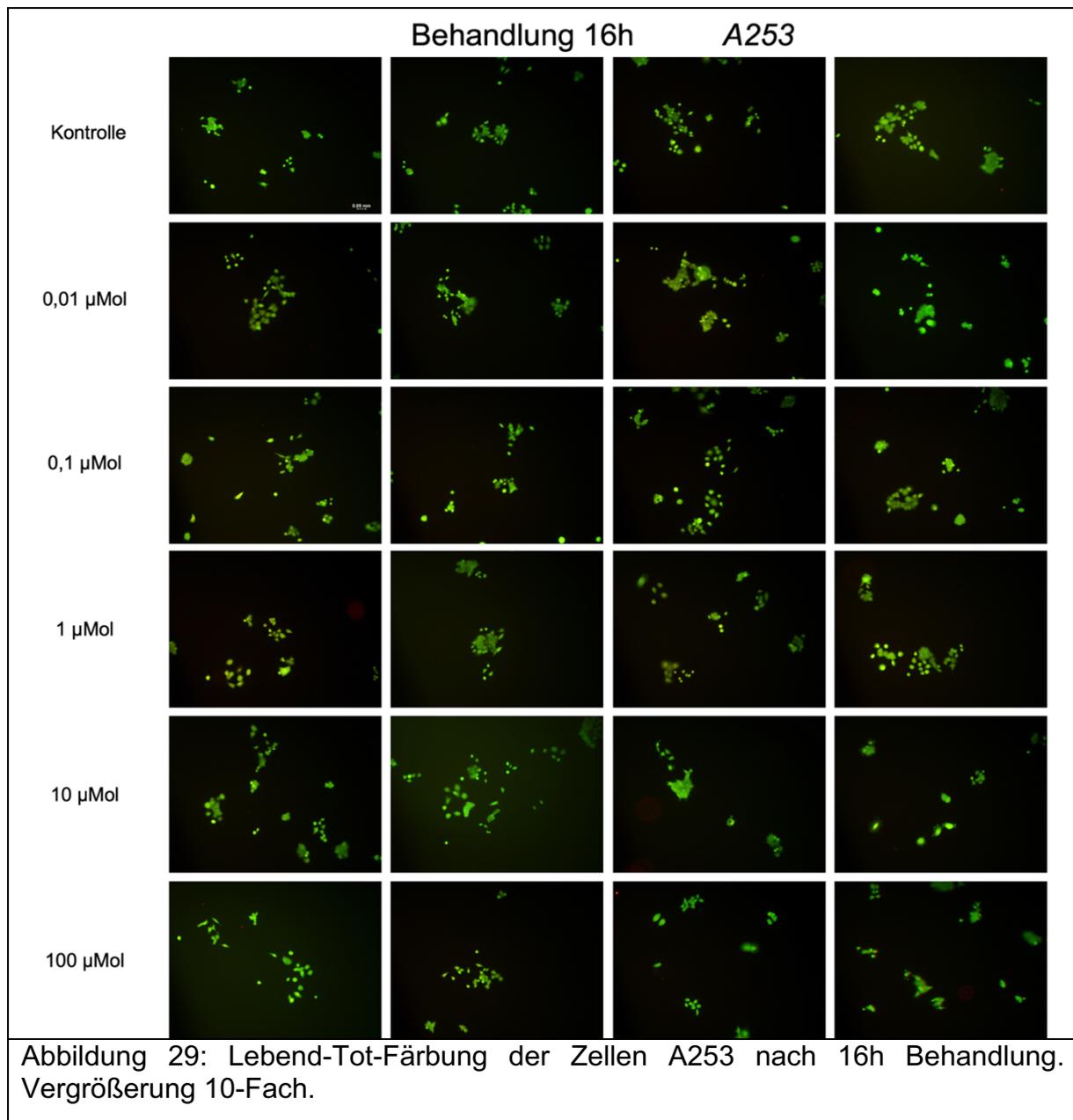
Wirkt Propranolol für 72 h auf die Zellen ein, ist in Abbildung 27 zu erkennen, dass ab einer Konzentration von 1 µM ein hemmender Einfluss auf das Wachstum deutlich wird. Die Proben, die mit 1 µM inkubiert wurden, zeigen ein reduziertes Wachstum mit Blick auf die Zellzahl. Wenige tote Zellen sind neben Lebenden zu erkennen. Besonders stark war die Reduktion der Zellanzahl bei Konzentrationen von 10 µM. Die Zellen können hier keine großen Zellverbände ausbilden. Tote Zellen sind vermehrt neben Lebenden anzutreffen. Die Wirkung von 100 µM führte zu einem Absterben der Zellen. Es sind keine lebenden Zellen vorhanden.



Abbildung 28: Quantitative Auswertung nach 72 h Behandlung inklusive 1x Medienwechsel mit Propranolol nach 16 h.

Die Quantifizierung in Abbildung 28 zeigt ein Zugrundegehen der Zellen mit jeder höher eingesetzten Konzentration. Der Niedergang der Zellanzahl ist hier fast linear zur Konzentration. Die Anzahl der toten Zellen steigt leicht ab einer Konzentration von 10 µM. Der Anstieg fällt bei 100 µM etwas steiler aus. Die Versuche zu den Zellen SCC15 zeigen, dass Propranolol bei diesen Zellen einen negativen Effekt auf das Wachstum ausüben kann, wenn Konzentrationen ab 1 µM genutzt werden. Bei längeren Inkubationszeiten konnten die hemmenden Effekte verstärkt beobachtet werden. Jedoch führt bereits die initiale Behandlung mit Propranolol zu sichtbaren und messbaren Auswirkungen beim Zellwachstum.

4.1.5 Einfluss der Konzentration und Einwirkdauer von Propranolol auf Zellen der Linie A253



Für die Zellen der Reihe A253 zeigt Abbildung 29 nach 16 h Behandlung mit Propranolol kaum Unterschiede im Wachstum. Lediglich in den Proben, welche mit 100 µM behandelt wurden, findet sich eine verringerte Anzahl an Zellen.

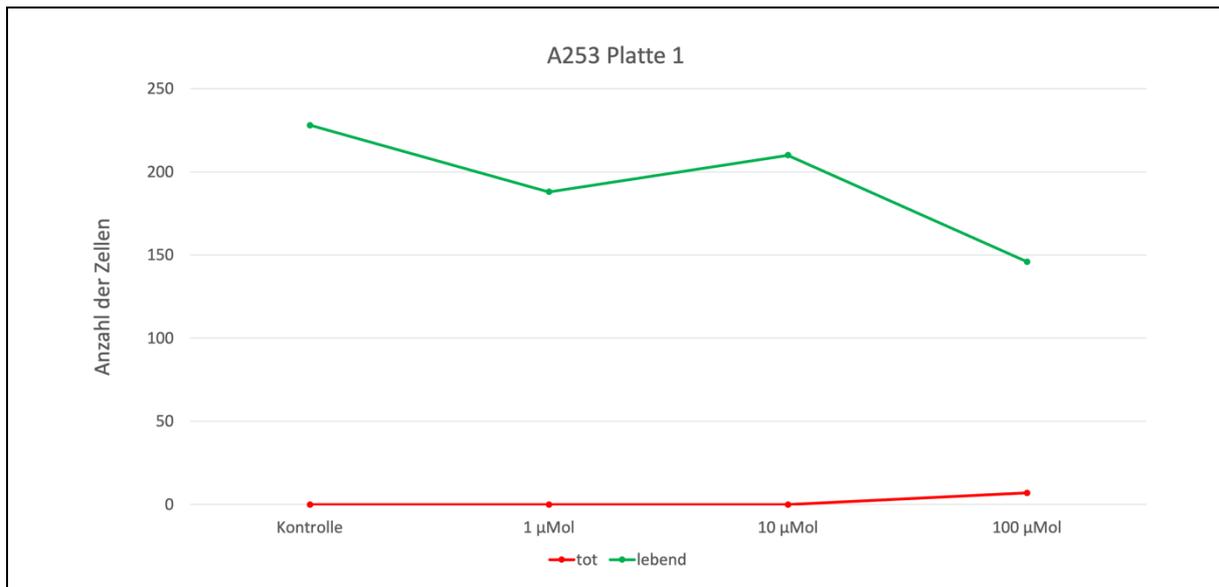
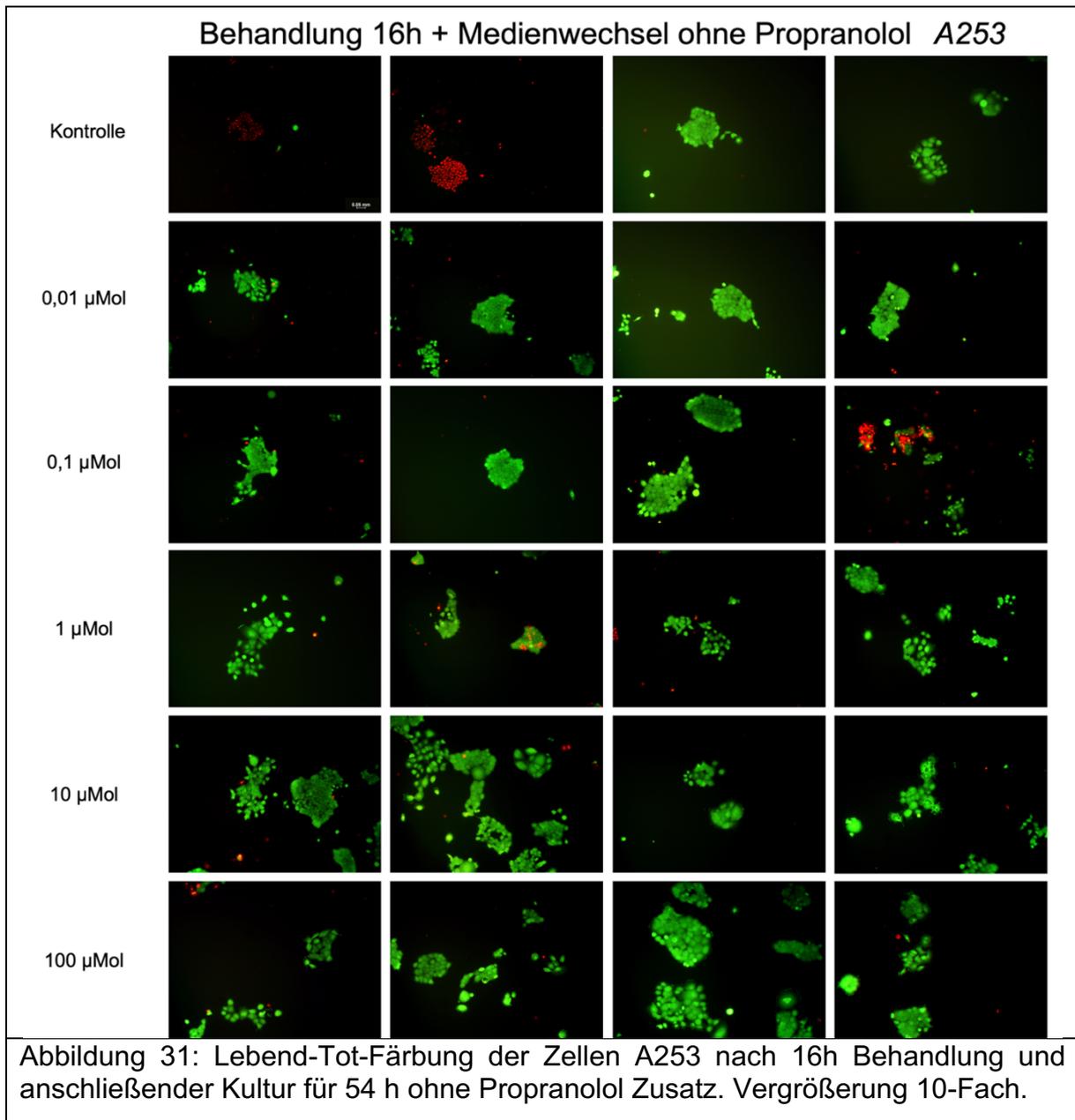


Abbildung 30: Auswertung der Zellanzahl für spezifische Konzentrationen Propranolol nach 16 h Behandlung.

Das Diagramm in Abbildung 30 zeigt die Graphen nach Zellzählung in allen Proben der jeweiligen Konzentration. Dort ist zu erkennen, dass sich die Zellen in Anzahl nur sehr geringfügig verändern. Die Anzahl der lebenden Zellen sinkt leicht bei Konzentrationen von 1 µM und bleibt auf konstantem Niveau bei 10 µM. In den mit 100 µM behandelten Proben sinkt der Wert weiter ab. Tote Zellen sind hier ebenfalls vereinzelt zu finden. In den Wells mit Konzentrationen von 10 µM und kleiner sind keine toten Zellen zu finden.



In der vorliegenden Abbildung 31 enthielten zwei Wells der Kontrolle zahlreiche abgestorbene Zellen. Da andere Zellen nach dieser Zeit im Medium ein gegenteiliges Bild zeigen, ist hier anzunehmen, dass die Proben im Laufe der Experimente kontaminiert wurden und ein Zugrundegehen der Zellen ausgelöst wurde. Eine Probe im Bereich der einwirkenden Konzentrationen von 0,1 µM zeigt das gleiche Bild von abgestorbenen Zellen. Hier wurde ebenfalls eine Kontamination vermutet, durch welche die Zellen zugrunde gingen. Klammert man diese Proben aus der Bewertung aus, ergibt sich ein Bild von Zellen, die keine negativen Effekte durch die

verschiedenen Konzentrationen Propranolol erlebten. Im Gegenteil wirkten die Proben, je höher die einwirkende Konzentration war, zellreicher. Es sind nur wenige tote Zellen in den Wells zu erkennen. Das Wachstum orientiert sich am üblichen Wachstum in Verbänden. Konzentrationen von 10 und 100 μM schienen einen fördernden Effekt auf das Wachstum zu haben.

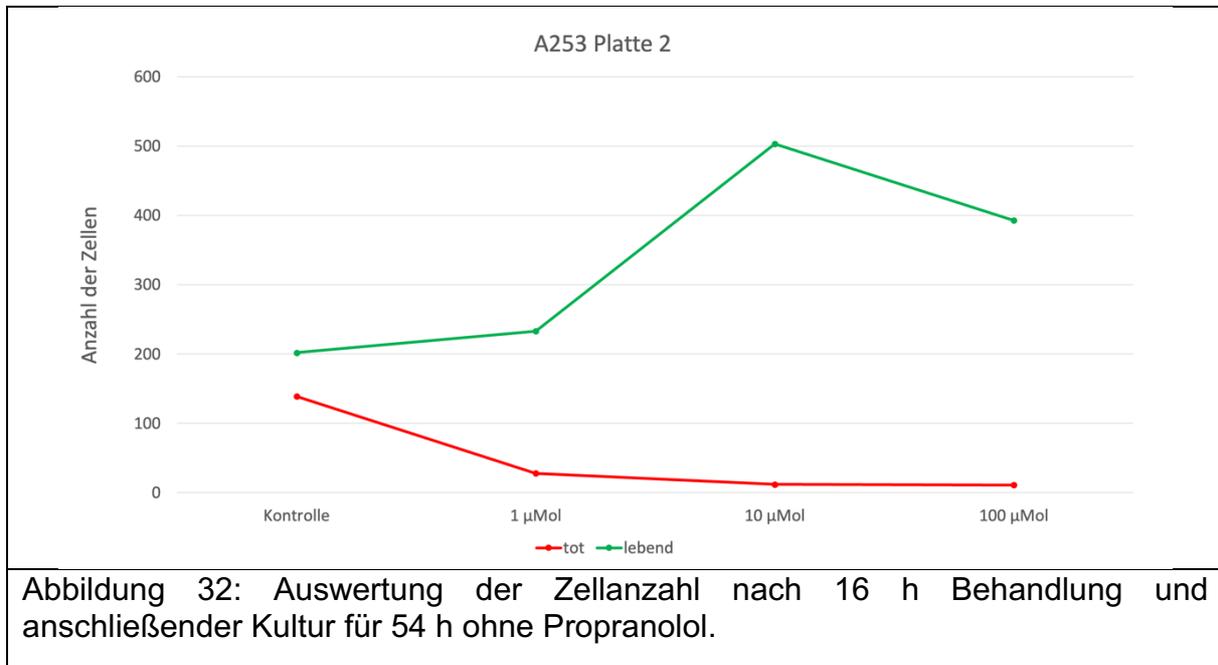
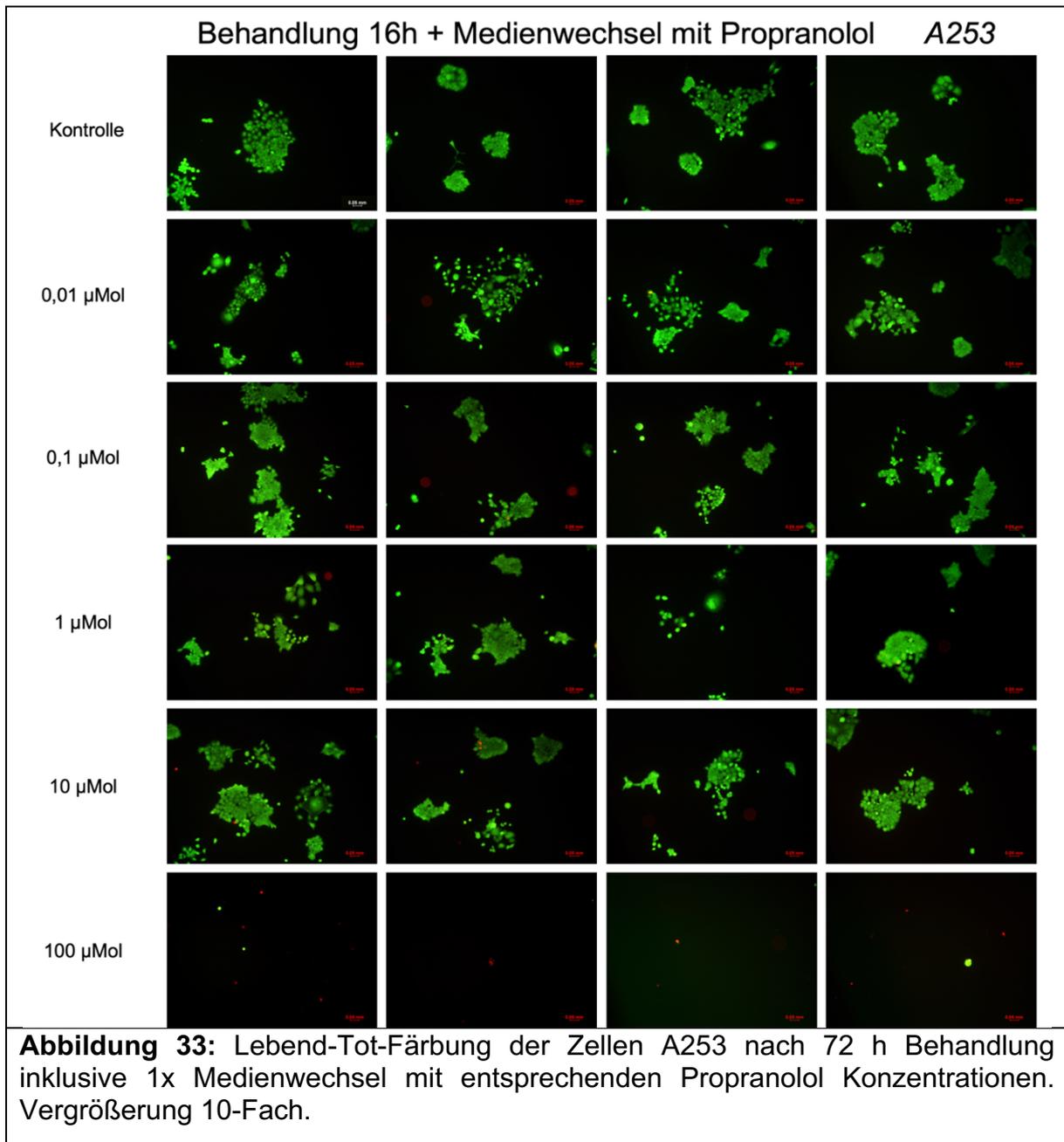


Abbildung 32 bestätigt, was in Abbildung 31 bereits vermutet wurde. Zum besseren Vergleich wurden die abgestorbenen Zellen aus der Kontrolle genommen und die Zählung der zwei Wells mit normalem Wachstum mit dem Faktor 2 multipliziert. Das Wachstum bewegt sich von der Kontrolle bis zu Konzentrationen von 1 μM auf niedrigem Niveau. Wie nach 16 h in Abbildung 29 bereits beobachtet werden konnte, können sich die Zellen bei 10 μM bestens vermehren und wachsen. Von diesem hohen Niveau sinkt die Anzahl an lebenden Zellen leicht bei Konzentrationen von 100 μM ab. Es sind in diesem Versuch keine anhaltenden negativen Effekte auf das Wachstum der Zellen festzustellen. Es konnte ein positiver Effekt auf das Wachstum der Zellen beobachtet werden, wenn initial eine hohe Konzentration Propranolol auf die Zellen einwirkte und diesen danach Zeit und Nährstoffe für das Wachstum gegeben wurden.



Lässt man die Konzentrationen länger als 16 h auf die Zellen der Reihe A253 einwirken, lässt sich ein Effekt auf das Wachstum beobachten (Abbildung 33). Konzentrationen von 0 – 10 µM hatten keinen Einfluss. Wachstum und Organisation der Zellen unterschieden sich nicht von der Kontrolle. Es sind mehrheitlich lebende Zellen in ähnlicher Anzahl wie in der Kontrolle zu finden. Jedoch war bei Konzentrationen von 100 µM kaum noch lebendes Zellmaterial in den Proben vorhanden. Tote Zellen waren in diesen Proben ebenfalls nur vereinzelt zu finden. Hier

schien der Effekt von Propranolol auf die Zellen so stark zu sein, dass die vorhandenen Zellen absterben und gleichzeitig ein Neuwachsen verhindert wurde.

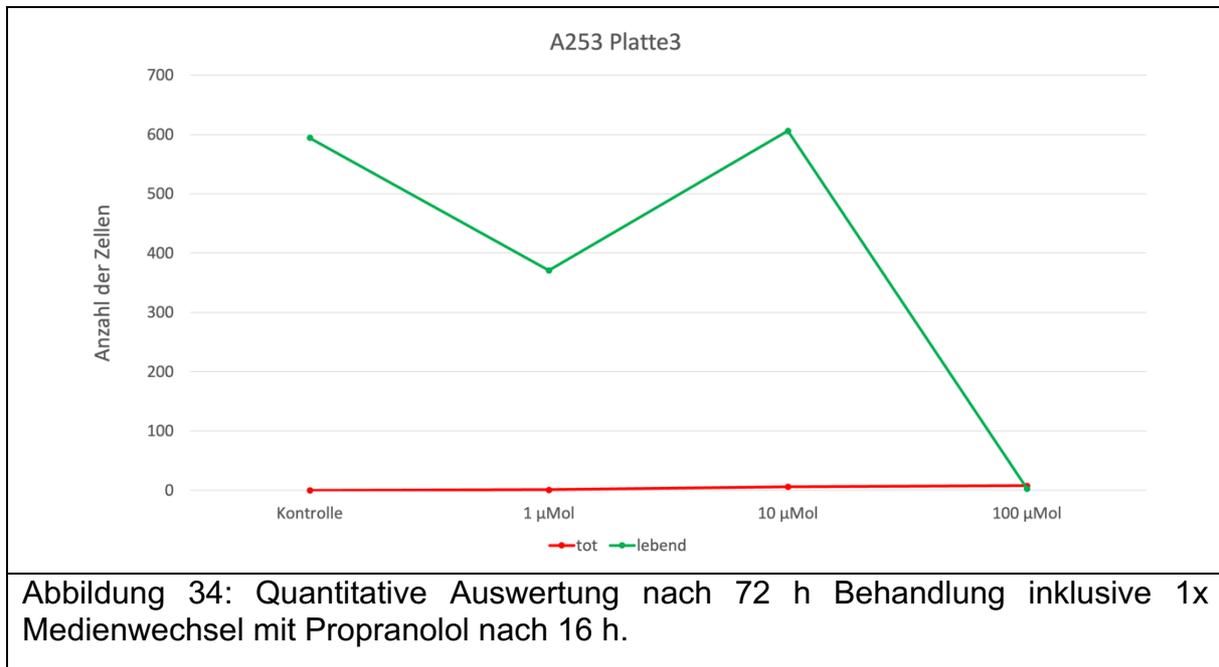


Abbildung 34 zeigt, dass die Zellanzahl in allen Proben bis zu einer Konzentration von 10 µM ähnlich hoch ist. Danach findet ein deutliches Zugrundegehen der Zellen statt. Die Anzahl der lebenden Zellen geht Richtung Null. Tote Zellen konnten in keiner Probe vermehrt gefunden werden. Für die Zellen A253 scheinen nur sehr hohe Konzentrationen Propranolol einen Einfluss, der das Wachstum bremst, nehmen zu können. Diese hohen Konzentrationen können ihren Einfluss nur ausüben, wenn die Einwirkdauer im Bereich von 72 h ist. Kurze Phasen des Einwirkens haben keinen negativen Effekt, eher einen fördernden.

4.1.6 Einfluss der Konzentration und Einwirkdauer von Propranolol auf Zellen der Linie FaDu

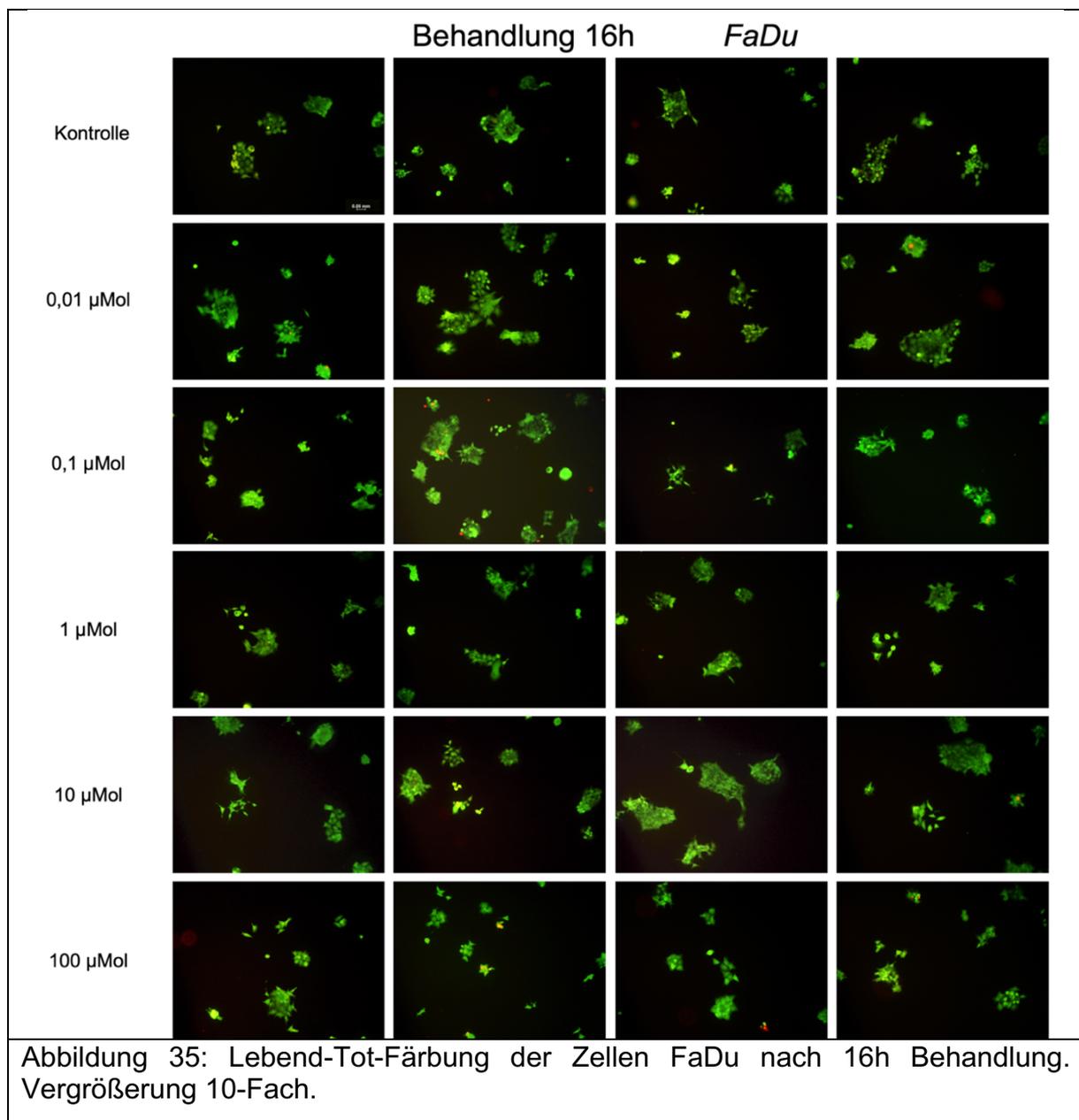


Abbildung 35 zeigt nach 16 h Einwirkzeit allen eingesetzten Konzentrationen keine Unterschiede in der Anzahl der Zellen und deren Wachstum. In jeder Probe ist das Organisieren der Zellen in Verbänden zu beobachten. Tote Zellen waren nur vereinzelt in den mit 100 µM inkubierten Proben festzustellen.

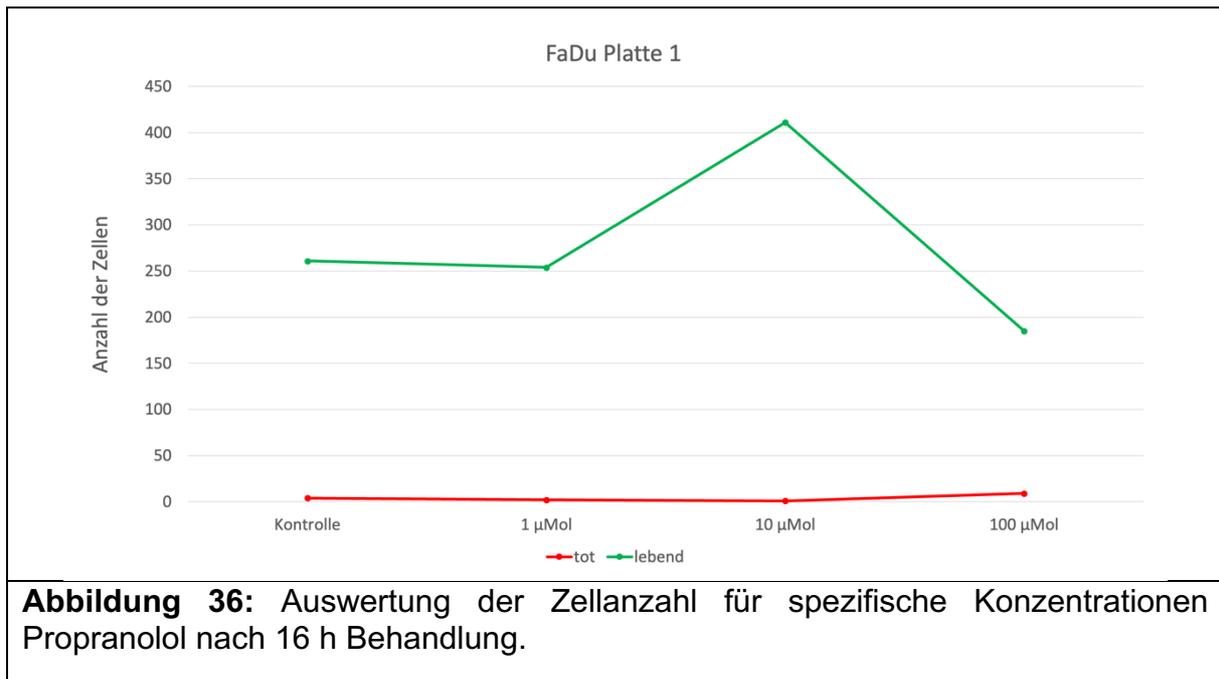


Abbildung 36: Auswertung der Zellanzahl für spezifische Konzentrationen Propranolol nach 16 h Behandlung.

In Abbildung 36 ist ein deutlicher Anstieg an lebenden Zellen bei 10 µM zu beobachten. Bei 100 µM waren wenige tote Zellen zählbar. Eventuell ist hier ein erster, minimal negativer Effekt auf das Wachstum der Zellen zu erkennen.

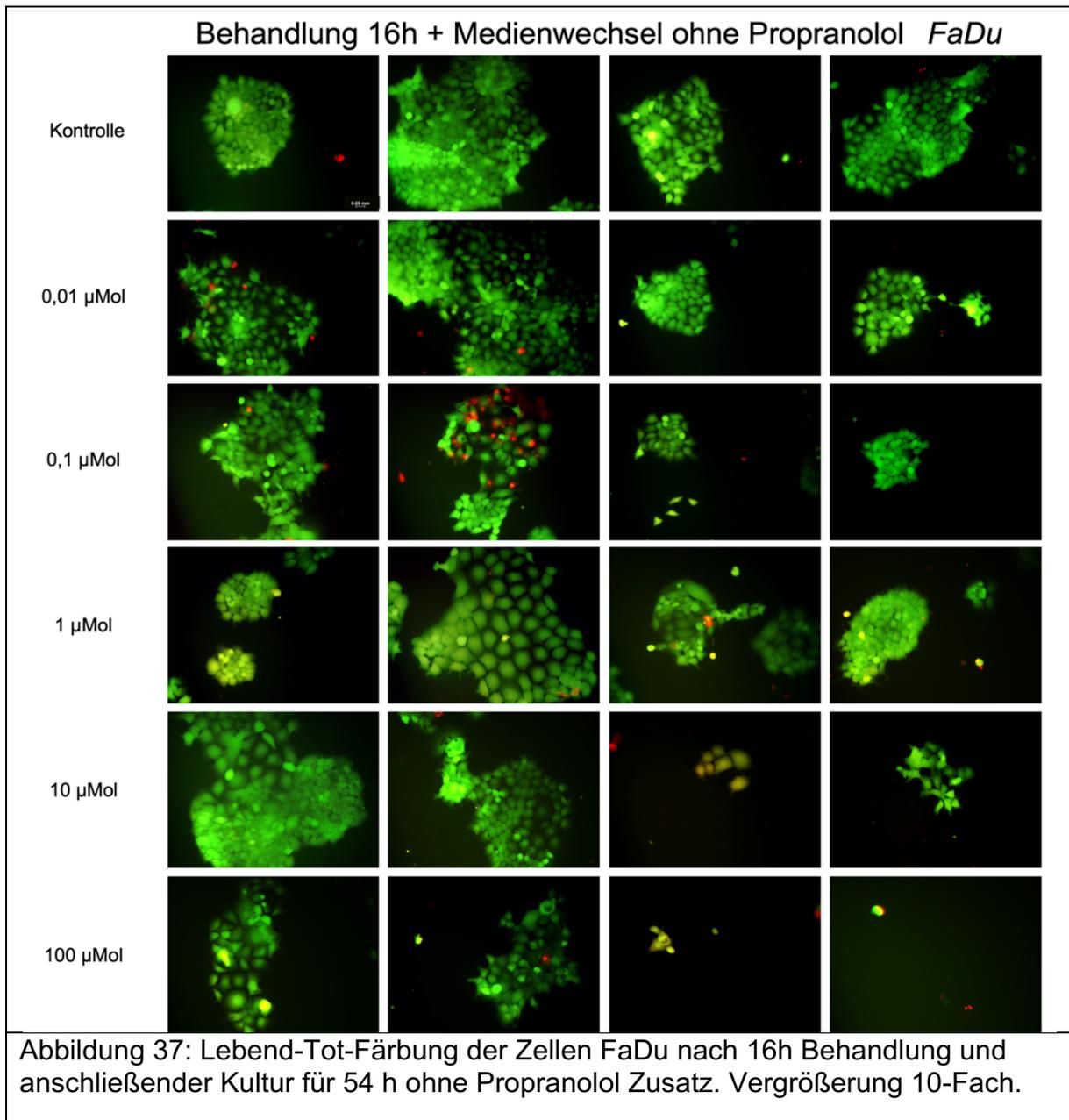


Abbildung 37 zeigt die Wells, die nach einer initialen Behandlung für 16 h mit Propranolol noch weitere 54 h ohne Propranolol inkubiert wurden. Es zeigte sich ein nachwirkender Einfluss auf die Zellen durch die anfängliche Konzentration von Propranolol ab 1 µM. Im Vergleich zur Kontrolle ist auf den Bildern bereits ein geringeres Wachstum bei der Behandlung mit 1 µM Propranolol zu erkennen. Die Zellen verändern ihre Morphologie und die Wachstumsmuster beginnen sich aufzulösen. Manche Zellen sind deutlich größer als in der Kontrolle. Tote Zellen waren in keiner der Proben in großer Anzahl zu erkennen.

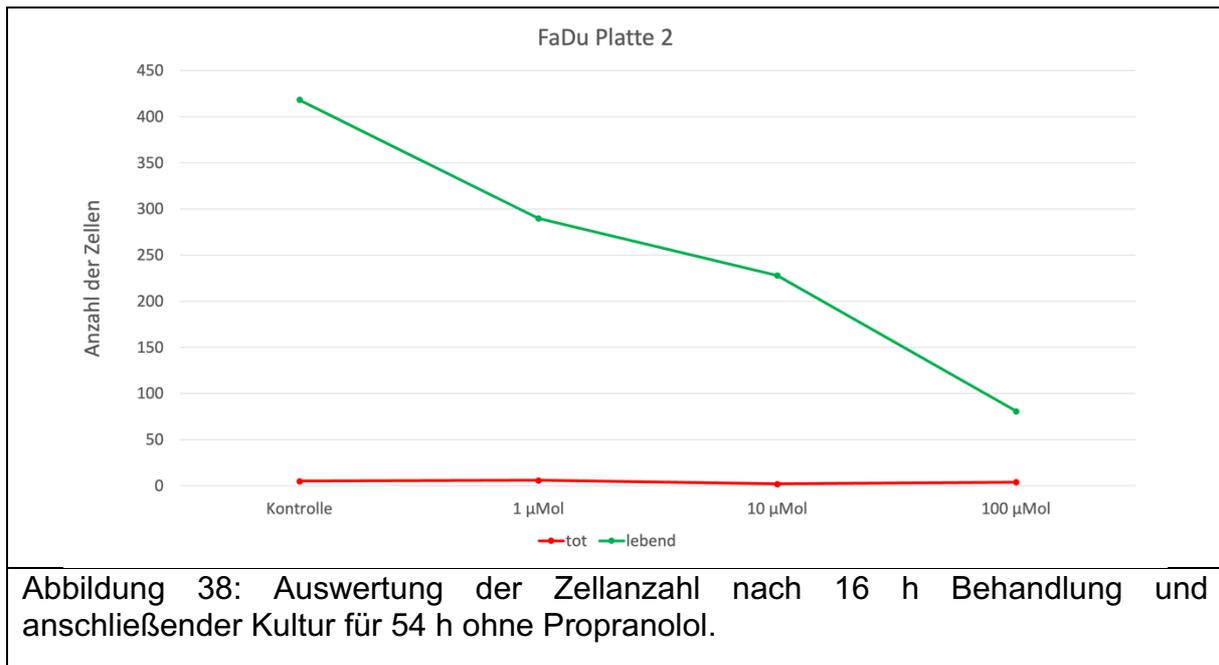
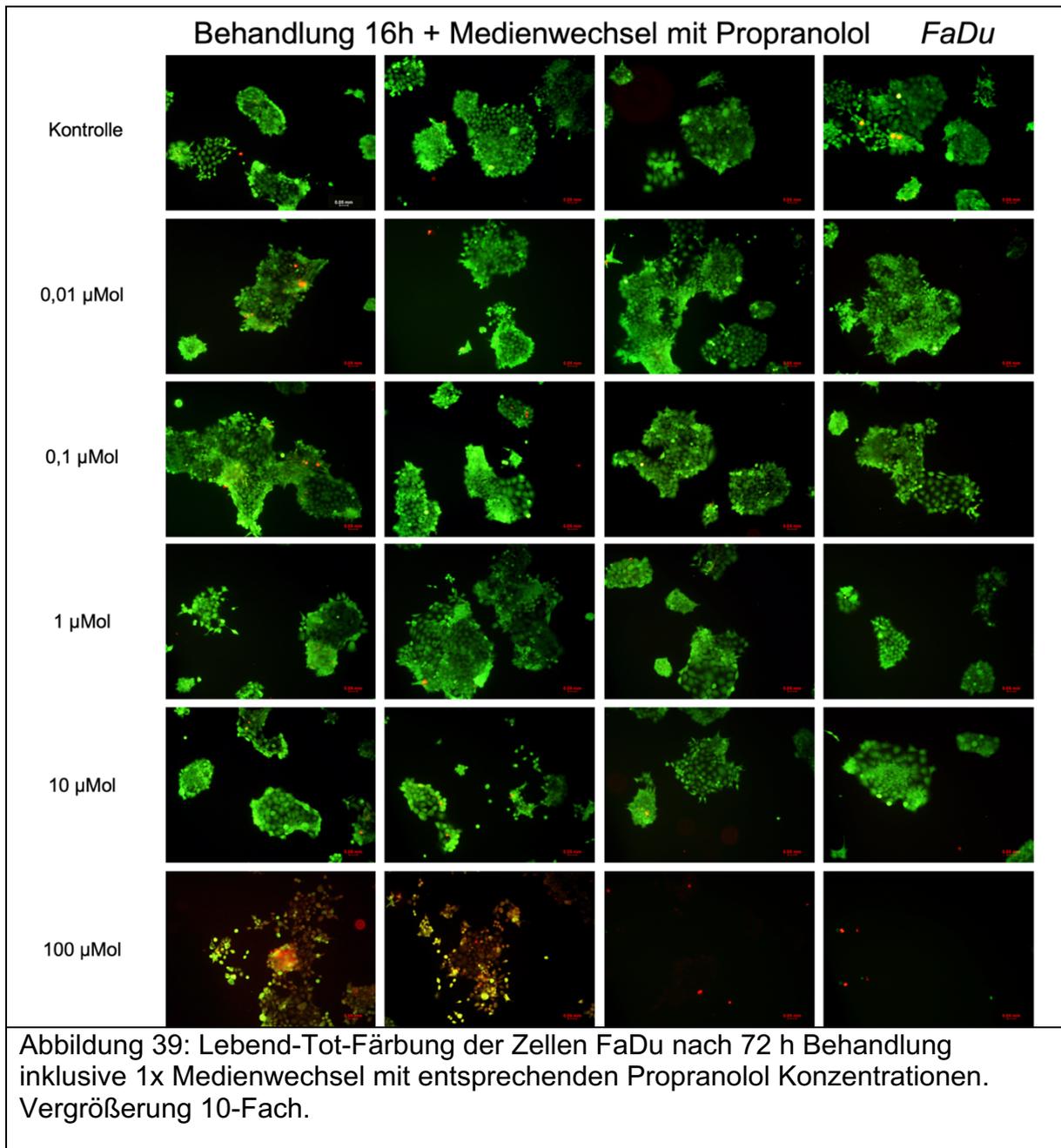


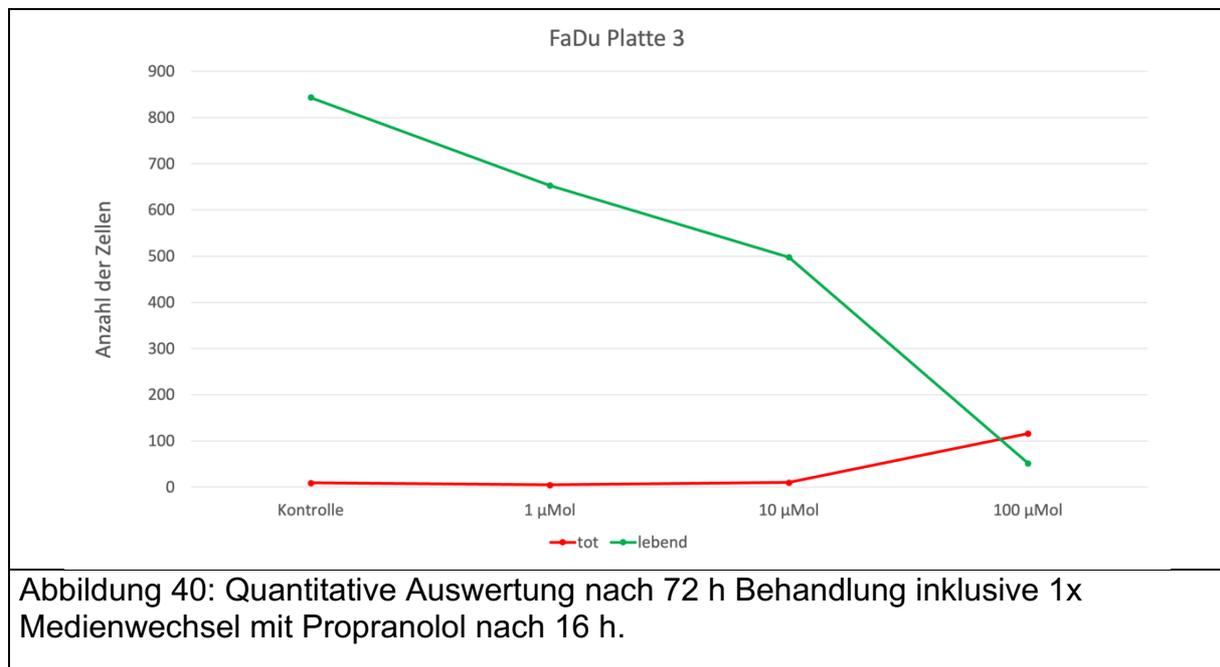
Abbildung 38: Auswertung der Zellanzahl nach 16 h Behandlung und anschließender Kultur für 54 h ohne Propranolol.

Abbildung 38 zeigt einen deutlichen Rückgang der Anzahl der Zellen ab Konzentrationen von 1 µM. Die Anzahl sinkt linear zur einwirkenden Konzentration. Bei 100 µM ist lediglich ein Viertel der Kontrolle an lebenden Zellen feststellbar. Tote Zellen bewegen sich nahe der Nulllinie. Scheinbar hatte das Propranolol nach 16 h einen anhaltenden Effekt auf die Zellen, der sich in einem geringeren Wachstum und einer Veränderung der Zellmorphologie bemerkbar macht, je höher die anfänglich einwirkende Konzentration war.



Lässt man Propranolol für 72 h auf die Zellen FaDu einwirken, zeigt Abbildung 39 bis zu einer Konzentration von 0,1 µM kaum Unterschiede im Wachstum. Bei der Inkubation mit 1 µM über 72 h lässt sich ein leichtes Auflösen der Zellverbände erkennen. Dieser Effekt verstärkte sich bei 10 µM. In den Proben, die mit der höchsten Konzentration, 100 µM, behandelt wurden, konnte ein massives Sterben der Zellen gezeigt werden. Durch den Einfluss der hohen Konzentration war in diesen Proben nur

noch eine geringe Anzahl lebender Zellen zu finden. Die Menge an toten Zellen hält sich bis 10 μM sehr niedrig.



Die Auswertung der Zellzählung in Abbildung 40 zeigt einen Niedergang der lebenden Zellen bei hohen Konzentrationen ab 1 μM und einer Inkubation über 72 h. Tote Zellen waren vermehrt bei 100 μM Propranolol zu finden. Dort waren mehr Tote als lebende Zellen zählbar. Propranolol hat einen wachstumshemmenden Effekt und sorgt bei hohen Konzentrationen für ein Zugrundegehen der Zellen. Bereits nach 16 h waren erste Effekte zu erkennen. Lässt man danach das Agens weg, finden sich anhaltende Einflüsse auf die Zellen. Ob es zu einer vollständigen Revision dieser Effekte auf Dauer kommt, müssen weitere Versuche zeigen. Bei einer Dauer von 72 h zeigt Propranolol deutliche, sichtbare und messbare Effekte auf die Zellen.

4.1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse von 4.1

In den Ergebnissen zur Leben-Tod-Färbung lässt sich bei allen Zellen ein bestimmter Konzentrationsbereich erkennen, der zu Veränderungen in den Zelllinien führt. Bei den

Zellen D562 ist bereits nach 16 h ein negativer Effekt ab 1 μM auf das Wachstum zu beobachten. Dieser Effekt verstärkt sich mit der Zeit. Lässt man die Konzentration länger einwirken, verdeutlicht sich das Bild. Selbst wenn das Agens nach 16 h aus dem Nährmedium entfernt und weiter inkubiert wird, sind deutliche Auswirkungen sichtbar. Für die Zellen der Reihe SCC9 war eine Wachstumsminderung nach kurzer Inkubationszeit von 16 h bei Konzentrationen ab 10 μM zu erkennen. Diese verstärkte sich mit der Dauer der Inkubation. Ein bleibender Effekt wurde ebenfalls beobachtet, wenn man Propranolol aus dem Nährmedium eliminiert. Eine Schwellenkonzentration von 1 μM konnte in den Zellen SCC15 festgestellt werden. In allen drei Versuchsaufbauten führte diese Konzentration zu ersten messbaren Effekten auf die Zellen. Diese verstärkten sich mit Erhöhung der Konzentration, sodass bei 100 μM mehr Tote als lebende Zellen in allen Platten zu finden waren. Wenig eindeutig waren die Ergebnisse zu den Zellen der Reihe A253. Hier konnte nach 16 h eine ähnlich hohe Zellanzahl bei allen Konzentrationen festgestellt werden. Sogar ein positiver Effekt auf die Zellen durch Propranolol konnte ab einer Konzentration von 1 μM bis 10 μM beobachtet werden, der zu einem vermehrten Wachstum führte, ließ man die Zellen nach 16 h ohne Propranolol weiterwachsen. Bei Dauereinwirkung sinkt die Anzahl an lebenden Zellen rapide bei 100 μM , sodass alle Zellen zugrunde gehen. Die Zellen der Reihe FaDu lassen nach 16 h nur minimale negative Effekte auf die Anzahl der Zellen erahnen. Bei Erhöhung der Inkubationszeit verstärken sich die negativen Effekte ab Konzentrationen von 1 μM . Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, ob die Konzentrationen aufrechterhalten werden oder nach initialer Inkubation von 16 h mit Zusatz von Propranolol ein Medienwechsel ohne Agens stattfindet.

4.2 Proteinexpression im Western Blot

In der folgenden Tabelle sind die Proteine, die im Western Blot nachgewiesen werden sollten, vorgestellt.

Tabelle 30: Proteine zum Nachweis im Western Blot

Proteine	Molekulargewicht
CD44	80 kDa
E-Cadherin	120 kDa
P-Cadherin	130 kDa
N-Cadherin	120 kDa
GSK-3 β	40-50 kDa
β -actin	42 kDa
β -actin	42 kDa
Twist	28 kDa

4.2.1 Proteinexpression von E-Cadherin und P-Cadherin

Es wurde untersucht, ob verschiedene Konzentrationen Propranolol einen Effekt auf die Expression von Cadherinen wie P-Cadherin und E-Cadherin hatten. Cadherine spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten. Das epitheliale Cadherin (E-Cadherin) ist verantwortlich für das Aufrechterhalten des Zytoskeletts benachbarter Zellen durch das Aufrechterhalten der Epithelpolarität. Ein Absinken der E-Cadherin-Expression führt zu einer erhöhten Motilität der Zellen und begünstigt die Metastasierung. Plazentales Cadherin (P-Cadherin) wird im gesunden Gewebe nur von Basalzellen exprimiert und ist dort an der Regulierung der Zell-Zell-Kontakte beteiligt. In der Diskussion stehen zusätzlich die Differenzierung und das Wachstum von Zellen in Verbindung mit einer vermehrten Expression von P-Cadherin. Im initialen Wachstumsstadium des Tumors wird es von Tumorzellen überexprimiert und steht im Verdacht, das Wachstum und die Metastasierung des Tumors zu begünstigen. Im Western Blot und in der qPCR wurde die Expression von E-Cadherin in den Zellreihen SCC9 und D562 und P-Cadherin in den Zellreihen SCC9, D562 und A253 untersucht.

Die Zellen wurden 16 h mit Konzentrationen von 0,1 μM , 0,5 μM und 1 μM Propranolol, gelöst in EtOH, inkubiert. Die Kontrolle wurde ohne den Zusatz von Propranolol inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben denaturiert und die Proteine im Western Blot aufgetragen. Dort wurden die Proteine der Größe nach aufgetrennt, mit Gelelektrophorese übertragen und letztlich mit Chemilumineszenz abgebildet. Die Auswertung geschah Software gestützt und wurde in Diagrammen und Graphen dargestellt.

4.2.2 Proteinexpression von E-Cadherin

Im Western Blot wurde untersucht, ob sich in den Proben der verschiedenen Zellen unter der Behandlung mit Propranolol der Anteil der Proteine verändert. Für die Auswertung wurde das quantitative Verhältnis gemessen und ausgewertet. Im Bereich, des für E-Cadherin zu erwartenden Molekulargewichts von 120 Kilodalton (kDa) fanden sich zwei Banden für das Protein. Für die Auswertung wurden die Hauptbande und die Hintergrundbande ausgewertet.

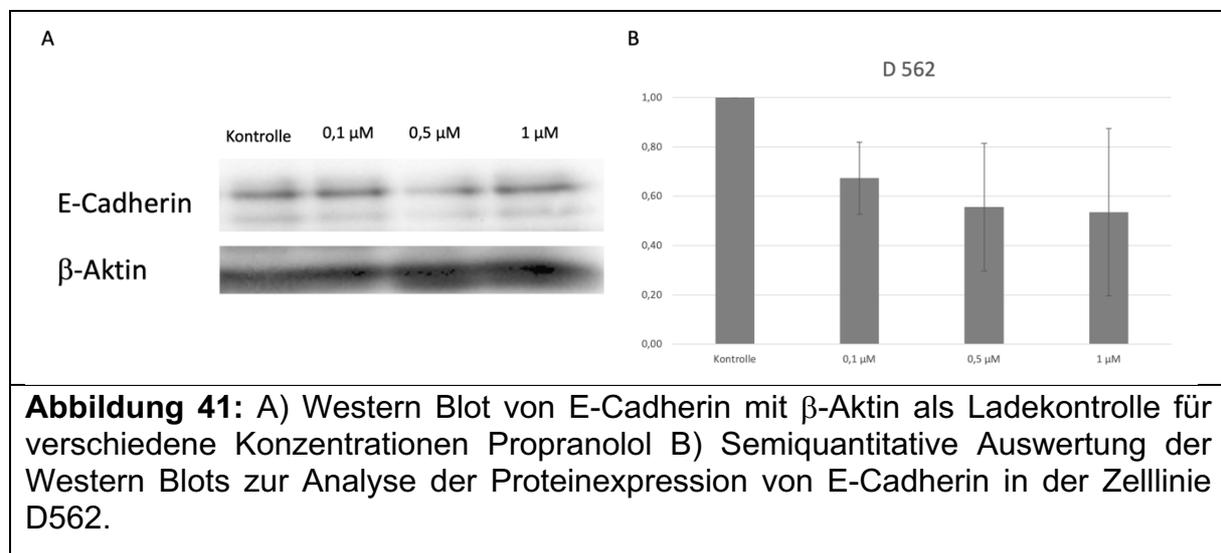
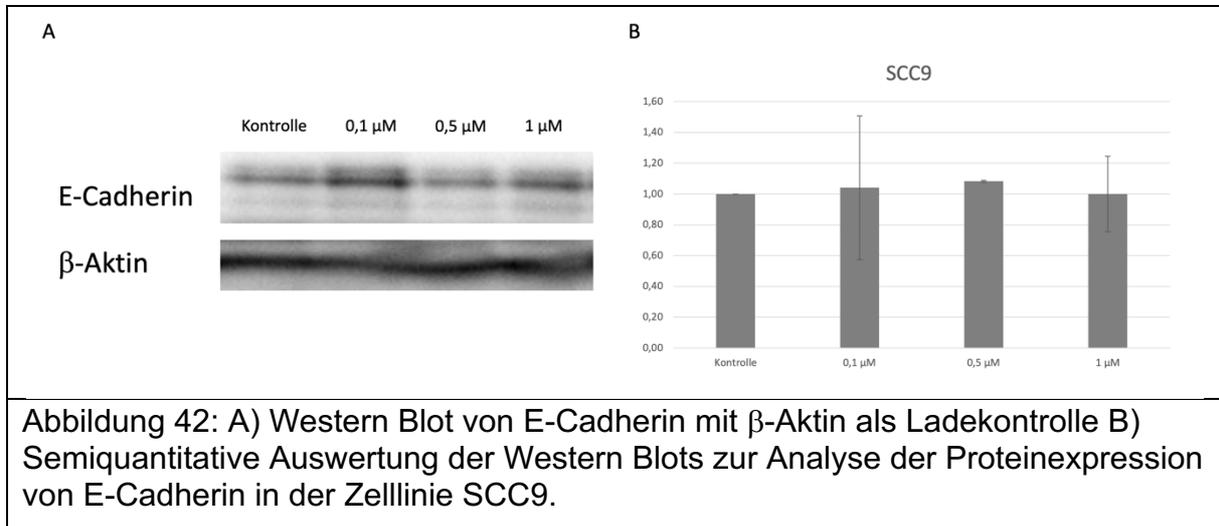


Abbildung 41 A zeigt das entstandene Bild nach Chemilumineszenz. Für E-Cadherin sind zwei Banden zu erkennen. B zeigt, dass die Expression von E-Cadherin in der Zellreihe D562 kontinuierlich abfällt und bei den Proben, die mit 0,5 μM und 1 μM behandelt wurden, Werte von ungefähr 50 % der Kontrolle erreicht. Die Kontrolle

wurde auf den Wert 1 festgelegt. In den Versuchen konnte somit ein negativer Effekt auf die Expression von E-Cadherin bei höheren Konzentrationen Propranolol beobachtet werden.



In der Zelllinie SCC9 zeigt der Western Blot in Abbildung 42, dass unterschiedliche Konzentrationen Propranolol wenig bis keinen Effekt auf die Expression von E-Cadherin hatten. Ein minimaler Anstieg der Expression konnte bis zu einer Konzentration von 0,5 μ M beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 1 μ M sinkt die Expression wieder auf den Wert der Kontrolle ab.

4.2.3 Proteinexpression von P-Cadherin

Nach entsprechender Bildgebung konnten im zu erwartenden Bereich bei 120 kDa zwei Banden für P-Cadherin gemessen und ausgewertet werden

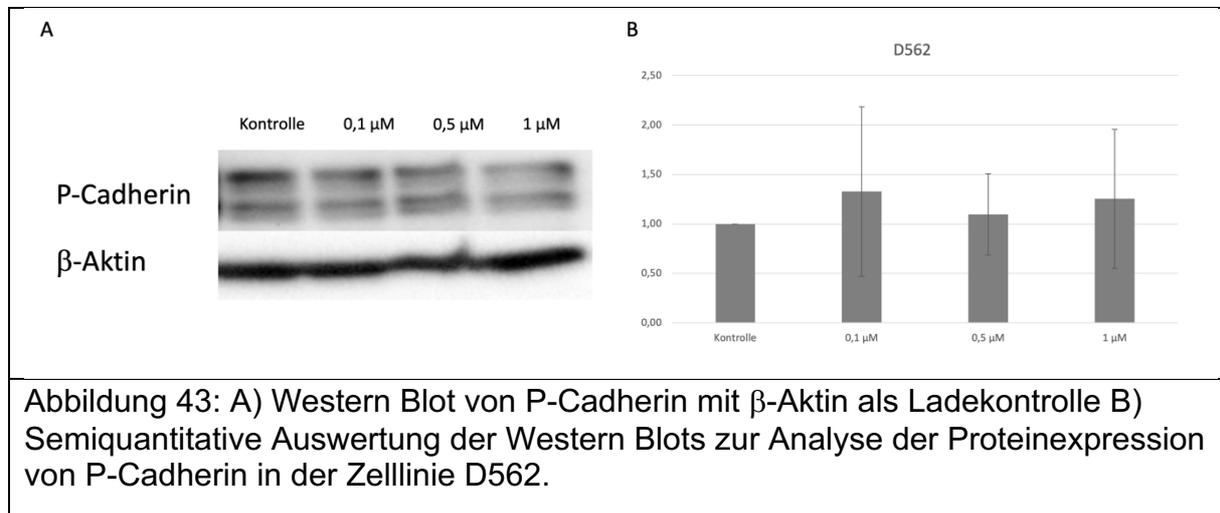
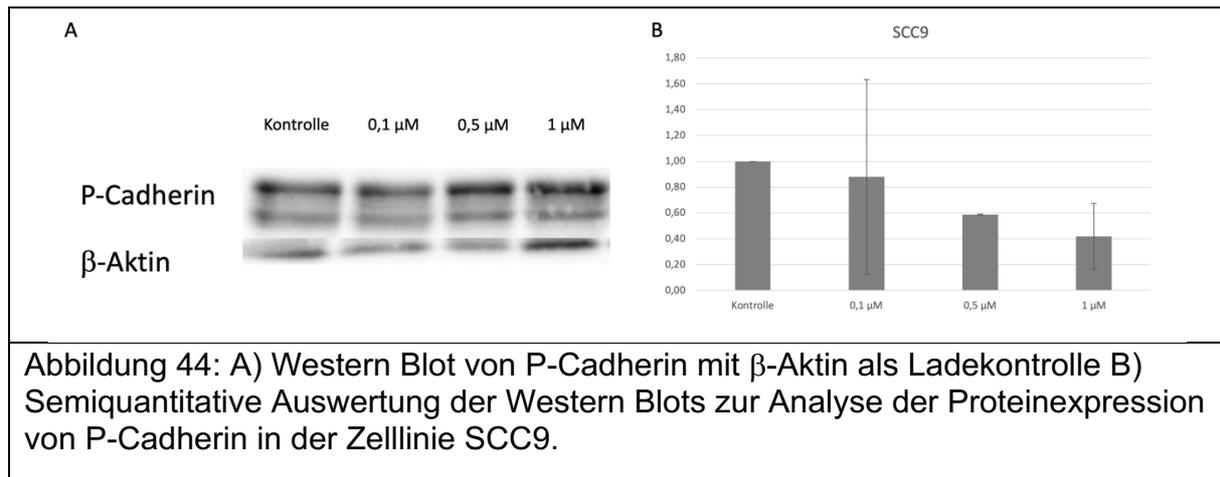


Abbildung 43 zeigt in A) die Banden, die für die Zellreihe D562 im Bereich der Größe von P-Cadherin und β -Aktin gemessen wurden. B) zeigt die semiquantitative Auswertung. Die Standardabweichung ist in diesem Falle sehr hoch. Die zwei unterschiedlichen Versuche zeigten im vorliegenden Fall deutlich abweichende Ergebnisse. Im ersten Versuch fällt die Expression bei allen Konzentrationen auf ähnliche Werte im Bereich von 70-80 % der Kontrolle, während im zweiten Versuch ein Anstieg auf den 1,5-2-Fachen Wert der Kontrolle beobachtet werden konnte.



Für die Zellreihe SCC9 konnte im Versuch eine Verringerung der Expression von P-Cadherin konzentrationsabhängig gemessen werden, wie Abbildung 44 zeigt. Für die Proben, die mit 0,1 µM behandelt wurden, lagen in beiden Versuchen unterschiedliche Ergebnisse vor, womit die hohe Standardabweichung zu erklären ist. Insgesamt kann man aber besonders bei 0,5 und 1 µM eingesetzter Konzentration einen deutlichen Rückgang der Expression von P-Cadherin erkennen. Die Werte sinken im Vergleich zur Kontrolle deutlich auf 60 % für 0,5 µM beziehungsweise 50 % bei 1 µM. Es kann ein negativer Effekt auf die Expression von P-Cadherin in den Zellen SCC9 durch Propranolol angenommen werden.

4.2.4 Proteinexpression von CD44

Der Transmembranrezeptor CD44 (cluster of differentiation 44) kann über seinen Liganden Hyaluron zu einer Aktivierung der EGFR Tyrosinkinase und damit zum Anstoßen der MAP-Kinase führen, die in einem erhöhten Tumorwachstum resultiert. CD44 wird vermehrt in Krebsstammzellen exprimiert. Es sorgt für eine erhöhte Resistenz gegen Radio- und Chemotherapien. Außerdem steht CD44 im Verdacht, bei der Motilität der Tumorzellen eine entscheidende Rolle zu spielen und somit zu einer Metastasierung beitragen zu können. Im Western Blot sollte nun untersucht werden, wie sich Propranolol in verschiedenen Konzentrationen auf die Expression von CD44 in den Zellen der Reihe SCC15 und D562 auswirkt.

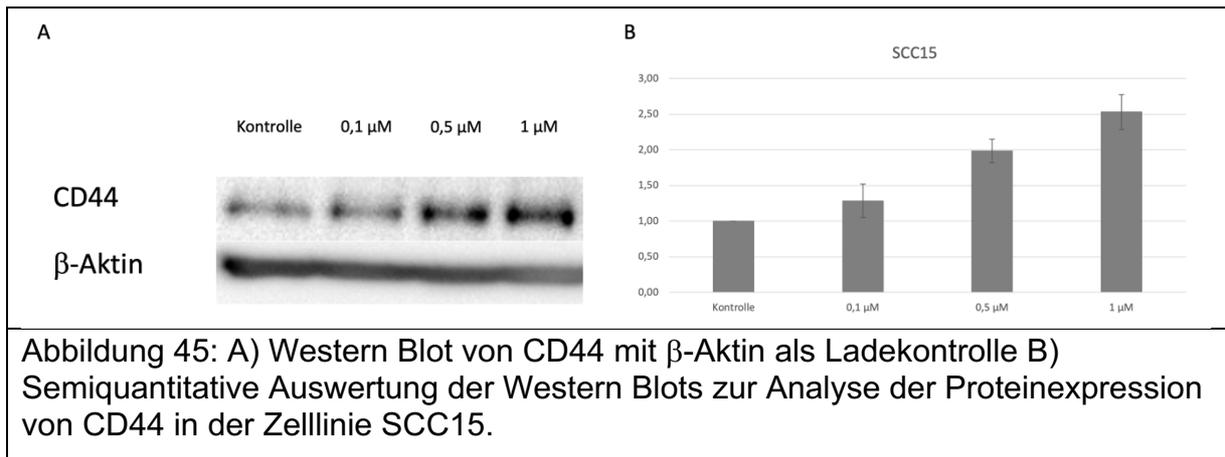
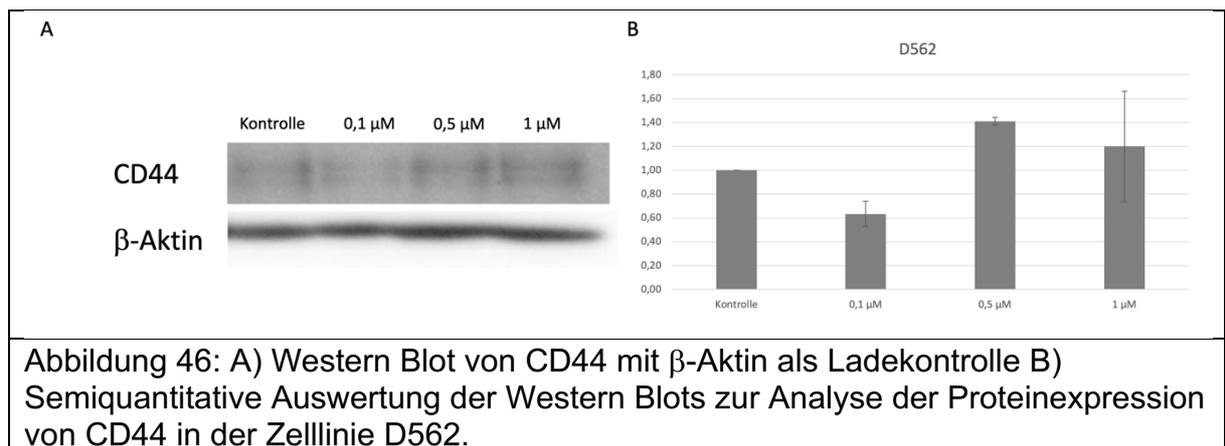


Abbildung 45 zeigt die Auswertung der Western Blots zu CD44 in den Zellen SCC15. Man sieht in Grafik A die Banden der Blots im zu erwartenden Bereich von 80 kDa für CD44 und die Ladekontrolle β -Aktin. Mit dem Auge kann eine Verstärkung der Banden, je höher die Konzentration gewählt wurde, erkannt werden. Die Auswertung durch die Software bestätigt diesen Eindruck im Graphen in Bild B. Es ist eine Steigerung der Expression von CD44 in den Zellen mit jeder höheren Konzentration zu erkennen. Der Wert für die Expression steigt bei einer Behandlung mit 1 μ M Propranolol bis auf das 2,5-Fache des Wertes der Kontrolle an. Es konnte somit ein deutlicher Effekt auf die Expression von CD44 durch Propranolol nachgewiesen werden.



Für die Zellreihe D562 zeigt sich ein uneinheitliches Bild. In Abbildung 46 lassen sich in A die Banden zu CD44 im erwarteten Bereich, sowie die Ladekontrolle β -Aktin erkennen. B zeigt in der Auswertung, dass es zu einer verringerten Expression von

CD44 bei einer Konzentration von 0,1 μM Propranolol kommt. 0,5 μM führen hingegen zu einer verstärkten Expression von CD44 bis auf das 1,4-Fache des Kontrollwerts in den Zellen. Bei 1 μM kommt es wieder zu einem leichten Abfall der Expression, jedoch liegt hier die Standardabweichung recht hoch, da es im ersten Versuch zu einer Steigerung der Expression führte und im zweiten Versuch zu einer Verringerung.

4.2.5 Proteinexpression von Twist

Vergangene Studien konnten bereits zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Twist in Tumorzellen überexprimiert wird. Er sorgt durch Aktivierung für eine Erniedrigung der E-Cadherin-Expression und somit zu einem Auflösen der Zell-Zell-Kontakte, was ihn zu einem Faktor für die Metastasierung des Tumors macht. Twist wurde bereits in oralen Leukoplakien nachgewiesen. Erwartet wurde eine Bande für Twist im Bereich von 28 kDa. Dies liegt nah an dem Gewicht für den Standard β -Aktin, der bei 42 kDa lokalisiert ist. Daher wurde im vorliegenden Versuch zuerst der Standard sichtbar gemacht und ausgewertet, die Probe danach von Antikörpern gereinigt und neu inkubiert, um im zweiten Gang Twist nachweisbar zu machen. Die Auswertung geschah wie bei allen Proben mit der Software Image Lab.

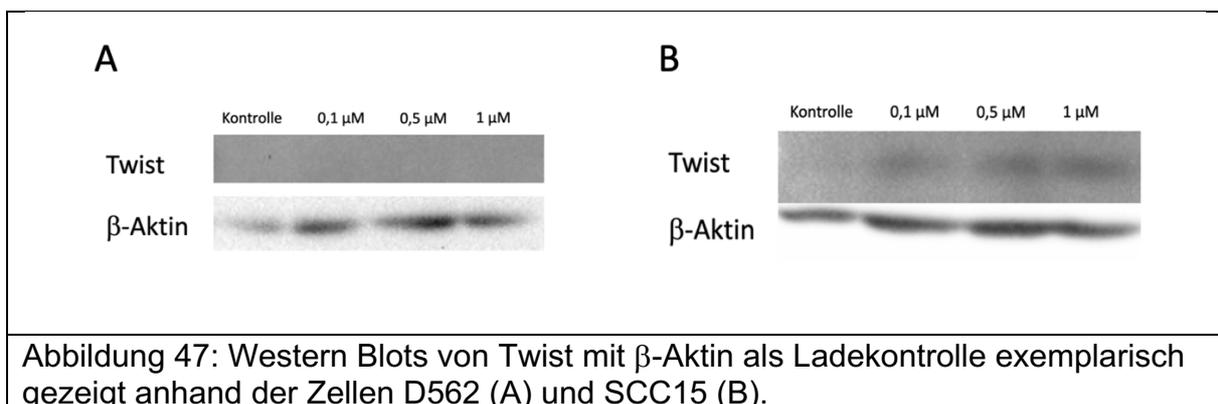
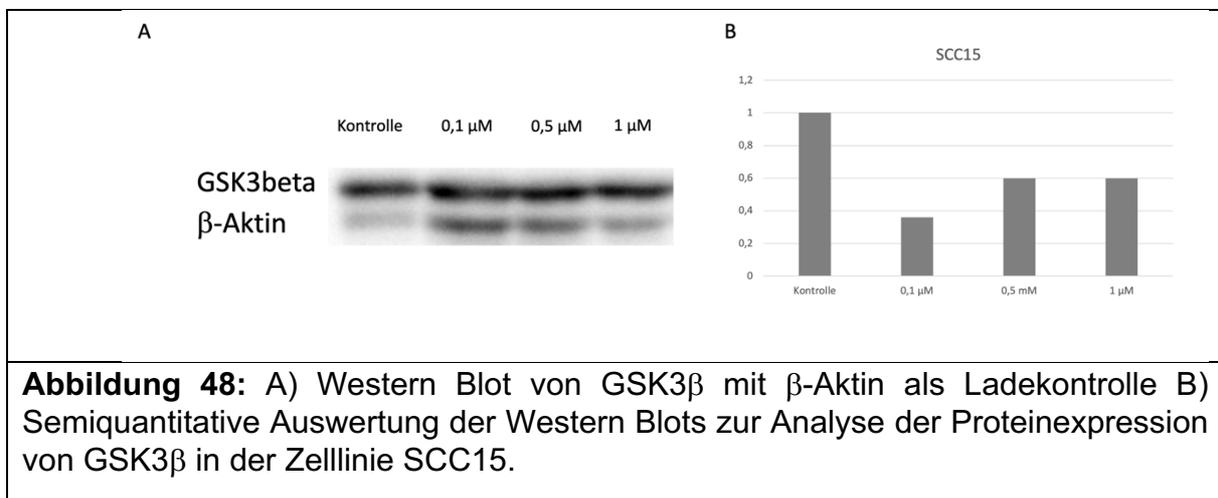


Abbildung 47 zeigt kaum erkennbare Banden in beiden Western Blots für Twist. Da hier der Ausschlag der Banden nicht gemessen werden konnte, gibt es für diese Western Blots keine Auswertung.

4.2.6 Proteinexpression GSK3 β

GSK3 β ist eine Seronin/Tyrosin-Kinase, die in der Literatur für einen wichtigen Faktor in der Metastasierung von OSCC gehalten wird. Eine Aktivierung der MAP-Kinase durch Hemmung von GSK3 β wird diskutiert. Eine negative Regulierung von GSK3 β scheint einen direkten Einfluss auf die Metastasierung und das Wachstum von OSCC zu haben. In den Versuchen sollte im Western Blot und in der qPCR untersucht werden, ob bei verschiedenen Konzentrationen Propranolol einen Einfluss auf die Expression von GSK3 β in den Zellen der Linien SCC9, SCC15 und D562 haben. Im Unterschied zu den oben genannten Versuchen im Western Blot wurde für GSK3 β nur ein Versuch durchgeführt. Da GSK3 β und die Ladekontrolle β -Aktin in einem ähnlichen Gewichtsbereich zu finden sind, fand die Auswertung in zwei Durchgängen statt. Im ersten Durchgang wurde GSK3 β markiert und ausgewertet. Danach fand eine Waschung statt und es wurde β -Aktin nachgewiesen und ausgewertet. Daher ist in den Abbildungen keine Standardabweichung angegeben.



Im Western Blot sind die Banden für die verschiedenen Konzentrationen Propranolol gut zu erkennen. Die Bande für GSK3 β wurde im vermuteten Bereich von 46 kDa gefunden. Die Ladekontrolle β -Aktin befand sich ebenfalls im erwarteten Bereich, wie A in Abbildung 48 zeigt. In B ist die semiquantitative Auswertung der Blots zu sehen. Man erkennt einen Abfall der Expression von GSK3 β bei einer eingesetzten

Konzentration Propranolol von 0,1 μM auf das 0,4-Fache der Kontrolle, was gleichzeitig den niedrigsten Wert darstellt. Bei der nächsthöheren Konzentration von 0,5 μM steigt der Wert leicht an auf das 0,6-Fache des Ausgangswertes und verändert sich bei 1 μM nicht weiter. Damit liegen sie weiterhin deutlich unter dem Wert der Kontrolle.

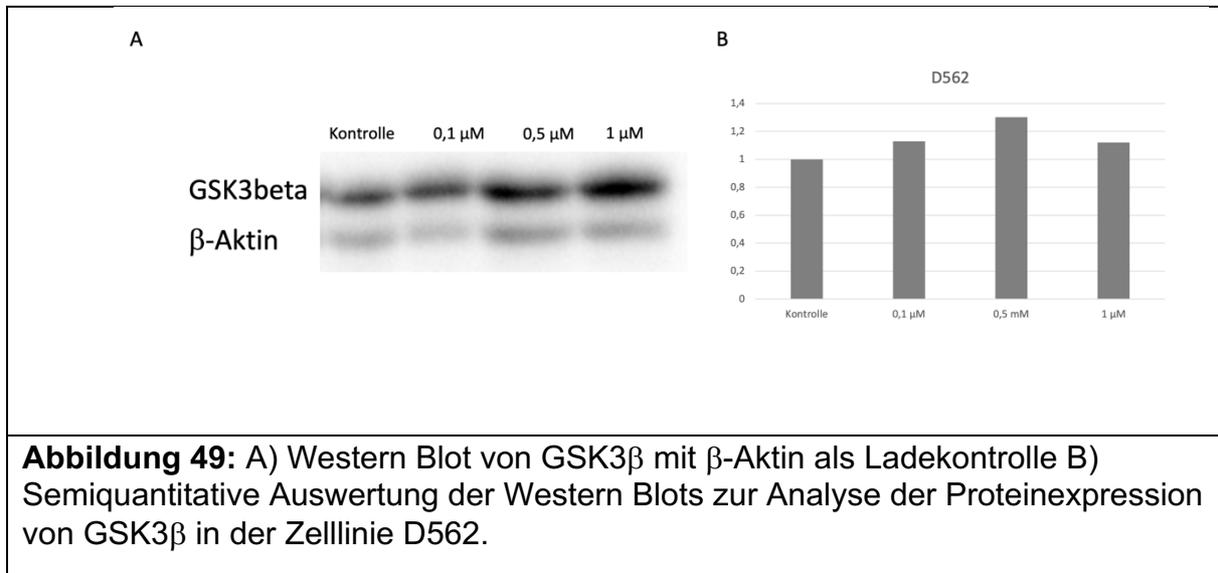
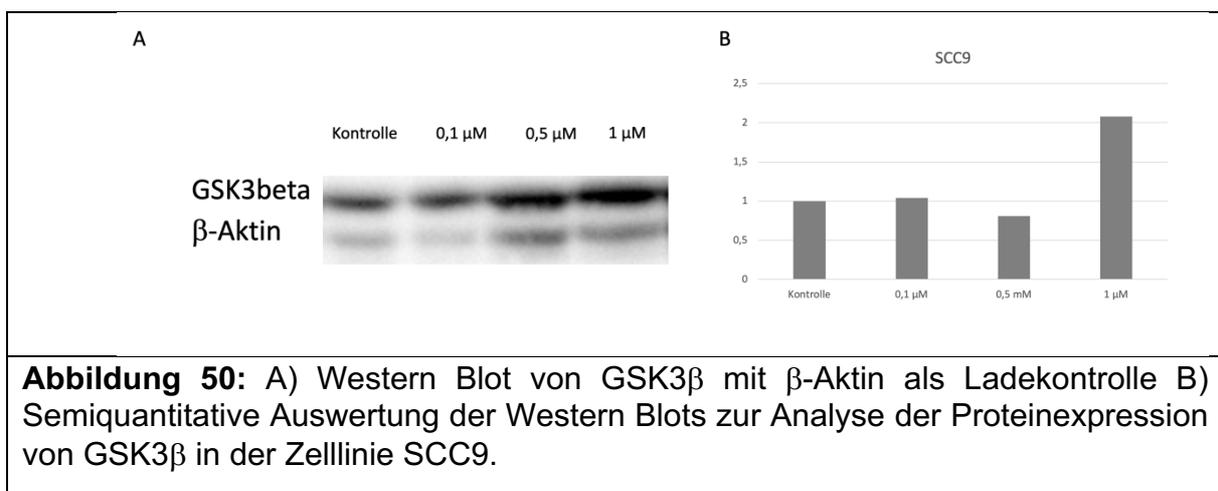


Abbildung 49 zeigt den Western Blot in A und die dazugehörige semiquantitative Auswertung der Zelllinie D562. Man erkennt einen Anstieg der Expression bis zu einer Konzentration von 0,5 μM auf das 1,3-Fache der Kontrolle. Danach findet ein Rückgang der Expression statt. Dieser Wert liegt jedoch mit dem knapp 1,1-Fachen leicht über dem Wert der Kontrolle.



Im Diagramm in Abbildung 50 ist ein leichter Anstieg der Expression von GSK3 β bei 0,1 μM und eine leichte Verringerung bei 0,5 μM zu erkennen. Die Konzentration steigt 100

bei einer Konzentration von 1 μM jedoch sprunghaft auf das Doppelte des Ausgangswertes an. Dieses Ergebnis konnte in der qPCR bestätigt werden. Genauer ist das Ergebnis in Kapitel 4.3.1 beschrieben.

4.3 Genexpression in der qPCR

In der folgenden Tabelle sind die Gene, die in der qPCR nachgewiesen werden sollten, vorgestellt.

Tabelle 31: Gene zum Nachweis in der qPCR

18S
GSK3 β
MMP2
MMP9
OPG
RANKL
EGFR
VEGFR1

4.3.1 Genexpression von GSK3 β

Mit der qPCR konnte quantitativ nachgewiesen werden, wie sich die Behandlung der Zellen mit dem β -AR-Antagonist Propranolol auf die Geneexpression von GSK3 β in den Zellen auswirkt. Die Zellen wurden 16 h mit Propranolol in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Als Kontrollgruppe wurde EtOH ohne Propranolol verwendet. Die Proben wurden im AriaMx Real-Time PCR System nach dem in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Zyklusprotokoll verarbeitet und mit der Software AriaMx ausgewertet. Für die Zellen SCC15 gab es im Versuch der qPCR einen CT-Wert von 36,17 bei der Expression von 18 S in der zweiten Probe. Hier wurde ein Fehler beim Pipettieren vermutet und der Wert daher auf den Wert der ersten Probe korrigiert. Dieser betrug 14,67. Die Werte für 18 S in den weiteren Zellen lagen im erwarteten Bereich.

GSK3beta

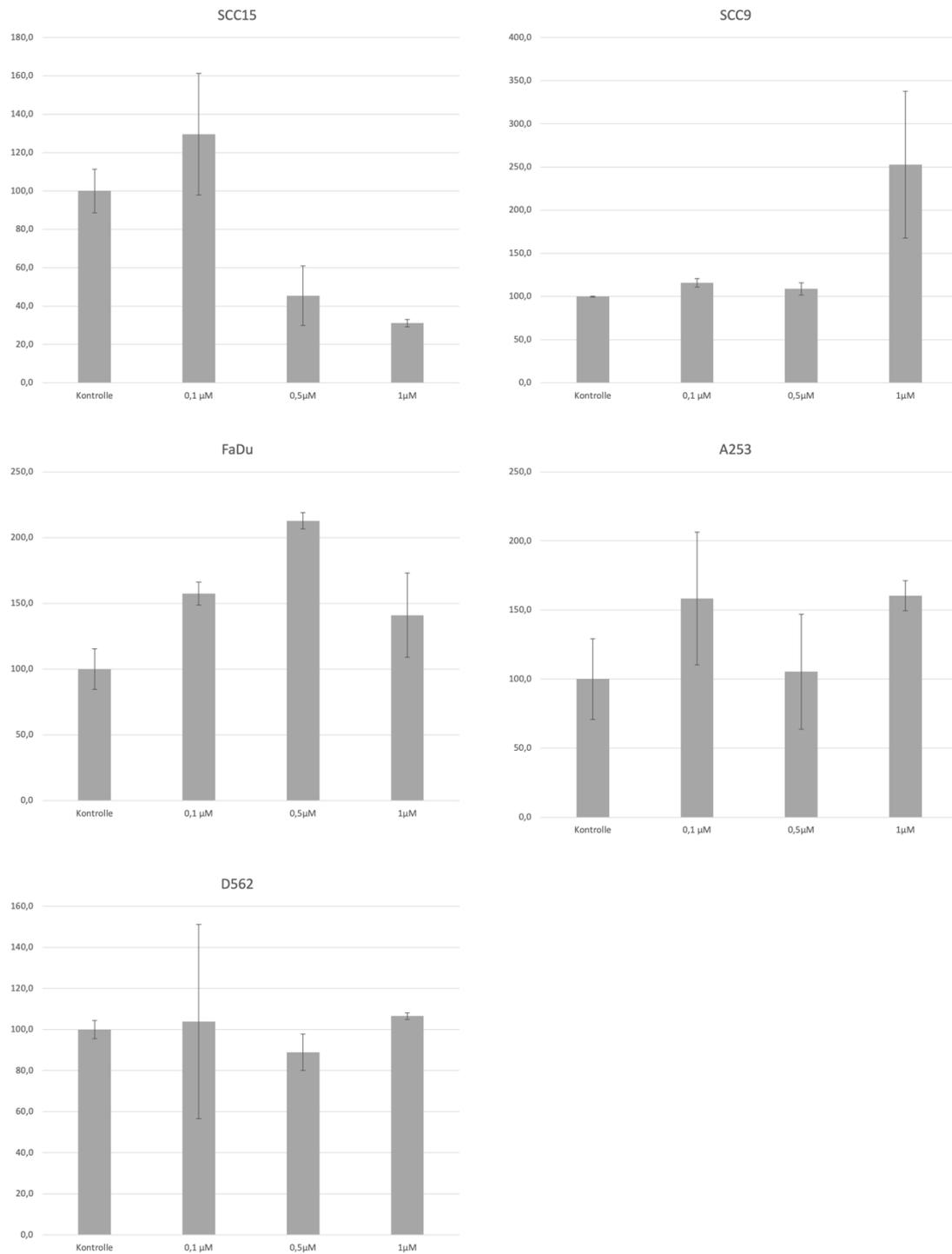


Abbildung 51: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von GSK3beta in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung.

Im Diagramm in Abbildung 51 kann man erkennen, dass es bei den Zellen SCC15 zu einem Anstieg der Expression bei einer Konzentration 0,1 μM Propranolol kam. Bei einer Konzentrationserhöhung auf 0,5 μM bzw. 1 μM sinkt die Expression auf knapp die Hälfte des Wertes der Kontrolle. Bei den Zellen SCC9 zeigt sich ein anderes Bild. Die Expression bleibt auf ähnlichem Niveau im Vergleich zur Kontrolle bis 0,5 μM . Bei einer Konzentration von 1 μM steigt die Konzentration jedoch auf das 2,5-Fache des Ausgangswertes. Die Zellen FaDu reagieren mit einer Steigerung der Expression bis zu einer Konzentration von 0,5 μM . Danach sinkt die Konzentration bei einer Konzentration von 1 μM , bleibt trotzdem beim 1,5-Fachen der Kontrolle. Für A253 konnte eine Steigerung der Expression bei 0,5 μM auf das 1,5-Fache festgestellt werden. Bei 0,5 μM entspricht die Expression der Kontrolle. Für 1 μM wurde wieder ein Anstieg auf das 1,5-Fache festgestellt. In den Zellen D562 zeigt sich keine deutliche Veränderung in der Expression von GSK3beta bei den verschiedenen Konzentrationen.

4.4 Genexpression von MMP2 & MMP9

MMP2 und MMP9 sind Matrix-Metalloproteasen. Vergangene Studien arbeiten heraus, dass diese Enzyme mit dem Abbau von Kollagen IV, das ein wichtiger Bestandteil der Basallamina ist, für eine erhöhte Metastasierungs- und Wachstumsrate des Tumors sorgen.

MMP2

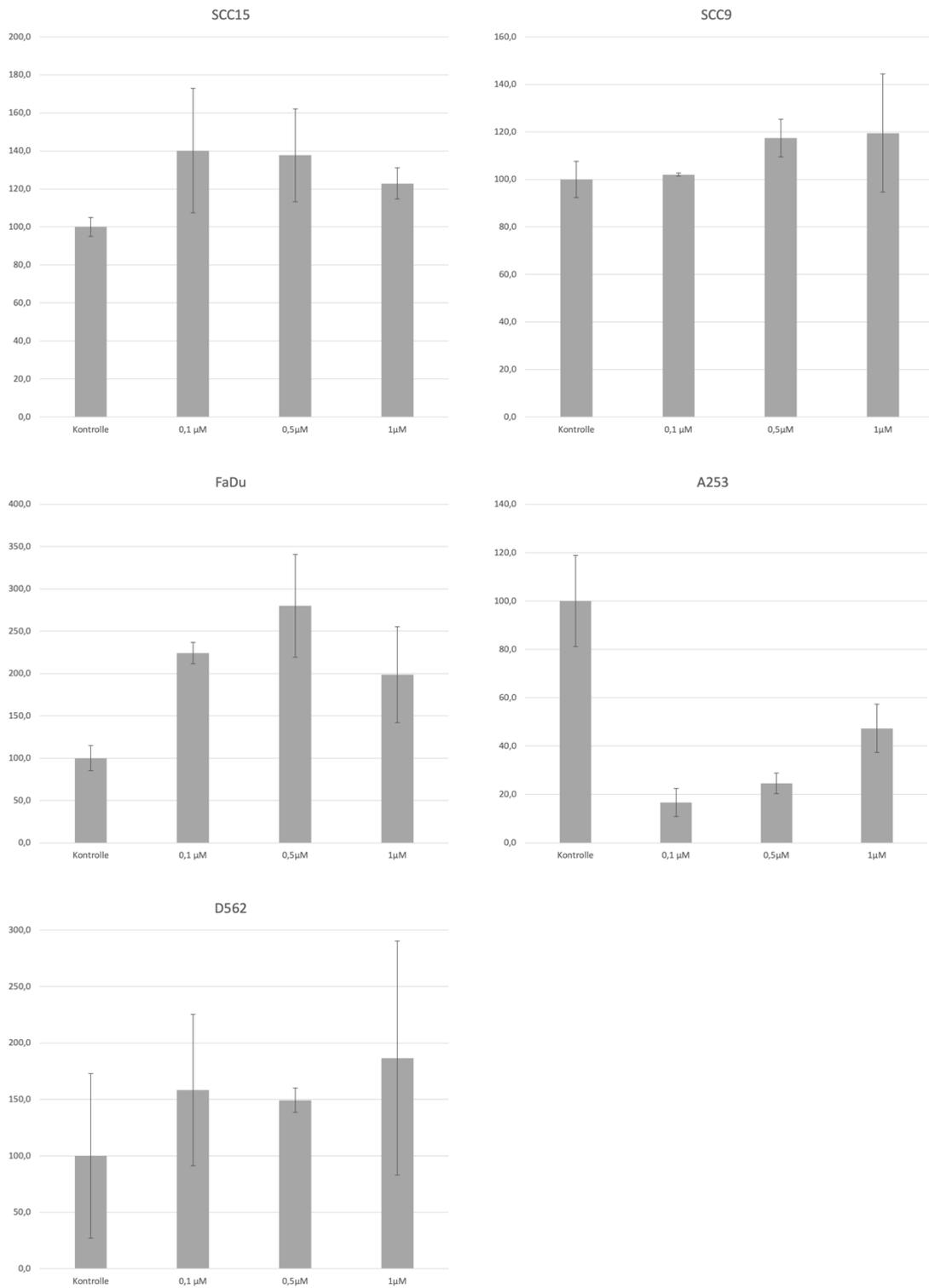


Abbildung 52: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von MMP2 in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung.

Die Expression von MMP2 steigt in den Zellen SCC15 bei 0,1 und 0,5 μM auf den 1,4-fachen Wert der Kontrolle und fällt bei 1 μM wieder leicht auf das 1,2-fache des Kontrollwerts, wie Abbildung 52 zeigt. SCC9 lassen bei einer Erhöhung der Konzentration auf 0,1 μM keine Veränderung erkennen. Daraufhin stieg die Expression auf das 1,2-fache bei 1 μM . Für die Zellen FaDu konnte eine starke, gleichmäßige Steigerung der Expression bis auf das 3-fache der Kontrolle bei einer Konzentration von 1 μM gezeigt werden. Die Expression von GSK3beta in den Zellen A253 sinkt deutlich bei einer Konzentration von 0,1 μM auf den 0,2-fachen Wert der Kontrolle, steigt danach wieder an, bleibt jedoch mit dem 0,5-fachen des Ausgangswertes auf einem niedrigen Niveau. In den Zellen D562 steigt die Expression bei 0,1 μM und 0,5 μM auf das 1,5-fache. Bei 1 μM erkennt man eine Steigerung der Expression auf das 2-fache des Ausgangswertes.

MMP9

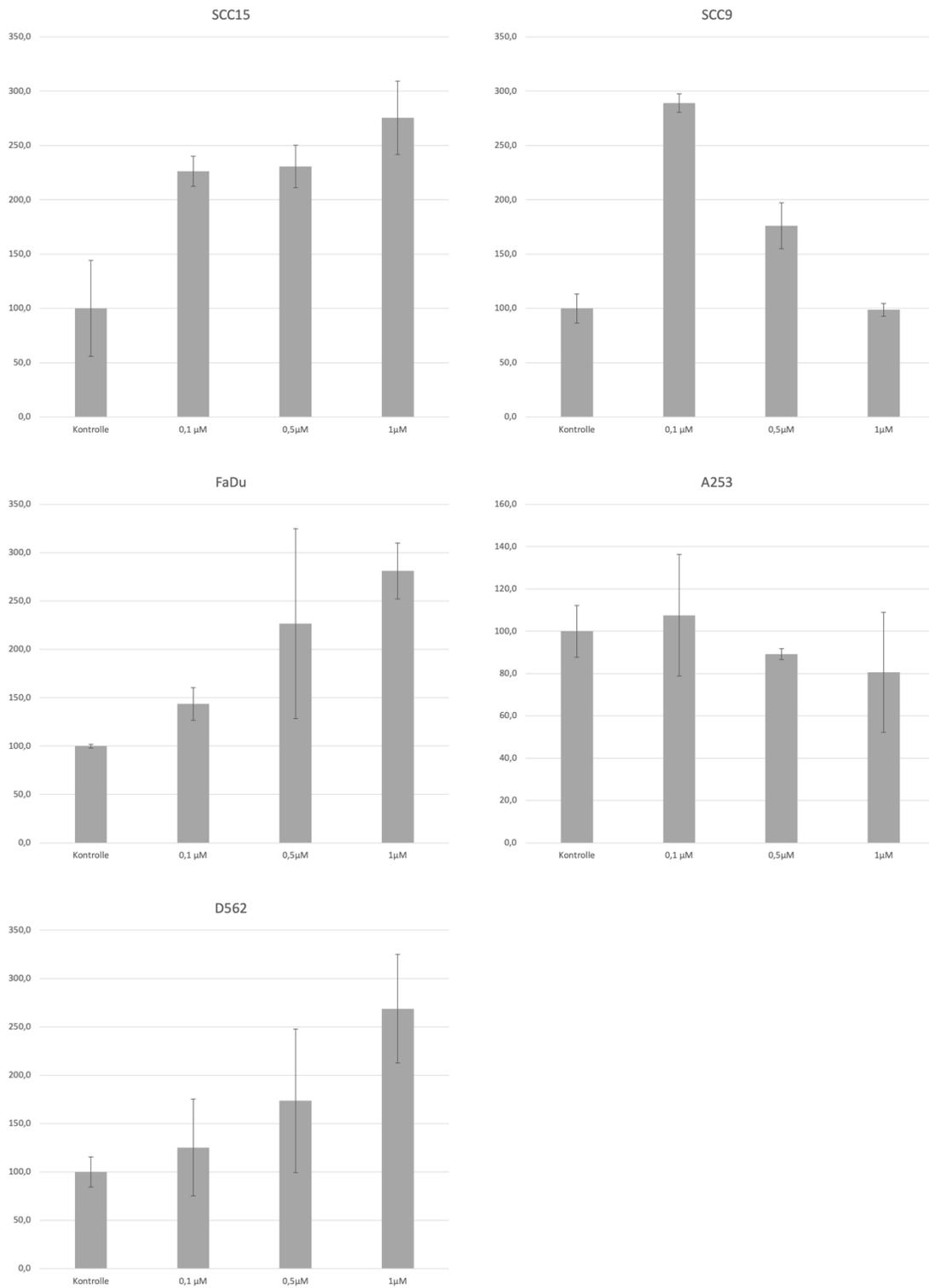


Abbildung 53: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von MMP9 in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung.

In Abbildung 53 sieht man, dass die Expression von MMP9 in den Zellen SCC15 bei einer Konzentration von 0,1 μM auf mehr als das 2-Fache des Kontrollwerts ansteigt. Die Expression bleibt auf gleichem Niveau bei einer Konzentration von 0,5 μM und steigt bei 1 μM Propranolol Konzentration auf das knapp 3-Fache der Kontrolle. In den Zellen SCC9 zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Expression bei 0,1 μM auf das 3-Fache der Kontrolle. Bei höheren Konzentrationen sinkt die Expression bis auf den Ausgangswert bei 1 μM . Die Expression von MMP9 in den Zellen FaDu steigt kontinuierlich an, je höher die Konzentration gewählt wurde. Bei der höchsten Konzentration von 1 μM liegt der Wert der Expression beim 3-Fachen des Wertes der Kontrolle. Für die Zellen A253 zeigten sich nur geringe Veränderungen bei Konzentrationen von 0,1 bzw. 0,5 μM . Bei 1 μM zeigte sich eine geringere Expression von MMP9 vom 0,8-Fachen der Kontrolle. Für D562 konnte ein Anstieg der Expression beobachtet werden. Für die höchste eingesetzte Konzentration von 1 μM lag der Wert der Expression über dem 2,5-Fachen des Ausgangswertes der Kontrolle.

4.5 Expression von OPG und RANKL in der qPCR

Das OPG/RANK/RANKL-System ist beim Gesunden zuständig für den Knochenstoffwechsel. RANK bindet am RANK-Liganden, Osteoklasten-Vorläuferzellen differenzieren und resorbieren Knochengewebe. OPG ist ein Rezeptor der TNF-Familie und bindet RANKL, wodurch der Abbau von Knochengewebe gehemmt wird. HNC-Zellen können die Aktivität von RANKL durch eine verstärkte Bildung erhöhen und dadurch für den Abbau von Knochengewebe sorgen. Gleichzeitig schaffen es HNC-Zellen, die Bildung von OPG zu unterdrücken. Dies führt zu einem Ungleichgewicht im Knochenumbau und hin zu einem vermehrten Abbau. Diese Eigenschaften führen beim Tumorwachstum zu einer Infiltration von Knochengewebe.

OPG

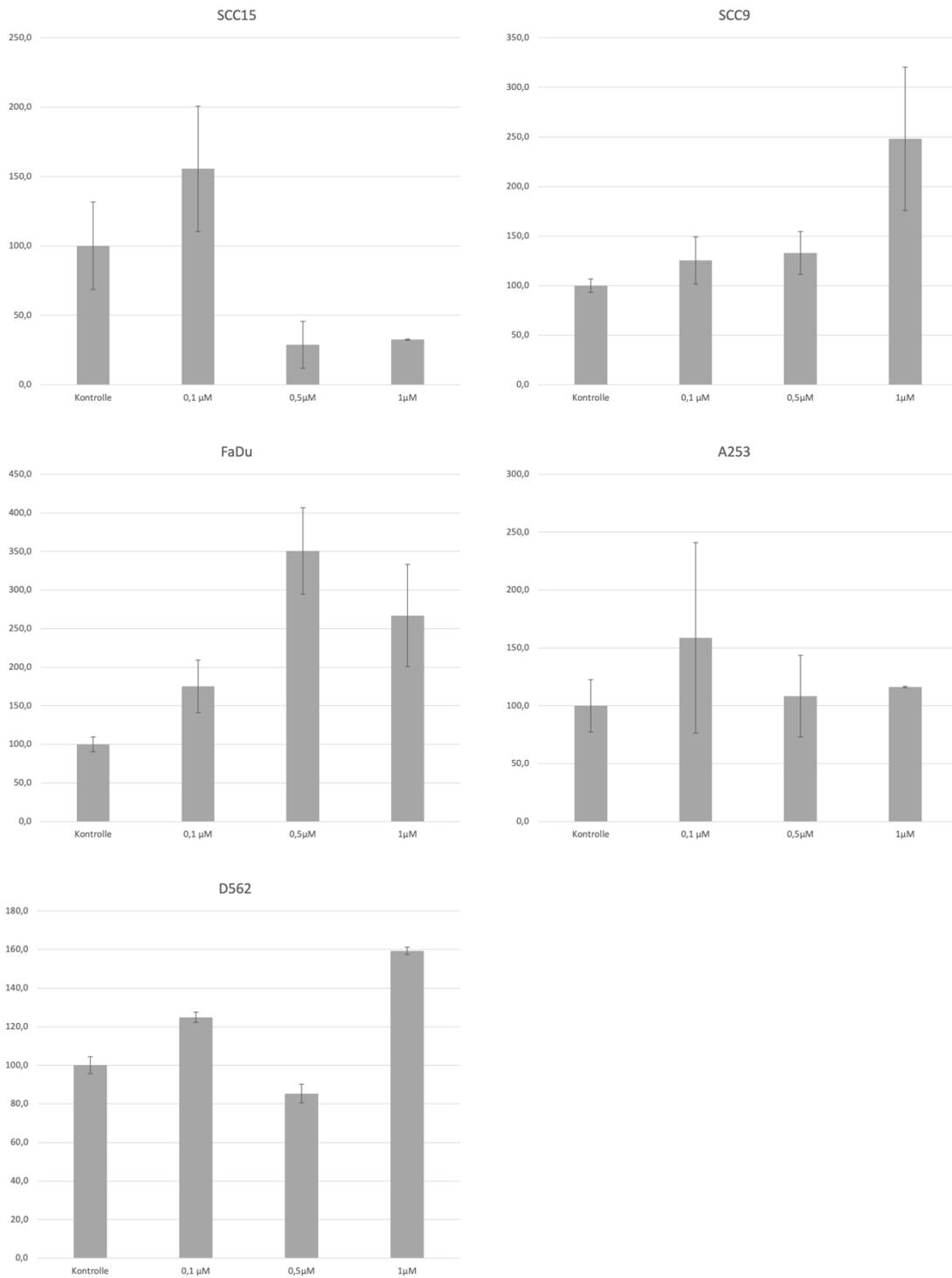


Abbildung 54: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von OPG in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung.

Abbildung 54 zeigt für die Zellen SCC15 einen Anstieg der Expression von OPG auf das 1,5-Fache im Vergleich zur Kontrolle bei einer Konzentration von 0,1 μM Propranolol. Bei höheren Werten fiel die Expression auf weniger als das 0,5-Fache des Kontrollwertes. Ein anderes Bild zeigten die Zellen SCC9. Dort stieg die Expression leicht an bei Konzentrationen von 0,1 und 0,5 μM . Bei 1 μM ist eine deutliche Steigerung der Expression auf das 2,5-Fache der Kontrolle zu erkennen. Für die Expression von OPG bei FaDu stellte sich ein Anstieg der Expression auf das 3,5-Fache bei einer Konzentration von 0,5 μM dar. Danach sank der Wert bei 1 μM auf das 2,5-Fache. Die Zellen A253 zeigten eine geringere Veränderung der Expression. Bei 0,1 μM stieg die Expression auf das 1,5-Fache der Kontrolle. Bei den höheren Konzentrationen fiel der Wert zurück auf das Niveau des Ausgangswertes. In den Zellen D562 wurde ein Anstieg der Expression bei 0,1 μM auf das 1,2-Fache beobachtet, danach bei 0,5 μM ein Absinken der Expression auf das 0,8-Fache und ein erneuter Anstieg auf das 1,6-Fache des Wertes der Kontrolle.

RANKL

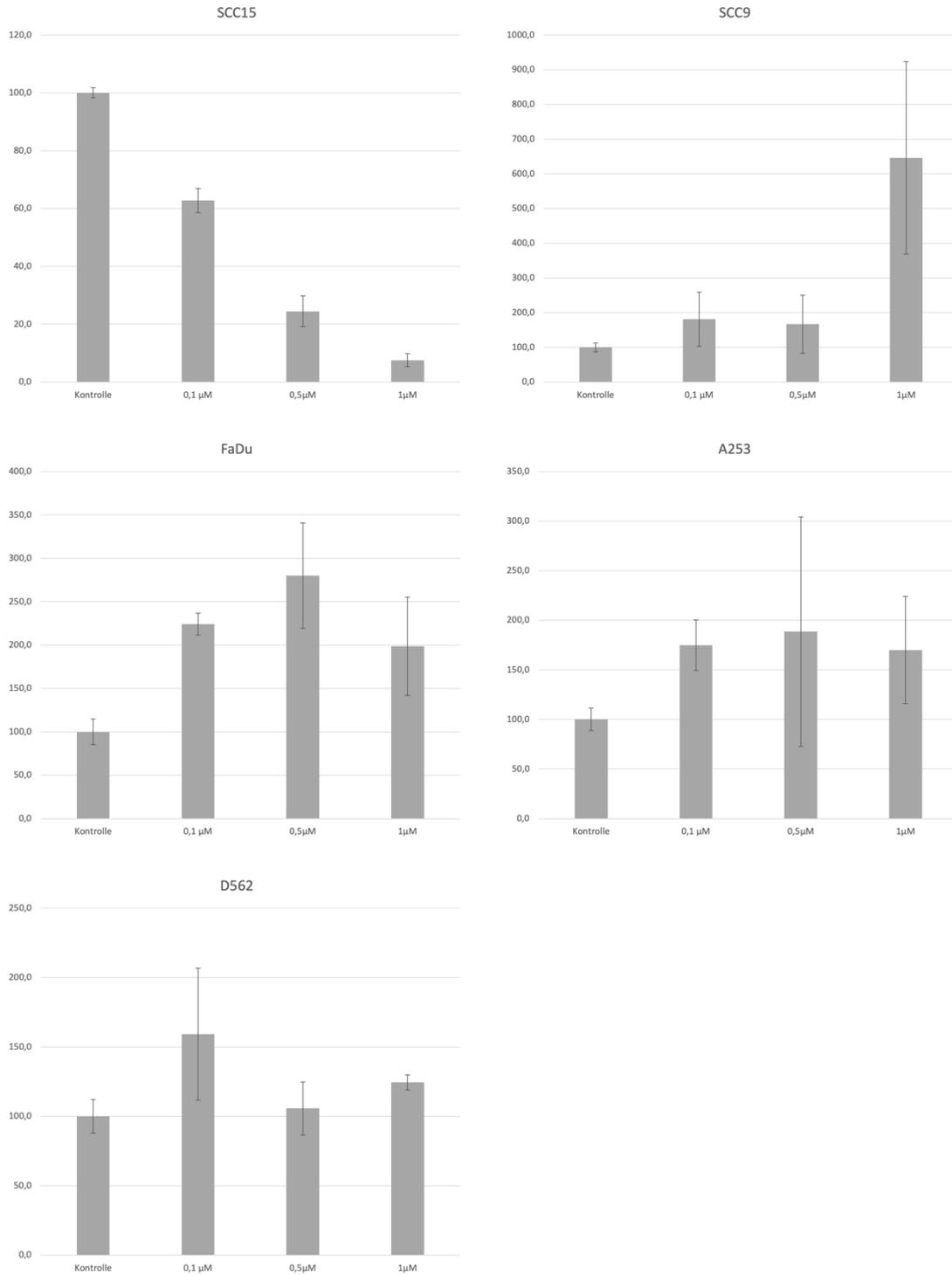


Abbildung 55: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von RANKL in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung.

In Abbildung 55 konnte in den Zellen SCC15 ein kontinuierliches Absinken der Expression von RANKL bis auf weniger als das 0,1-Fache der Kontrolle beobachtet werden. In den Zellen SCC9 dagegen ließ sich ein Anstieg auf das 2-Fache des Ausgangswertes bei den Konzentrationen 0,1 und 0,5 μM erkennen. Bei 1 μM stieg der Wert der Expression auf mehr als das 6-Fache der Kontrolle. In den Zellen FaDu konnte bei einer Konzentration von 0,1 μM ein Anstieg der Konzentration auf mehr als das 2-Fache der Kontrolle beobachtet werden. Bei einer Erhöhung der Konzentration auf 0,5 μM zeigte sich eine Expression, die dem 2,5-3-Fachen der Kontrolle entspricht. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 μM fiel der Wert auf das 2-Fache des Ausgangswertes. Für die Zellen A253 stieg die Expression auf das über 1,5-Fache bei einer Konzentration von 0,1 μM . Der Wert für 0,5 μM lag mit dem 2-Fachen am höchsten, während bei einer Konzentration von 1 μM ein leichtes Absinken unter das 2-Fache der Kontrolle zu erkennen ist. D562 zeigt den höchsten Wert der Expression von RANKL bei einer Konzentration von 0,1 μM auf das 1,5-Fache. Die Werte für die Konzentrationen von 0,5 bzw. 1 μM bewegen sich zwischen dem Ausgangswert und dem 1,5-Fachen desselben.

4.6 Expression von EGFR in der qPCR

Beim gesunden Menschen führt eine Bindung von beispielsweise TGF- α und EGF, die in Makrophagen und Keratinozyten gebildet werden, zu einer Stimulation des EGFR und da einhergehend zu einer Proliferation von Zellen, zum Beispiel im Rahmen der Wundheilung. HNSCC exprimieren den Rezeptor vermehrt und in mutierten Formen. Damit sorgen sie für ein unkontrolliertes Zellwachstum. Eine vermehrte Expression von EGFR ist mit einer schlechteren Überlebensprognose vergesellschaftet.

EGFR

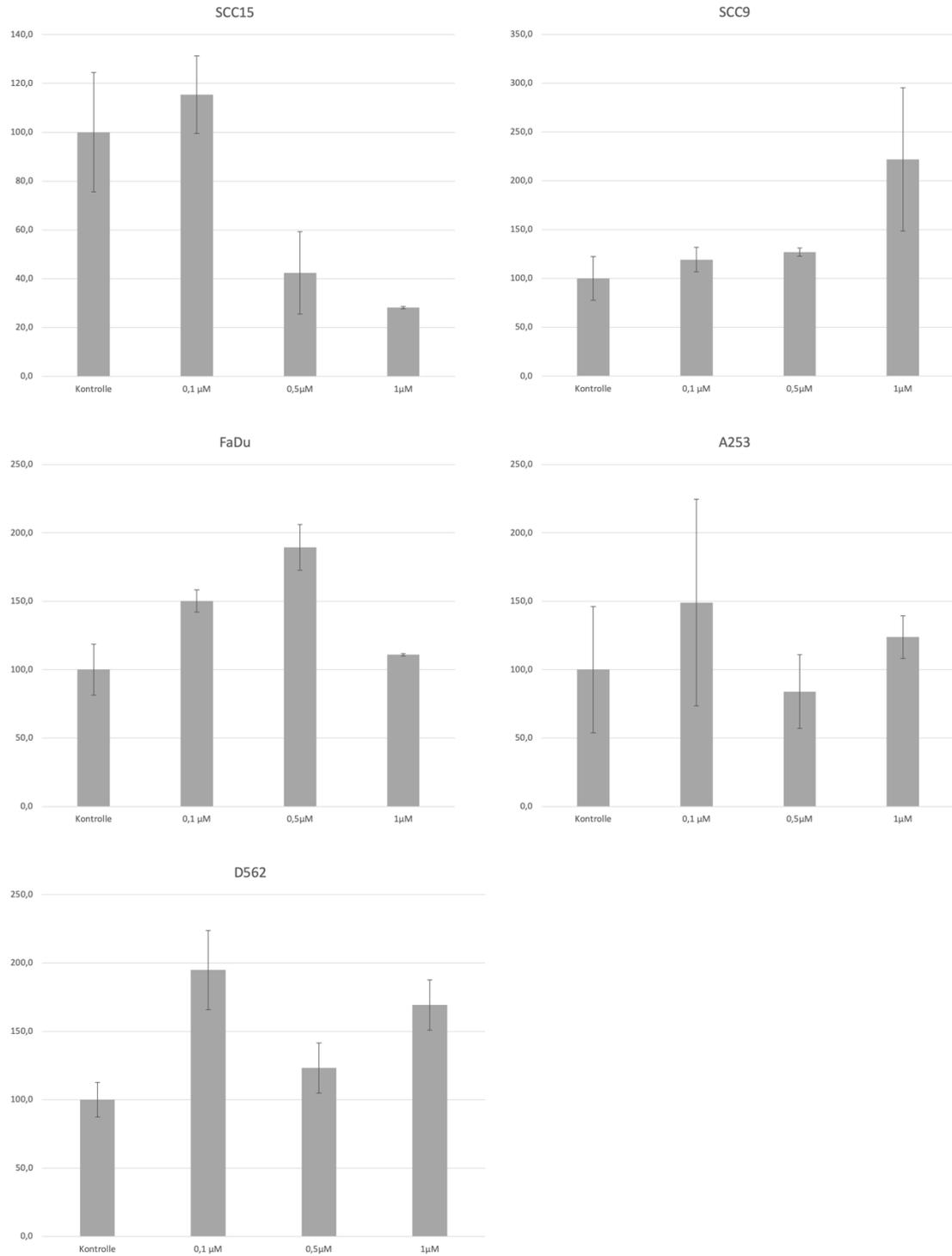


Abbildung 56: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von EGFR in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung.

In Abbildung 56 ist zu erkennen, dass eine Konzentration von 0,1 μM die Expression von EGFR in den Zellen SCC15 auf das 1,2-Fache des Kontrollwerts ansteigen lässt. Erhöhte man die Konzentration weiter auf 0,5 μM , sank die Expression auf das 0,4-Fache der Kontrolle bzw. das 0,3-Fache bei einer eingesetzten Konzentration von 1 μM . Für die Zellen SCC9 konnte ein leichter Anstieg der Expression bis zu einer Konzentration von 0,5 μM bis zum 1,2-Fachen der Kontrolle beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 1 μM fand ein Sprung der Expression auf mehr als das 2-Fache des Ausgangswerts statt. Die Zellen FaDu zeigten einen kontinuierlichen Anstieg der Expression von EGFR bis auf das 2,5-Fache der Kontrolle bei einer Konzentration von 0,5 μM . Bei 1 μM sank die Expression wieder und lag auf dem Niveau der Kontrolle. In den Zellen A253 fand eine Erhöhung der Expression bei einer Konzentration von 0,1 μM auf das 1,5-Fache statt. 0,5 μM führten zu einer Senkung knapp unter den Wert der Kontrolle. Bei 1 μM konnte ein erneuter Anstieg auf das 1,2-Fache beobachtet werden. Die Expression von EGFR in den Zellen D562 zeigte einen sprunghaften Anstieg bei 0,1 μM auf das 2-Fache des Kontrollwertes. Bei höheren Konzentrationen lag der Wert der Expression mit dem 1,2-Fachen bei 0,5 μM und dem 1,7-Fachen bei 1 μM noch immer über dem Wert der Kontrolle.

4.7 Genexpression von VEGFR1

VEGFR1 und 2 sorgen durch eine Stimulation für eine vermehrte Neoangiogenese und eine erhöhte Gefäßpermeabilität. Dies sorgt dafür, dass der Tumor mit einer erhöhten Nährstoffzufuhr ausgestattet wird und ein verbessertes Wachstum generiert. Tumoren können VEGF selbst exprimieren und sorgen damit für eine Überstimulation des VEGFR.

VEGFR1

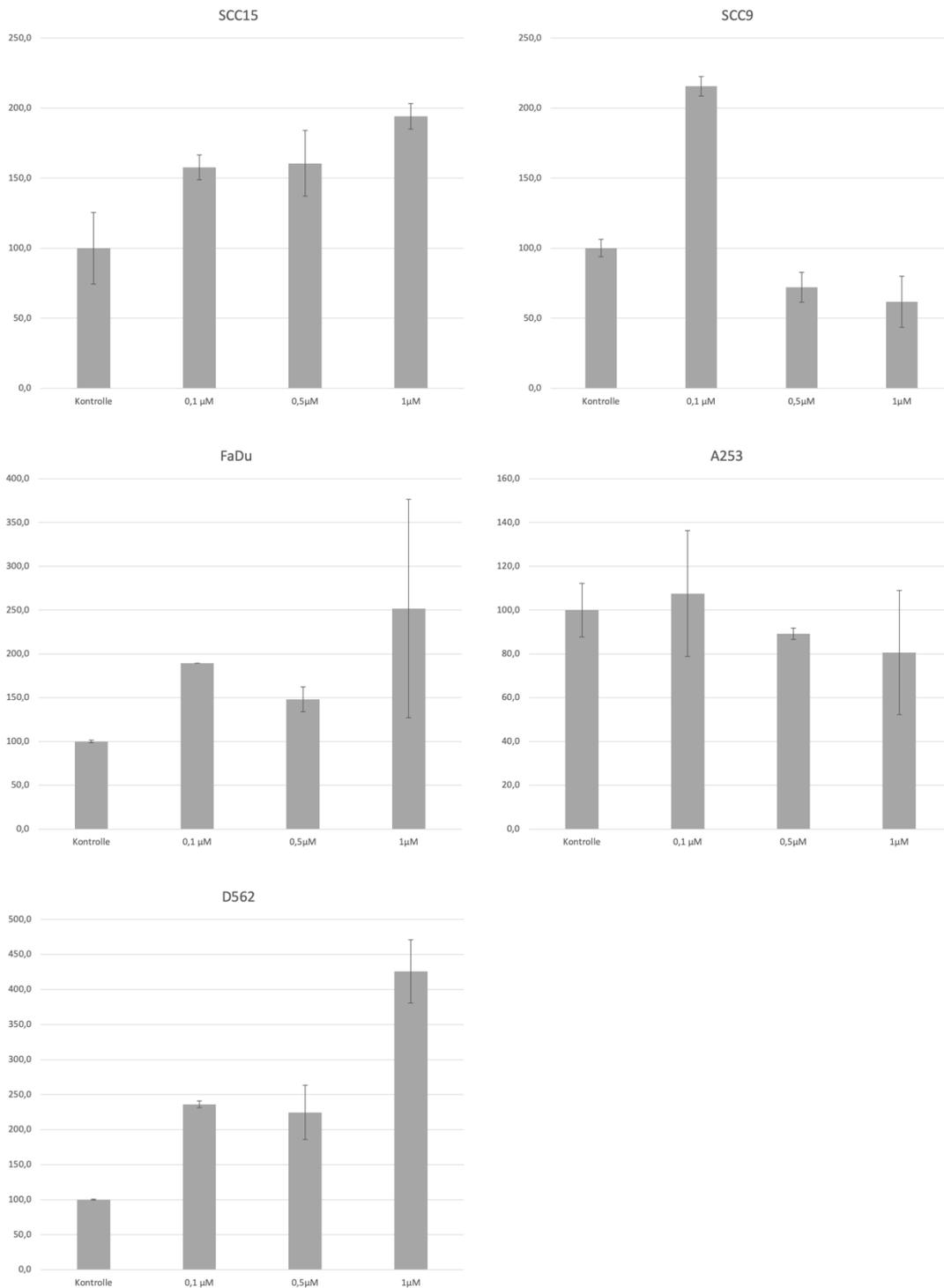


Abbildung 57: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von VEGFR1 in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung.

Die Auswertung von VEGFR1 in Abbildung 57 zeigt ein kontinuierliches Absinken der Expression in den Zellen SCC15 bis auf weniger als das 0,2-Fache des Kontrollwertes bei einer eingesetzten Konzentration von 1 μM . Die Zellen SCC9 zeigten das entgegengesetzte Bild. Hier wurde ein Anstieg der Expression bei 0,1 μM sowie 0,5 μM beobachtet. Bei einer Konzentration von 1 μM stieg der Wert auf das über 6-Fache des Ausgangswertes. Ebenfalls konnte ein Anstieg der Expression von VEGFR in den Zellen FaDu beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 0,1 μM stieg der Wert auf das 2-Fache der Kontrolle. Bei 0,5 μM lag der Wert beim 2,5-3-Fachen, bei 1 μM beim 2-Fachen der Kontrolle. Die Zellen A253 zeigten einen Anstieg bis auf den 2-Fachen Wert der Kontrolle bei einer Konzentration von 0,5 μM und einem leichten Absinken der Expression auf das 1,7-Fache des Ausgangswertes bei 1 μM Propranolol. In den Zellen D562 lag der höchste Wert für die Expression bei einer Konzentration von 0,1 μM beim 1,5-Fachen der Kontrolle. Die Werte bei 0,5 μM und 1 μM lagen im Bereich der Kontrolle und leicht höher beim 1,2-Fachen.

5 Diskussion

5.1 Vorarbeiten und Grundlage

Grundlage dieses Projekts waren Forschungen zu den Einflüssen von adrenergen Faktoren auf die Viabilität von Kopf-Hals-Tumoren. Diese Hormone können die Tumoraktivität sowohl fördern als auch unterdrücken. Nach ausführlicher Recherche wurden die Medikamente Isoprenalin als β -adrenerger Agonist und Propranolol als β -adrenerger Antagonist gewählt. In Brustkrebszellen konnte gezeigt werden, dass Propranolol auch als Agonist am β -AR wirkt.⁹⁰ Für β -AR-Agonisten konnte eine Rezeptor-vermittelte Hemmung der Metastasierung von humanen Brustkrebszellen durch Isoproterenol (Isoprenalin) gezeigt werden.⁹⁸ Ebenfalls konnte für Isoprenalin ein hemmender Effekt auf das Tumorwachstum bei Brustkrebszellen nachgewiesen werden.⁸⁵ Diese Effekte treten auf, da Isoprenalin spezifisch an beta-adrenerge Rezeptoren bindet. Adrenalin, das an eine breitere Palette von Alpha- und Beta-Rezeptoren binden kann, zeigt im Gegensatz dazu diese Effekte nicht. Hier wird eine Verschlechterung der Eigenschaften im Hinblick auf die 5-Jahre-Überlebensrate beobachtet, was darauf hindeutet, dass es die Tumoraktivität fördert, wenn noch andere Rezeptoren involviert sind.⁹⁸ Eine erhöhte Zellproliferation wurde auf die Agonisierung des α -AR zurückgeführt.⁸⁵

In der vorliegenden Arbeit wurde Propranolol als β -AR-Blocker untersucht. In der Literatur werden verschiedene Konzentrationen diskutiert. Konzentrationen von 1 μ M zeigten in Tumoren des Nasopharynx, dem hinteren Bereich der Nasenhöhle, eine Hemmung von Noradrenalin-vermittelten Wachstumsfaktoren durch die Blockade am β -AR.⁸⁷ Überraschend zeigte Propranolol in höheren Konzentrationen ≥ 10 μ M agonistische Effekte am β -AR. Ursprünglich wurde angenommen, dass Propranolol nur die Aktivität von Noradrenalin am Rezeptor hemmt. In Konzentrationen ≥ 100 μ M konnte durch Propranolol der Zellzyklus von Brustkrebszellen in der G0/G1- und S-Phase gestoppt werden und darüber hinaus eine Apoptose der Zellen durch Inaktivierung des ERK1/2-Signalpfads erreicht werden.

Bei Konzentrationen von 10 - 50 μM konnte eine Verringerung der Viabilität gezeigt werden.⁹⁰ Aufgrund dieser Forschungsergebnisse wurde beschlossen, die Wirkung von Propranolol auf Kopf-Hals-Tumoren genauer zu untersuchen. Dabei sollte die Überlebensfähigkeit bei verschiedenen Konzentrationen des Agens getestet und dessen Einfluss auf verschiedene Proteine, die bei der Tumorentstehung, dem Wachstum, so wie der Metastasierung, beteiligt sind, untersucht werden. Die Höhe der Konzentrationen wurde im Rahmen gewählt, bei dem ein Effekt auf die Tumorzellen vermutet wurde.

5.2 Adrenerge Faktoren als Einfluss auf das Überleben von HNSCC

Die Aktivierung von β -AR hat einen Einfluss auf die Angiogenese, die Entzündungsreaktionen, die Zellmotilität und kann Modifikationen auf DNA-Ebene auslösen.⁵⁴ Durch Stress wird eine Ausschüttung von Noradrenalin und Adrenalin erzeugt. Noradrenalin bindet mitunter an β -AR und führt dosisabhängig zu einer Proliferation und Verbesserung der Viabilität von HNSCC und zu einer vermehrten Ausschüttung von Interleukin 6 (IL-6). In Mäusen konnte beispielsweise durch die Gabe eines β -AR-Blockers bei Zungenkarzinomen eine signifikante Reduktion der Tumorgöße im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden.⁵³ In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Propranolol, einem β -AR-Blocker, auf die Viabilität und die, von HNSCC exprimierten Proteine und Gene, untersucht. Eine in-Vitro-Arbeit konnte bei Brustkrebszelllinien in hohen Konzentrationen Propranolol von 100 – 200 μM eine Arretierung des Zellzyklus in der G_0/G_1 und der S-Phase und eine vermehrte Apoptose der Zellen festgestellt werden.⁹⁹ Eine weitere Studie zeigte in Brustkrebszellen, die mit 1 μM Propranolol inkubiert wurden, eine signifikant geringere Zellproliferation.⁹⁰ In der vorliegenden Arbeit wurden Konzentrationen von 0,01 – 100 μM eingesetzt, um Effekte auf HNC-Zellen zu testen. In allen Zellreihen führten dauerhaft hohe Konzentrationen von 100 μM Propranolol zu einem fast vollständigen Absterben der Zellen. In den Zellen D562 führten bereits Konzentrationen von 1 μM zu einem sichtbaren Effekt auf die Zellanzahl. Die Zellen SCC15 zeigten bei einer Inkubation mit 10 μM eine reduzierte Anzahl an lebenden Zellen, wenn das Agens über einen längeren Zeitraum einwirken konnte. Die Zellen FaDu konnten sich nach der Inkubation mit Propranolol

erholen. Dies beweist, dass Propranolol das Zellsterben auslöst. Für die Zellen A253 und SCC9 konnte die gleiche Erholung beobachtet werden. In der Literatur wird vermutet, dass der Effekt von Propranolol nicht allein auf einer antagonistischen Wirkung am β -AR beruht. Die bereits beschriebenen Effekte auf die Proliferation von Brustkrebszellen durch die Inkubation mit 1 μ M Propranolol waren gleich mit dem Effekt, den der β -AR-Agonist Isopenterol in der Konzentration 1 μ M hatte. Die agonistische Wirkung von Propranolol am β_2 -AR konnte bewiesen werden, da die Effekte, die Propranolol in den Zellen auslöste, mit einem selektiven β_2 -AR-Antagonisten inhibiert werden konnten.⁹⁰ In hohen Konzentrationen von 200 μ M wirkte Propranolol bei Brustkrebszellen als Inhibitor der Phosphorylierung von ERK1/2 und einer Verminderung des COX-2 Levels und somit negativ für das Tumorwachstum.⁹⁹ Unsere Arbeit beschäftigte sich mit den direkten Effekten auf das Überleben von HNC-Zellen. Über welchen Mechanismus die sichtbaren und messbaren Effekte funktionieren, sollte die Ausgangslage für neue Studien bilden.

5.3 Adrenerge Faktoren als Einfluss auf die Proliferation und Metastasierung von HNSCC

Im Western Blot-Verfahren wurde die Expression verschiedener tumorassoziierter Proteine nachgewiesen. In der qPCR wurde deren Genexpression erfasst. Die Konzentrationen an Propranolol, welche zum Test verwendet wurden, richteten sich nach aktuellen Studien in Bezug auf den antagonistischen Effekt am β -AR. Die Konzentrationen wurden im niedrigen Bereich gewählt, da vermutlich höhere Konzentrationen Propranolol nicht nur als Antagonist am β -AR sondern über weitere, noch unbekannte Mechanismen, agonistisch wirken, wie es für den Agonist Isoprenalin gezeigt wurde, dessen Wirkmechanismen ebenfalls komplex und vielfältig sind.⁹⁰

5.3.1 Überaktivierung bestimmter Signalwege und deren Beeinflussung durch Propranolol

Wichtiger Faktor für die Zellproliferation ist die Aktivierung bestimmter Signalwege. Diese werden über Rezeptoren wie den EGFR angestoßen. Die Aktivität dieses Rezeptors wird durch adrenerge Stimulierung ausgelöst.¹⁰⁰ In Tumorzellen wird dieser Rezeptor überexprimiert, was zu einem übermäßigen Wachstum führen kann.⁵⁶ Die Literatur gibt Hinweise, dass Propranolol als Agonist am β -AR wirkt. Im Mausmodell führte eine tägliche Gabe Propranolol über zwei Wochen zu einer vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors Egr1 (early growth response factor 1) in Myokardzellen, was auf eine Aktivierung der ERK1/2 zurückzuführen ist. Zum Beweis der agonistischen Wirkung wurde Isopenterol, ein β -AR-Agonist als Kontrolle geführt, welches im gleichen Maße zu einer Aktivierung führte.¹⁰¹ Die Stimulation der Zellproliferation über die ERK1/2 wird durch die Aktivierung von EGFR vermittelt. Eine Studie konnte bei HeLa Zellen (HPV-18-positive Zervixkarzinomzellen) durch den Einfluss von Propranolol eine Verringerung der Motilität von EGFR auf der Zelloberfläche beobachten, bevor der Rezeptor in die Zelle aufgenommen wird. Vermutet wird, dass Propranolol somit einen indirekten Einfluss auf die Internalisierung des EGFR hat.¹⁰² In unseren Versuchen konnte ein Einfluss auf die Expression von EGFR in der qPCR gezeigt werden. FaDu exprimierten bis zu einer Konzentration von 0,5 μ M vermehrt EGFR. Bei 1 μ M sank die Expression wieder ab. Weitere Untersuchungen mit höheren Konzentrationen könnten zeigen, ob die Expression weiter zurückgeht. Die Zellen SCC9 führten bei der höchsten, von uns eingesetzten Konzentration von 1 μ M zu einer deutlich verstärkten Expression von EGFR, wobei in den Zellen SCC15 nach initialem Anstieg ein deutlicher Abfall der Expression festzustellen war. Wir konnten demnach zeigen, dass Propranolol einen direkten Einfluss auf die Expression von EGFR in verschiedenen HNC-Zellen hat. Es wird angenommen, dass die Aktivierung von EGFR möglicherweise die Inaktivierung von GSK3 β nach sich zieht, was zu einer verbesserten Überlebensrate der Zellen führen kann.⁸⁰ In weiteren Studien wird eine Rolle in der DNA-Reparatur für GSK3 β diskutiert. Für den Tumor eine wichtige Funktion für das Umgehen der Apoptose und der damit verbundenen Radioresistenz.⁸¹ Eine Auswertung von Proben aus oralen Karzinomen und gesunden oralen Proben konnte eine verstärkte Expression von GSK3 β in den Tumoren im Vergleich zu den gesunden Proben feststellen, jedoch hatten manche

oralen Karzinome eine erniedrigte Expression von GSK3beta.¹⁰³ Diese Beobachtung deckt sich mit unseren Ergebnissen im Hinblick auf die Expression nach Gabe von Propranolol. Wir konnten in den Zellen SCC15 nach einem initialen Anstieg bei 0,1 µM einen deutlichen Rückgang der Expression beobachten bei höheren Konzentrationen. SCC9-Zellen zeigten einen starken Anstieg bei der höchsten eingesetzten Konzentration Propranolol, obwohl beide Zelllinien aus der gleichen Region entstammen, ist der Einfluss von Propranolol sehr unterschiedlich. Dies spricht allgemein für eine sehr individuelle Reaktion der verschiedenen Zellen. In den Zellen FaDu konnte ein Anstieg der Expression bis 0,5 µM beobachtet werden und ein anschließender Abfall der Expression. Es sollte in weiteren Studien geklärt werden, inwiefern GSK3β in verschiedenen Tumoren als Promotor wirkt oder einen hemmenden Effekt hat.

5.3.2 Einfluss von Propranolol auf Matrixmetalloproteasen als wichtigen Faktor für das Wachstum in umliegendes Gewebe

Matrix Metalloproteasen wie MMP2 und MMP9 gelten als Schlüsselmediatoren für die Invasion von Tumorzellen in benachbarte Gewebestrukturen. MMPs sind für den Abbau der extrazellulären Matrix verantwortlich und ermöglichen somit das Eindringen und Wachstum des Tumors in umliegendes Gewebe.¹⁰⁴ Beobachtungen aus einer In-vitro-Studie zeigen, dass Propranolol in einer Konzentration von 10 µM bei Zellen eines Nasopharynxkarzinoms eine Noradrenalin-vermittelte Steigerung der Expression von MMP2 und MMP9 aufheben konnte.⁸⁷ In unseren Versuchen konnten wir eine Steigerung der Expression von MMP2 in den Zellen FaDu bis zu einer Konzentration von 0,5 µM feststellen. Bei 1 µM fällt die Expression wieder leicht ab. Es bleibt zu untersuchen, ob die Expression bei höheren Konzentrationen weiter abfällt. Die Zellen A253 zeigten einen deutlichen Rückgang der Expression bei der kleinsten Konzentration von 0,1 µM. Danach steigt die Expression wieder leicht an. Eine Konzentration von 0,1 µM kann physiologisch mit einer Gabe von 40 mg Propranolol oral nach wenigen Stunden erreicht werden.¹⁰⁵ Dieses Ergebnis ist somit Anlass zu weiterer Forschung auf dem Gebiet. Die Expression von MMP9 steigt in den Zellen

SCC15, D562 und FaDu stark an. In den Zellen A253 findet ein leichter Rückgang statt und die Zellen SCC9 fallen nach initialem starkem Anstieg wieder auf das Niveau der Kontrolle zurück. Man kann bei den verschiedenen Zellen eine deutlich unterschiedliche Reaktion auf die Inkubation mit Propranolol erkennen. Eine Studie, die Zellen von OSCC untersuchte, konnte in allen ein signifikant höheres Serumlevel an MMP2 und MMP9 feststellen.⁵⁹ Nimmt man die Hinweise der Literatur, dass in HNC-Zellen höhere Expressionen an MMPs vorliegen, kann man davon ausgehen, dass die Inkubation von Propranolol in manchen dieser Zellen, wie wir es gezeigt haben, einen Einfluss auf die Expression hat.

5.3.3 Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch HNSCC nach der Behandlung mit Propranolol

Um Knochen abzubauen, müssen Osteoklasten aktiviert werden. Dies geschieht im gesunden Gewebe im Zusammenspiel mit dem Aufbau neuen Knochens mit Hilfe von Osteoblasten im Gleichgewicht. Wichtige Mediatoren sind dabei Osteoprotegerin (OPG), das an RANKL bindet, um dessen Bindung an seinen Rezeptor RANK zu verhindern, welche eine Knochenresorption initiiert.⁶⁶ HNSCC manipuliert dieses System durch die Überexpression von RANK und RANKL, was zu einer erhöhten Knochenresorption führt.⁶⁵ Eine Beteiligung des β -AR für den Knochenumbau und deren Regulierungen durch Antagonisten wie Propranolol wird ebenfalls diskutiert, jedoch mit kontroversen Ansichten. Eine Studie konnte eine β -AR-vermittelte Knochenregulierung in Biopsien von 38 Patientinnen feststellen.¹⁰⁶ In einer weiteren Untersuchung an Ratten führten geringe Konzentrationen von Propranolol von 1 und 5 mg/kg Körpergewicht p.o. über einen Zeitraum von 12 Wochen zu einer gesteigerten Knochenmasse, ohne einen Einfluss auf den Blutdruck zu haben. Höhere Konzentrationen von 50 und 100 mg/kg Körpergewicht hatten einen Einfluss auf den Blutdruck, ohne messbaren Effekt auf den Knochen.¹⁰⁷ Eine weitere Studie beschäftigte sich mit Knochenmarkern im Serum und konnte keinen Effekt bei einer Dosis von 160 mg Propranolol pro Tag für drei Monate feststellen. Eine Steigerung der Knochendichte konnte ebenfalls nicht ermittelt werden.¹⁰⁸ In OSCC-Zellen führte eine Untersuchung in der qPCR zu dem Ergebnis, dass RANKL in verschiedenen

Isoformen membrangebunden und frei exprimiert wurde.⁶⁴ In unseren Versuchen konnten wir einen Einfluss von Propranolol auf die Expression von OPG und RANKL feststellen. In manchen Zellen kam es zu einer Steigerung, in anderen zu einem Abfall der Expression. Jedoch kann man davon ausgehen, dass die Behandlung von HNC-Zellen mit Propranolol, wie wir es gezeigt haben, zu einer messbaren Reaktion in den Tumorzellen führt.

5.3.4 Einfluss auf die Blutgefäßbildung des Tumors durch Propranolol

Getestet wurde der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Propranolol auf die Expression der Tumorzellen von VEGFR1 und 2, welche eine zentrale Rolle in der Angiogenese spielen. VEGFR1 wird von Krebszellen exprimiert, um eine hohe Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen für ein schnelles Wachstum sicherzustellen und sorgt damit für eine höhere Überlebensrate der Zellen. VEGFR2 wird von Endothelzellen gebildet.⁶¹ In Biopsien aus Glioblastomen konnte eine vermehrte Expression von β_2 -AR festgestellt werden. In-vitro-Versuche konnten eine hemmende Wirkung von Propranolol auf die Tubulogenese dieser Krebszellen feststellen. In der Literatur wird daher ein Zusammenhang zwischen β -adrenergen Signalkaskaden und der Angiogenese des Tumors vermutet.¹⁰⁹ Eine in-vitro-Studie konnte an humanen Endothelzellen zeigen, dass Propranolol dosisabhängig die VEGF-induzierte Proliferation stoppen konnte, in dem es zu einem Abbruch des Zellzyklus in der G₀/G₁-Phase führte, was in einer Apoptose der Zellen resultierte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Propranolol die Tyrosinphosphorylierung des VEGFR2 durch VEGF hemmt. In der gleichen Studie wurde ein regulatorischer Einfluss durch Propranolol auf die Sekretion von MMPs über die VEGFR2 Signalkaskade festgestellt.¹¹⁰ In keiner, der von uns getesteten Zellen konnte der VEGFR2 nachgewiesen werden. Dieser ist laut Literatur Bestandteil der Endothelzellen. Jedoch wird VEGFR2 auch von Karzinoiden exprimiert.¹¹¹ Laut einer Studie kann die Expression von VEGFR2 des Tumorgewebes in Korrelation mit dem Stadium und der Differenzierung von OSCC gebracht werden.¹¹² In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, ob die von uns getesteten HNC-Zellen unter Einfluss von Propranolol eine Änderung der Expression

von VEGF haben. Die Expressionen von VEGFR1 wurden in den von uns untersuchten Zellen dargestellt und es konnte ein Effekt von Propranolol gemessen werden. Je nach Zelllinie fand eine Steigerung oder Abnahme der VEGFR1-Expression statt. Abschließend kann man sagen, dass die HNC-Zellen ihre Vaskularisierung in unseren Versuchen in einem gewissen Maße selbst beeinflussen. Das konnte direkt durch Propranolol beeinflusst werden.

6 Zusammenfassung

Ein bedeutendes Thema der Forschung stellen die Kopf-Hals-Tumoren dar. Trotz enormer Forschung in den letzten Jahren ist die 5-Jahres-Überlebensrate speziell bei den oralen Plattenepithelkarzinomen nicht deutlich gestiegen. In Tumoren werden vermehrt β -AR exprimiert, was darauf schließt, dass der Tumor daraus einen Überlebensvorteil zieht. Der adrenerge Stoffwechsel ist für Zellwachstum und die entzündliche Antwort von Bedeutung. Mit dem β -AR-Antagonisten Propranolol sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der adrenergen Faktoren auf das Wachstum, die Metastasierung und das Überleben des Tumors getestet werden. Die mit Propranolol in verschiedenen Konzentrationen behandelten Zellen zeigten teilweise Reaktionen auf die Adrenozeptor-vermittelte Antwort. Bei hohen Konzentrationen von 100 μ M Propranolol konnte bei allen Zellen ein deutliches Zugrundegehen der Zellen beobachtet werden. Bei solch hohen Konzentrationen ist anzunehmen, dass Propranolol nicht allein als β -AR-Antagonist wirkt, sondern zusätzlich über Agonisierung und andere, noch nicht geklärte Mechanismen. Bei einigen Zellen fanden bereits morphologische Veränderungen statt, wenn die Konzentration unter 100 μ M gewählt wurde. Der Einfluss auf die Expression von Proteinen, die den Zellen ermöglicht, verstärkt Signalwege anzustoßen, wodurch das Wachstum und die Metastasierung des Tumors verbessert werden, konnten wir zeigen. Nachgewiesen wurden diese Proteine und Gene mittels Western-Blot und qPCR. Hierbei wurden Konzentrationen von Propranolol im Bereich von 0,1 μ M – 100 μ M gewählt, um die erfolgten Reaktionen auf die Wirkung am β -AR zurückzuführen. Ein deutlicher Einfluss von Propranolol bei verschiedenen Zellreihen konnte in einem deutlichen Anstieg oder Abfall der Expression beobachtet werden. Abschließend ist festzuhalten, dass wir einen Einfluss von Propranolol als β -AR-Antagonist auf verschiedene Tumorzellen aus dem Kopf-Hals-Bereich feststellen konnten. Jede Tumorzelle reagiert in unterschiedlicher Weise auf die Behandlung mit Propranolol und zeigt Auswirkungen auf Ebene der Protein- und Genexpression.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dargestellt ist die Funktionsweise des G-Protein gekoppelten Rezeptors. Hier am Beispiel des β 2-AR dargestellt.	14
Abbildung 2: Platte 1 mit Behandlungsschema zur Lebend-Tod-Färbung	42
Abbildung 3: Platte 2 mit Behandlungsschema zur Lebend-Tod-Färbung	42
Abbildung 4: Platte 3 mit Behandlungsschema zur Lebend-Tod-Färbung	43
Abbildung 5: Dargestellt ist der Aufbau der einzelnen Elemente im Wet-Blot.....	48
Abbildung 6: Grafisch ist hier das Zyklusprotokoll der qPCR im AriaMx zu sehen. ...	56
Abbildung 7: Zelllinie D562, Lebende Zellen mit Calcein AM sind grün, tote Zellen mit Ethidiumbromid rot angefärbt. Darstellung der Toxizität von DMSO für die Zellen. Vergrößerung 10-Fach.	58
Abbildung 8: Versuchsaufbau schematisch dargestellt. HNC-Zellen in jeweils vier Wells wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Propranolol behandelt. ...	59
Abbildung 9: A) Eng zusammenhängende Zellverbände ohne Inkubation mit Propranolol und Auflösen der Zellverbände nach 16 h Inkubation mit 10 μ M (kleine Pfeile, B), beispielhaft anhand der Zelllinie D562 dargestellt. Vergrößerung 10-Fach	59
Abbildung 10: Anfärbung lebender Zellen in grün, toter Zellen in Rot. Beispielhaft an der Zelllinie A253 gezeigt. Vergrößerung 10-Fach.....	60
Abbildung 11: Lebend-Tot-Färbung der Zellen D562 nach 16 h Behandlung mit Propranolol in den Konzentrationen 0 – 100 μ M. Aufnahmen von jeweils vier Wells für jede eingesetzte Konzentration. Vergrößerung 10-Fach.....	61
Abbildung 12: Auswertung der Zellanzahl für spezifische Konzentrationen Propranolol nach 16 h Behandlung.....	62

Abbildung 13: Lebend-Tot-Färbung der Zellen D562 nach 16h Behandlung und anschließender Kultur für 54 h ohne Propranolol Zusatz. Vergrößerung 10-Fach....	63
Abbildung 14: Auswertung der Zellanzahl nach 16 h Behandlung und anschließender Kultur für 54 h ohne Propranolol.....	64
Abbildung 15: Lebend-Tot-Färbung der Zellen D562 nach 72 h Behandlung inklusive 1x Medienwechsel mit entsprechenden Propranolol Konzentrationen. Vergrößerung 10-Fach.	65
Abbildung 16: Quantitative Auswertung nach 72 h Behandlung inklusive 1x Medienwechsel mit Propranolol nach 16 h.....	66
Abbildung 17: Lebend-Tot-Färbung der Zellen SCC9 nach 16h Behandlung. Vergrößerung 10-Fach.	67
Abbildung 18: Auswertung der Zellanzahl für spezifische Konzentrationen Propranolol nach 16 h Behandlung.....	68
Abbildung 19: Lebend-Tot-Färbung der Zellen SCC9 nach 16h Behandlung und anschließender Kultur für 54 h ohne Propranolol Zusatz. Vergrößerung 10-Fach....	69
Abbildung 20: Auswertung der Zellanzahl nach 16 h Behandlung und anschließender Kultur für 54 h ohne Propranolol.....	70
Abbildung 21: Lebend-Tot-Färbung der Zellen SCC9 nach 72 h Behandlung inklusive 1x Medienwechsel mit entsprechenden Propranolol Konzentrationen. Vergrößerung 10-Fach.	71
Abbildung 22: Quantitative Auswertung nach 72 h Behandlung inklusive 1x Medienwechsel mit Propranolol nach 16 h.....	72
Abbildung 23: Lebend-Tot-Färbung der Zellen SCC15 nach 16h Behandlung. Vergrößerung 10-Fach.	73

Abbildung 24: Auswertung der Zellanzahl für spezifische Konzentrationen Propranolol nach 16 h Behandlung.....	74
Abbildung 25: Lebend-Tot-Färbung der Zellen SCC15 nach 16h Behandlung und anschließender Kultur für 54 h ohne Propranolol Zusatz. Die Kontrolle fehlt. Vergrößerung 10-Fach.	75
Abbildung 26: Auswertung der Zellanzahl nach 16 h Behandlung und anschließender Kultur für 54 h ohne Propranolol.....	76
Abbildung 27: Lebend-Tot-Färbung der Zellen SCC15 nach 72 h Behandlung inklusive 1x Medienwechsel mit entsprechenden Propranolol Konzentrationen. Vergrößerung 10-Fach.	77
Abbildung 28: Quantitative Auswertung nach 72 h Behandlung inklusive 1x Medienwechsel mit Propranolol nach 16 h.....	78
Abbildung 29: Lebend-Tot-Färbung der Zellen A253 nach 16h Behandlung. Vergrößerung 10-Fach.	79
Abbildung 30: Auswertung der Zellanzahl für spezifische Konzentrationen Propranolol nach 16 h Behandlung.....	80
Abbildung 31: Lebend-Tot-Färbung der Zellen A253 nach 16h Behandlung und anschließender Kultur für 54 h ohne Propranolol Zusatz. Vergrößerung 10-Fach....	81
Abbildung 32: Auswertung der Zellanzahl nach 16 h Behandlung und anschließender Kultur für 54 h ohne Propranolol.....	82
Abbildung 33: Lebend-Tot-Färbung der Zellen A253 nach 72 h Behandlung inklusive 1x Medienwechsel mit entsprechenden Propranolol Konzentrationen. Vergrößerung 10-Fach.	83
Abbildung 34: Quantitative Auswertung nach 72 h Behandlung inklusive 1x Medienwechsel mit Propranolol nach 16 h.....	84

Abbildung 35: Lebend-Tot-Färbung der Zellen FaDu nach 16h Behandlung. Vergrößerung 10-Fach.	85
Abbildung 36: Auswertung der Zellanzahl für spezifische Konzentrationen Propranolol nach 16 h Behandlung.....	86
Abbildung 37: Lebend-Tot-Färbung der Zellen FaDu nach 16h Behandlung und anschließender Kultur für 54 h ohne Propranolol Zusatz. Vergrößerung 10-Fach....	87
Abbildung 38: Auswertung der Zellanzahl nach 16 h Behandlung und anschließender Kultur für 54 h ohne Propranolol.....	88
Abbildung 39: Lebend-Tot-Färbung der Zellen FaDu nach 72 h Behandlung inklusive 1x Medienwechsel mit entsprechenden Propranolol Konzentrationen. Vergrößerung 10-Fach.	89
Abbildung 40: Quantitative Auswertung nach 72 h Behandlung inklusive 1x Medienwechsel mit Propranolol nach 16 h.....	90
Abbildung 41: A) Western Blot von E-Cadherin mit β -Aktin als Ladekontrolle für verschiedene Konzentrationen Propranolol B) Semiquantitative Auswertung der Western Blots zur Analyse der Proteinexpression von E-Cadherin in der Zelllinie D562.	93
Abbildung 42: A) Western Blot von E-Cadherin mit β -Aktin als Ladekontrolle B) Semiquantitative Auswertung der Western Blots zur Analyse der Proteinexpression von E-Cadherin in der Zelllinie SCC9.....	94
Abbildung 43: A) Western Blot von P-Cadherin mit β -Aktin als Ladekontrolle B) Semiquantitative Auswertung der Western Blots zur Analyse der Proteinexpression von P-Cadherin in der Zelllinie D562.....	95
Abbildung 44: A) Western Blot von P-Cadherin mit β -Aktin als Ladekontrolle B) Semiquantitative Auswertung der Western Blots zur Analyse der Proteinexpression von P-Cadherin in der Zelllinie SCC9.....	96

Abbildung 45: A) Western Blot von CD44 mit β -Aktin als Ladekontrolle B) Semiquantitative Auswertung der Western Blots zur Analyse der Proteinexpression von CD44 in der Zelllinie SCC15.....	97
Abbildung 46: A) Western Blot von CD44 mit β -Aktin als Ladekontrolle B) Semiquantitative Auswertung der Western Blots zur Analyse der Proteinexpression von CD44 in der Zelllinie D562.....	97
Abbildung 47: Western Blots von Twist mit β -Aktin als Ladekontrolle exemplarisch gezeigt anhand der Zellen D562 (A) und SCC15 (B).	98
Abbildung 48: A) Western Blot von GSK3 β mit β -Aktin als Ladekontrolle B) Semiquantitative Auswertung der Western Blots zur Analyse der Proteinexpression von GSK3 β in der Zelllinie SCC15.	99
Abbildung 49: A) Western Blot von GSK3 β mit β -Aktin als Ladekontrolle B) Semiquantitative Auswertung der Western Blots zur Analyse der Proteinexpression von GSK3 β in der Zelllinie D562.	100
Abbildung 50: A) Western Blot von GSK3 β mit β -Aktin als Ladekontrolle B) Semiquantitative Auswertung der Western Blots zur Analyse der Proteinexpression von GSK3 β in der Zelllinie SCC9.	100
Abbildung 51: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von GSK3beta in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung.	103
Abbildung 52: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von MMP2 in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung.	105
Abbildung 53: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von MMP9 in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung.	107
Abbildung 54: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von OPG in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung.	109

Abbildung 55: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von RANKL in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung. 111

Abbildung 56: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von EGFR in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung. 113

Abbildung 57: Taqman quantitative real time PCR der Genexpression von VEGFR1 in allen Zelllinien in den entsprechenden Konzentrationen mit Standardabweichung. 115

8 Abkürzungsverzeichnis

α -AR *alpha-Adrenozeptoren, beta-Adrenozeptoren*

% *Prozent*

°C *Grad Celsius*

AG *Arbeitsgruppe*

AMP *Adenosinmonophosphat*

APS *Ammoniumpersulfat*

BSA *Bovines Serumalbumin*

CA *Carcinoma - Karzinom*

Calcein-AM *Calcein-acetoxymethylester*

cAMP *Cyclisches Adenosinmonophosphat*

CD44 *Cluster of differentiation 44*

CDKNA2 *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*

cDNA *komplementäre Desoxyribonukleinsäure*

COPD *chronic obstructive pulmonary disease - chronisch obstruktive Lungenerkrankung*

COX-2 *Cyclooxygenase-2*

CT *Computertomographie*

CT-Werte *cycle threshold*

DMEM *Dulbeccos Modified Eagle Medium*

DMSO *Dimethylsulfoxid*

DNA *deoxyribonucleic acid - Desoxyribonukleinsäure*

DPBS *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

E-Cadherin *epitheliales Cadherin*

EDTA *Ethylendiamintetraacetat*

EGF *Epidermal growth factor*

EGFR *Epidermal growth factor receptor*

Egr1 *early growth response factor*

EMT *epithelial-mesenchymalen Transition, Epithelial-mesenchymal Transition*

ERK1/2 *extracellular-signal regulated kinase 1/2*

ESA *epithel-spezifisches Antigen*

EtOH *Ethanol*

FBS *Fetal Bovine Serum*

GDP *Guanosindiphosphat*

GPCR *G-Protein-gekoppelter Rezeptor*

GSK3 β *Glykogensynthase-Kinase 3 beta*

GTP *Guanosintriphosphat*

h *Stunde*

H₂O *Wasser*

HeLa Zellen *HPV-18-positive Zervixkarzinomzellen von Henrietta Lacks - erste permanente menschliche Zelllinie*

HNC *head and neck cancer*

HNSCC *Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma*

HPV *Humanes Papillomavirus*

IL-6 *Interleukin 6*

kDa *Kilodalton*

KDM5C *Lysin-spezifische Demethylase 5C*

mA *Milliampere*

MAPK *Mitogen-activated protein kinase*

MeOH *Methanol*

mg *Milligramm*

ml *Milliliter*

mm *Millimeter*

mM *Millimol/Liter*

MMP *Matrix-Metalloproteasen*

mTOR *mechanistic target of Rapamycin*

NaCl *Natriumchlorid - Kochsalz*

ng *Nanogramm*

OPG *Osteoprotegerin*

OSCC *Oral squamous cell carcinoma*

p.o. *Per os*

PBS *Phosphate Buffered Saline*

P-Cadherin *plazentales Cadherin*

PD-1 *Programmed cell death 1*

PDE *Nukleotid-Phosphodiesterasen*

PDL1 *Programmed cell death 1 ligand 1*

PIK3CA *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-kinase, katalytische Alpha-Untereinheit*

PIP₃ *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat*

PKB *Proteinkinase B*

PMD *potentially malignant disorders*

PNMT *Phenylethanolamin-N-Methyltransferase*

PP2A *Proteinphosphatase 2A*

pRb *Retinoblastomprotein*

Propranolol *1-isopropylamino-3-(naphthyloxy)propan-2-ol hydrochloride*

PTEN *Phosphatase and Tensin homolog*

PVDF *Polyvinylidenfluorid*

qPCR *quantitative Polymerase Kettenreaktion*

RANK *Receptor Activator of NF- κ B*

RANKL *RANK-Ligand*

RNA *Ribonukleinsäure, Ribonucleic acid - Ribonukleinsäure*

rpm *Umdrehungen pro Minute*

SDS *Sodiumdodecylsulfat*

SDS-PAGE *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese*

sec *Sekunden*

TBS *Tris-buffered saline*

TBST *Tris-buffered saline with Tween20*

TEMED *N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin*

TGF- α *Transforming growth factor alpha*

TH *Tyrosinhydroxylase*

TNF *Tumornekrosefaktor*

TNM *T=Tumor, N=Nodal status, M=Metastases*

Tris *Tris(hydroxymethyl)aminomethan*

TWEEN® 20 *Polysorbat 20*

U/ μ l *Units/Mikroliter*

V *Volt*

VEGFR *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

μ g *Mikrogramm*

μ l *Mikroliter*

μM *Mikromol/Liter*

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien.....	24
Tabelle 2: Kulturmedium.....	25
Tabelle 3: Kits.....	25
Tabelle 4: Reagenzien und Lösungen.....	25
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 6: Geräte.....	29
Tabelle 7: Trypsin-EDTA, 1x, 50 ml.....	31
Tabelle 8: Lebend- und Todfärbung	31
Tabelle 9: Lämmli-Puffer, 5x.....	32
Tabelle 10: Acrylamid-Trenngel 10 %, 1,5 mm dick	32
Tabelle 11: Acrylamid-Sammelgel 4 %, 1,5 mm dick	33
Tabelle 12: SDS-PAGE Elektrodenpuffer, 10x	33
Tabelle 13: SDS-PAGE Elektrodenpuffer, 1x	33
Tabelle 14: Blotpuffer, 10x.....	33
Tabelle 15: Blotpuffer, 1x.....	34
Tabelle 16: TBS, 10x pH 7,5	34
Tabelle 17: TBST, 1x.....	34
Tabelle 18: 3 % BSA	34

Tabelle 19: 5 % Milch	35
Tabelle 20: Antikörperlösung 5 % Milch	35
Tabelle 21: Antikörperlösung 3 % BSA	35
Tabelle 22: Primärantikörper	36
Tabelle 23: Sekundärantikörper	36
Tabelle 24: Primer & Sonden	37
Tabelle 25: Software.....	38
Tabelle 26: Verwendete Primärantikörper	50
Tabelle 27: Verwendete Sekundärantikörper	51
Tabelle 28: Cycle Protokoll.....	54
Tabelle 29: verwendete Gene für die qPCR.....	54
Tabelle 30: Proteine zum Nachweis im Western Blot.....	92
Tabelle 31: Gene zum Nachweis in der qPCR	101

10 Literaturverzeichnis

1. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11884-11894.
2. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primer*. 2020;6(1):92. doi:10.1038/s41572-020-00224-3
3. Cohen EEW, Bell RB, Bifulco CB, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):184. doi:10.1186/s40425-019-0662-5
4. Paré A, Joly A. [Oral cancer: Risk factors and management]. *Presse Medicale Paris Fr 1983*. 2017;46(3):320-330. doi:10.1016/j.lpm.2017.01.004
5. Jethwa AR, Khariwala SS. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(3):411-423. doi:10.1007/s10555-017-9689-6
6. Shao XJ, Zhu Q, Liu Y, Han XD, Lin XZ, Xi Q. [Correlation of betel nut chewing and clinicopathologic factors of oral squamous cell carcinoma]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue Shanghai J Stomatol*. 2021;30(3):268-272.
7. Ai L, Stephenson KK, Ling W, et al. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2003;16(9):944-950. doi:10.1097/01.MP.0000085760.74313.DD
8. Zhou G, Liu Z, Myers JN. TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *J Cell Biochem*. 2016;117(12):2682-2692. doi:10.1002/jcb.25592
9. Dhingra V, Verma J, Misra V, Srivastav S, Hasan F. Evaluation of Cyclin D1 expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagn Res JCDR*. 2017;11(2):EC01-EC04. doi:10.7860/JCDR/2017/21760.9329
10. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JFM. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8(3):187-198. doi:10.2174/156800908784293659
11. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*. 2014;4:64. doi:10.3389/fonc.2014.00064
12. Yete S, D'Souza W, Saranath D. High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cancer: Clinical Implications. *Oncology*. 2018;94(3):133-141. doi:10.1159/000485322

13. Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol.* 2017;28(10):2386-2398. doi:10.1093/annonc/mdx304
14. Komlós G, Csurgay K, Horváth F, Pelyhe L, Németh Z. Periodontitis as a risk for oral cancer: a case–control study. *BMC Oral Health.* 2021;21:640. doi:10.1186/s12903-021-01998-y
15. Singhvi HR, Malik A, Chaturvedi P. The Role of Chronic Mucosal Trauma in Oral Cancer: A Review of Literature. *Indian J Med Paediatr Oncol Off J Indian Soc Med Paediatr Oncol.* 2017;38(1):44-50. doi:10.4103/0971-5851.203510
16. Gupta AA, Kheur S, Varadarajan S, et al. Chronic mechanical irritation and oral squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Bosn J Basic Med Sci.* 2021;21(6):647-658. doi:10.17305/bjbms.2021.5577
17. Kumar. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. Accessed April 30, 2022. <https://www.cancerjournal.net/article.asp?issn=0973-1482;year=2016;volume=12;issue=2;spage=458;epage=463;aualast=Kumar>
18. Dhanuthai K, Rojanawatsirivej S, Thosaporn W, et al. Oral cancer: A multicenter study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2018;23(1):e23-e29. doi:10.4317/medoral.21999
19. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated Head and Neck Cancer: A Virus-related Cancer Epidemic – A Review of Epidemiology, Biology, Virus Detection and Issues in Management. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):781-789. doi:10.1016/S1470-2045(10)70017-6
20. Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human Papillomavirus and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res.* 2009;88(4):300-306. doi:10.1177/0022034509333371
21. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, et al. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis.* 2021;27(8):1862-1880. doi:10.1111/odi.13704
22. Carrard VC, van der Waal I. A clinical diagnosis of oral leukoplakia; A guide for dentists. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2018;23(1):e59-e64. doi:10.4317/medoral.22292
23. Maia HC de M, Pinto NAS, Pereira J dos S, de Medeiros AMC, da Silveira ÉJD, Miguel MC da C. Potentially malignant oral lesions: clinicopathological correlations. *Einstein.* 2016;14(1):35-40. doi:10.1590/S1679-45082016AO3578
24. Bugshan A, Farooq I. Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis. *F1000Research.* 2020;9:229. doi:10.12688/f1000research.22941.1

25. Wong T, Wiesenfeld D. Oral Cancer. *Aust Dent J*. 2018;63(S1):S91-S99. doi:10.1111/adj.12594
26. Gonzalez M, Riera March A. Tongue Cancer. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2022. Accessed April 30, 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562324/>
27. Du E, Mazul AL, Farquhar D, et al. Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. *The Laryngoscope*. 2019;129(11):2506-2513. doi:10.1002/lary.27807
28. Abati S, Bramati C, Bondi S, Lissoni A, Trimarchi M. Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(24):9160. doi:10.3390/ijerph17249160
29. Montero PH, Patel SG. CANCER OF THE ORAL CAVITY. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3):491-508. doi:10.1016/j.soc.2015.03.006
30. Koyfman SA, Ismaila N, Crook D, et al. Management of the Neck in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity and Oropharynx: ASCO Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2019;37(20):1753-1774. doi:10.1200/JCO.18.01921
31. De Felice F, Tombolini V, Valentini V, et al. Advances in the Management of HPV-Related Oropharyngeal Cancer. *J Oncol*. 2019;2019:9173729. doi:10.1155/2019/9173729
32. Gillison ML, Trotti AM, Harris J, et al. Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin for human papillomavirus (HPV)-positive oropharyngeal cancer: a randomized, multicenter, non-inferiority clinical trial. *Lancet Lond Engl*. 2019;393(10166):40-50. doi:10.1016/S0140-6736(18)32779-X
33. Lv X, Zheng X, Yu J, Ma H, Hua C, Gao R. EGFR enhances the stemness and progression of oral cancer through inhibiting autophagic degradation of SOX2. *Cancer Med*. 2019;9(3):1131-1140. doi:10.1002/cam4.2772
34. Petrovic I, Rosen EB, Matros E, Huryn JM, Shah JP. ORAL REHABILITATION OF THE CANCER PATIENT. *J Surg Oncol*. 2018;117(8):1729-1735. doi:10.1002/jso.25075
35. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3):727-742.
36. Kwok G, Yau TCC, Chiu JW, Tse E, Kwong YL. Pembrolizumab (Keytruda). *Hum Vaccines Immunother*. 2016;12(11):2777-2789. doi:10.1080/21645515.2016.1199310

37. Zanoni DK, Montero PH, Migliacci JC, et al. SURVIVAL OUTCOMES AFTER TREATMENT OF CANCER OF THE ORAL CAVITY (1985-2015). *Oral Oncol.* 2019;90:115-121. doi:10.1016/j.oraloncology.2019.02.001
38. Sharma D, Farrar JD. Adrenergic regulation of immune cell function and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2020;42(6):709-717. doi:10.1007/s00281-020-00829-6
39. Alcántara-Hernández R, Hernández-Méndez A. Adrenergic signaling molecular complexes. *Gac Med Mex.* 2018;154(2):223-235. doi:10.24875/GMM.18002390
40. Weis WI, Kobilka BK. The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem.* 2018;87:897-919. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-033910
41. Rasmussen SGF, DeVree BT, Zou Y, et al. Crystal Structure of the β 2Adrenergic Receptor-Gs protein complex. *Nature.* 2011;477(7366):549-555. doi:10.1038/nature10361
42. Perez DM, Doze VA. Cardiac and neuroprotection regulated by α 1-adrenergic receptor subtypes. *J Recept Signal Transduct Res.* 2011;31(2):98-110. doi:10.3109/10799893.2010.550008
43. Lee S. Dexmedetomidine: present and future directions. *Korean J Anesthesiol.* 2019;72(4):323-330. doi:10.4097/kja.19259
44. Steinberg SF. BETA1-ADRENERGIC RECEPTOR REGULATION REVISITED; THE ROLE OF THE EXTRACELLULAR N-TERMINUS. *Circ Res.* 2018;123(11):1199-1201. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313884
45. Alhayek S, Preuss CV. Beta 1 Receptors. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2022. Accessed May 7, 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532904/>
46. Jean-Charles PY, Kaur S, Shenoy SK. GPCR signaling via β -arrestin-dependent mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2017;70(3):142-158. doi:10.1097/FJC.0000000000000482
47. Billington CK, Penn RB, Hall IP. β 2-agonists. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;237:23-40. doi:10.1007/164_2016_64
48. Fumagalli C, Maurizi N, Marchionni N, Fornasari D. β -blockers: Their new life from hypertension to cancer and migraine. *Pharmacol Res.* 2020;151:104587. doi:10.1016/j.phrs.2019.104587
49. Sivamani RK, Shi B, Griffiths E, et al. Acute wounding alters the beta2-adrenergic signaling and catecholamine synthetic pathways in keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2014;134(8):2258-2266. doi:10.1038/jid.2014.137
50. Sivamani RK, Lam ST, Isseroff RR. Beta Adrenergic Receptors in Keratinocytes. *Dermatol Clin.* 2007;25(4):643-x. doi:10.1016/j.det.2007.06.012

51. Yang H ya, Steenhuis P, Glucksman AM, Gurenko Z, La TD, Isseroff RR. Alpha and beta adrenergic receptors modulate keratinocyte migration. *PLoS ONE*. 2021;16(7):e0253139. doi:10.1371/journal.pone.0253139
52. Cahn BA, Kaur R, Hirt PA, et al. Use of Topical Timolol Maleate as Re-Epithelialization Agent for Treatment of Recalcitrant Wounds of Varying Etiologies. *J Drugs Dermatol JDD*. 2020;19(12):1252-1256. doi:10.36849/JDD.2020.5306
53. Kwon SY, Chun KJ, Kil HK, et al. β 2-adrenergic receptor expression and the effects of norepinephrine and propranolol on various head and neck cancer subtypes. *Oncol Lett*. 2021;22(5):804. doi:10.3892/ol.2021.13065
54. Cole SW, Sood AK. Molecular Pathways: Beta-adrenergic signaling in cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(5):1201-1206. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0641
55. Rajaram P, Chandra P, Ticku S, Pallavi B, Rudresh K, Mansabdar P. Epidermal growth factor receptor: Role in human cancer. *Indian J Dent Res*. 2017;28(6):687. doi:10.4103/ijdr.IJDR_534_16
56. Abu-Humaidan AHA, Ekblad L, Wennerberg J, Sørensen OE. EGFR modulates complement activation in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2020;20:121. doi:10.1186/s12885-020-6615-z
57. Nair S, Bonner JA, Bredel M. EGFR Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7):3818. doi:10.3390/ijms23073818
58. Duda P, Akula SM, Abrams SL, et al. Targeting GSK3 and Associated Signaling Pathways Involved in Cancer. *Cells*. 2020;9(5):1110. doi:10.3390/cells9051110
59. Lotfi A, Mohammadi G, Tavassoli A, mousaviagdas M, Chavoshi H, Saniee L. Serum Levels of MMP9 and MMP2 in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(4):1327-1330. doi:10.7314/APJCP.2015.16.4.1327
60. Nishio K, Motozawa K, Omagari D, et al. Comparison of MMP2 and MMP9 expression levels between primary and metastatic regions of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci*. 2016;58(1):59-65. doi:10.2334/josnusd.58.59
61. Liu G, Chen T, Ding Z, Wang Y, Wei Y, Wei X. Inhibition of FGF-FGFR and VEGF-VEGFR signalling in cancer treatment. *Cell Prolif*. 2021;54(4):e13009. doi:10.1111/cpr.13009
62. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):139-146. doi:10.1016/j.abb.2008.03.018
63. Jimi E, Shin M, Furuta H, Tada Y, Kusakawa J. The RANKL/RANK system as a therapeutic target for bone invasion by oral squamous cell carcinoma (Review). *Int J Oncol*. 2013;42(3):803-809. doi:10.3892/ijo.2013.1794

64. Zhang X, Rossa C, Liu M, Li F, D'Silva NJ, Kirkwood KL. Oral Squamous Carcinoma Cells Secrete RANKL Directly Supporting Osteolytic Bone Loss. *Oral Oncol.* 2013;49(2):119-128. doi:10.1016/j.oraloncology.2012.08.004
65. Sambandam Y, Ethiraj P, Hathaway-Schrader JD, et al. Autoregulation of RANK ligand in oral squamous cell carcinoma tumor cells. *J Cell Physiol.* 2018;233(8):6125-6134. doi:10.1002/jcp.26456
66. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(Suppl 1):S1. doi:10.1186/ar2165
67. Shin M, Matsuo K, Tada T, et al. The inhibition of RANKL/RANK signaling by osteoprotegerin suppresses bone invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2011;32(11):1634-1640. doi:10.1093/carcin/bgr198
68. Noguti J, Moura CFGD, Jesus GPPD, et al. Metastasis from Oral Cancer: An Overview. *Cancer Genomics Proteomics.* 2012;9(5):329-335.
69. de Freitas Silva BS, Yamamoto-Silva FP, Pontes HAR, Pinto Júnior D dos S. E-cadherin downregulation and Twist overexpression since early stages of oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2014;43(2):125-131. doi:10.1111/jop.12096
70. Hung KF, Chang CS, Liu CJ, Lui MT, Cheng CY, Kao SY. Differential expression of E-cadherin in metastatic lesions comparing to primary oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(10):589-594. doi:10.1111/j.1600-0714.2006.00474.x
71. Zhong LP, Li J, Zhang CP, Zhu HG, Sun J, Zhang ZY. Expression of E-cadherin in cervical lymph nodes from primary oral squamous cell carcinoma patients. *Arch Oral Biol.* 2007;52(8):740-747. doi:10.1016/j.archoralbio.2007.01.013
72. Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, et al. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: Correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *J Cranio-Maxillofac Surg.* 2007;35(1):1-9. doi:10.1016/j.jcms.2006.11.004
73. Muñoz-Guerra MF, Marazuela EG, Fernández-Contreras ME, Gamallo C. P-cadherin expression reduced in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* 2005;103(5):960-969. doi:10.1002/cncr.20858
74. Lo Muzio L, Campisi G, Farina A, et al. P-cadherin expression and survival rate in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *BMC Cancer.* 2005;5:63. doi:10.1186/1471-2407-5-63
75. Wushou A, Pan HY, Liu W, et al. Correlation of Increased Twist With Lymph Node Metastasis in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(6):1473-1479. doi:10.1016/j.joms.2011.06.212
76. da Silva SD, Alaoui-Jamali MA, Soares FA, et al. TWIST1 is a molecular marker for a poor prognosis in oral cancer and represents a potential therapeutic target. *Cancer.* 2014;120(3):352-362. doi:10.1002/cncr.28404

77. de Freitas Silva BS, Yamamoto FP, Corrêa Pontes FS, et al. TWIST and p-Akt immunoexpression in normal oral epithelium oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(1):e29-e34. doi:10.4317/medoral.17344
78. Wang SJ, Bourguignon LYW. Role of Hyaluronan-Mediated CD44 Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Progression and Chemoresistance. *Am J Pathol*. 2011;178(3):956-963. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.077
79. Emich H, Chapiro D, Hutchison I, Mackenzie I. The potential of CD44 as a diagnostic and prognostic tool in oral cancer. *J Oral Pathol Med*. 2015;44(6):393-400. doi:10.1111/jop.12308
80. Mishra R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Mol Cancer*. 2010;9:144. doi:10.1186/1476-4598-9-144
81. Lin J, Song T, Li C, Mao W. GSK-3 β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2020;1867(5):118659. doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118659
82. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
83. Brands RC, Knierim LM, De Donno F, et al. Targeting VEGFR and FGFR in head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *Oncol Rep*. 2017;38(3):1877-1885. doi:10.3892/or.2017.5801
84. Mishra R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Mol Cancer*. 2010;9:144. doi:10.1186/1476-4598-9-144
85. Pérez Piñero C, Bruzzone A, Sarappa M, Castillo L, Lüthy I. Involvement of α 2- and β 2-adrenoceptors on breast cancer cell proliferation and tumour growth regulation. *Br J Pharmacol*. 2012;166(2):721-736. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01791.x
86. Barron TI, Sharp L, Visvanathan K. Beta-adrenergic blocking drugs in breast cancer: a perspective review. *Ther Adv Med Oncol*. 2012;4(3):113-125. doi:10.1177/1758834012439738
87. Yang EV, Sood AK, Chen M, et al. Norepinephrine Up-regulates the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in Nasopharyngeal Carcinoma Tumor Cells. *Cancer Res*. 2006;66(21):10357-10364. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2496
88. Today's Drugs. *Br Med J*. 1966;2(5525):1311-1312.
89. Al-Majed AA, Bakheit AHH, Abdel Aziz HA, Alajmi FM, AlRabiah H. Propranolol. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. 2017;42:287-338. doi:10.1016/bs.podrm.2017.02.006

90. Gargiulo L, Rivero EM, di Siervi N, et al. Agonist Effects of Propranolol on Non-Tumor Human Breast Cells. *Cells*. 2020;9(4):E1036. doi:10.3390/cells9041036
91. Cecilio HP, Valente VB, Pereira KM, et al. Beta-adrenergic blocker inhibits oral carcinogenesis and reduces tumor invasion. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2020;86(5):681-686. doi:10.1007/s00280-020-04149-2
92. Vincent-Chong VK, Seshadri M. Adrenergic-Angiogenic Crosstalk in Head and Neck Cancer: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front Oral Health*. 2021;2:689482. doi:10.3389/froh.2021.689482
93. Uggeri J, Gatti R, Belletti S, et al. Calcein-AM is a detector of intracellular oxidative activity. *Histochem Cell Biol*. 2000;122(5):499-505. doi:10.1007/s00418-004-0712-y
94. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp JoVE*. 2011;(50):2597. doi:10.3791/2597
95. One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE) | Elsevier Enhanced Reader. doi:10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4
96. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Western-Blot. *Exp Immunol*. Published online 2014:133-150. doi:10.1007/978-3-642-41899-0_5
97. Oliveira-Cunha M, Siriwardena AK, Byers RJ. Poly(A) cDNA Real-Time PCR for Indicator Gene Measurement in Cancer. In: King N, ed. *RT-PCR Protocols: Second Edition*. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2010:13-32. doi:10.1007/978-1-60761-629-0_2
98. Kim TH, Gill NK, Nyberg KD, et al. Cancer cells become less deformable and more invasive with activation of β -adrenergic signaling. *J Cell Sci*. 2016;129(24):4563-4575. doi:10.1242/jcs.194803
99. Xie WY, He RH, Zhang J, et al. β -blockers inhibit the viability of breast cancer cells by regulating the ERK/COX-2 signaling pathway and the drug response is affected by ADRB2 single-nucleotide polymorphisms. *Oncol Rep*. 2019;41(1):341-350. doi:10.3892/or.2018.6830
100. Kim MO, Na SI, Lee MY, Heo JS, Han HJ. Epinephrine increases DNA synthesis via ERK1/2s through cAMP, Ca²⁺/PKC, and PI3K/Akt signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *J Cell Biochem*. 2008;104(4):1407-1420. doi:10.1002/jcb.21716
101. Patrizio M, Musumeci M, Stati T, et al. Propranolol promotes *Egr1* gene expression in cardiomyocytes via β -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*. 2008;587(1):85-89. doi:10.1016/j.ejphar.2008.04.017
102. Otero C, Linke M, Sanchez P, González A, Schaap IAT. Propranolol Restricts the Mobility of Single EGF-Receptors on the Cell Surface before Their Internalization. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e83086. doi:10.1371/journal.pone.0083086

103. Mishra R, Nagini S, Rana A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/ beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. *Mol Cancer*. 2015;14:20. doi:10.1186/s12943-015-0300-x
104. Nishio K, Motozawa K, Omagari D, et al. Comparison of MMP2 and MMP9 expression levels between primary and metastatic regions of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci*. 2016;58(1):59-65. doi:10.2334/josnurd.58.59
105. Von Bahr C, Hermansson J, Tawara K. Plasma levels of (+) and (-)-propranolol and 4-hydroxypropranolol after administration of racemic (+/-)-propranolol in man. *Br J Clin Pharmacol*. 1982;14(1):79-82.
106. Khosla S, Drake MT, Volkman TL, et al. Sympathetic β_1 -adrenergic signaling contributes to regulation of human bone metabolism. *J Clin Invest*. 2018;128(11):4832-4842. doi:10.1172/JCI122151
107. Sato T, Arai M, Goto S, Togari A. Effects of Propranolol on Bone Metabolism in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;334(1):99-105. doi:10.1124/jpet.110.167643
108. Reid IR, Lucas J, Wattie D, et al. Effects of a β -Blocker on Bone Turnover in Normal Postmenopausal Women: A Randomized Controlled Trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(9):5212-5216. doi:10.1210/jc.2005-0573
109. Annabi B, Lachambre MP, Plouffe K, Moundjian R, Béliveau R. Propranolol adrenergic blockade inhibits human brain endothelial cells tubulogenesis and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Pharmacol Res*. 2009;60(5):438-445. doi:10.1016/j.phrs.2009.05.005
110. Lamy S, Lachambre MP, Lord-Dufour S, Béliveau R. Propranolol suppresses angiogenesis *in vitro*: Inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells. *Vascul Pharmacol*. 2010;53(5):200-208. doi:10.1016/j.vph.2010.08.002
111. Silva SR, Bowen KA, Rychahou PG, et al. VEGFR-2 expression in carcinoid cancer cells and its role in tumor growth and metastasis. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2011;128(5):1045-1056. doi:10.1002/ijc.25441
112. Edirisinghe ST, Weerasekera M, De Silva DK, et al. Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2) as Potential Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma: A Sri Lankan Study. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2023;24(1):267-274. doi:10.31557/APJCP.2023.24.1.267

11 Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Richard Bauer (Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie), meinem Betreuer und Erstgutachter. Danke für die wertvolle und lehrreiche Betreuung. Du hast mir die Freude und Motivation am wissenschaftlichen Arbeiten gezeigt. Davon werde ich immer profitieren, wie von deiner Expertise und deinen Ideen.

Prof. Dr. Carola Kolbeck (Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik) für die Bereitschaft, meine Dissertation als Zweitgutachterin zu betreuen.

Brigitta Hauer (ehem. Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie) für die großartige Zeit im Labor. Ich konnte von dir viele Techniken im Labor erlernen, die mir immer helfen werden. Nicht zu vergessen die netten Gespräche bei guter Musik am frühen Morgen.

Dr. Daniela Schulz (Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie) für die vielen Stunden, in denen du mir Analysen und Auswertungen beigebracht hast und damit mein Verständnis von Wissenschaft erweitern konntest. Ebenso für die vielen geselligen Abende, die du für das ganze Team organisiert hast und hoffentlich weiter organisierst.

PD Dr. Áine Lennon (Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie) dafür, dass du dir die Zeit genommen hast, meine Arbeit final durchzulesen und mir die eine oder andere Ungereimtheit aufgezeigt hast.

Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert (Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie) für die Möglichkeit, in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie zu promovieren.

Prof. Dr. Wolfgang Buchalla (Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie) für die Möglichkeit, als Mitarbeiter der Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie zu arbeiten, und dafür, dass ich mir die Zeit nehmen konnte, für meine Dissertation zu arbeiten.

Dem gesamten Labor für die nette Aufnahme ins Team. Mir wurde bei den verschiedensten Fragestellungen immer freundlich geholfen.

Zu guter Letzt meiner Familie. Danke für die Motivation, die ich immer von euch erhalten habe, auch wenn ich am Zweifeln war. Die Unterstützung von jedem von euch ist unbezahlbar.