

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie – Plastische  
Operationen  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

## **Kollagen I**

-

**Isolationsmethodik und Untersuchung des Einflusses auf das Verhalten  
gingivaler Fibroblasten und der oralen Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC 25**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von  
Juliane Elisabeth Adam  
aus Ochsenfurt

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

31. Januar 2024

Widmung

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung / Ziel der Dissertation.....	1
2 Literaturdiskussion.....	2
2.1 Kollagen.....	2
2.1.1 Kollagentypen und deren Vorkommen.....	2
2.1.2 Aufbau und Synthese von Kollagen I.....	3
2.2 Die Extrazellulärmatrix.....	3
2.2.1 Aufbau und Funktion der physiologischen EZM.....	3
2.2.2 Aufbau und Funktion der EZM bei Tumoren.....	5
2.3 Wechselwirkungen zwischen Kollagen und Tumoren.....	6
2.4 Kollagen im Zusammenhang mit Tumoren im Bereich der Mundhöhle.....	9
3 Material und Methoden.....	12
3.1 Geräte.....	12
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	12
3.3 Chemikalien.....	13
3.3.1 Verwendungsfertige Substanzen.....	13
3.3.2 Eigens angesetzte Lösungen.....	15
3.4 Isolation von Kollagen I aus humanen dermalen Gewebeproben.....	16
3.4.1 Gewebeproben.....	16
3.4.2 Etablierung einer neuen Methode zur Extraktion von Kollagen I.....	17
3.5 Gesamtproteinbestimmung mittels DC-Protein Assay.....	18
3.6 Untersuchung der gewonnenen Kollagenproben mittels Western Blot.....	19
3.7 Zellversuche.....	21
3.7.1 Zellkultur.....	21
3.7.2 Untersuchung der Stoffwechselaktivität mittels alamarBlue™-Assay.....	23
3.7.3 Untersuchung des Migrationsverhaltens mittels Scratch Assay.....	25
3.7.4 Untersuchung des Proliferationsverhaltens.....	27
3.8 Datenauswertung.....	27
3.9 Statistik.....	27
4 Ergebnisse.....	28
4.1 Kollagenisolation.....	28
4.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration in den gewonnenen Kollagenproben.....	28
4.1.2 Analyse des Kollagens im Western Blot.....	28
4.2 Messung der Stoffwechselaktivität.....	31
4.2.1 Stoffwechselaktivität der Fibroblasten.....	31
4.2.2 Stoffwechselaktivität der Tumorzelllinie SCC 25.....	32
4.3 Zellproliferation.....	33
4.3.1 Proliferationsverhalten der Fibroblasten.....	33

4.3.2	Proliferationsverhalten der Tumorzelllinie SCC 25 .....	34
4.3.3	Vergleich des Proliferationsverhaltens zwischen Fibroblasten und der Tumorzelllinie SCC 25 .....	35
4.4	Migrationsverhalten .....	36
4.4.1	Migrationsverhalten der Fibroblasten.....	36
4.4.2	Migrationsverhalten der Tumorzelllinie SCC 25.....	39
4.4.3	Vergleich des Migrationsverhaltens zwischen Fibroblasten und der Tumorzelllinie SCC 25 .....	42
5	Diskussion .....	43
5.1	Diskussion der Methodik.....	43
5.2	Diskussion der Ergebnisse der Zellversuche.....	45
5.2.1	Stoffwechselaktivität .....	45
5.2.2	Proliferationsverhalten .....	45
5.2.3	Migrationsverhalten.....	46
6	Zusammenfassung .....	49
7	Literaturverzeichnis.....	VI
8	Anhang .....	XI
9	Danksagung.....	XXII
10	Tabellarischer Lebenslauf.....	XXIII

## Abkürzungsverzeichnis

BSA: Bovines Serumalbumin

CAF: *cancer associated fibroblasts* = Tumorassoziierte Fibroblasten

DPBS: *dulbecco's phosphate buffered saline* = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

EMT: epitheliale-mesenchymale Transition

EZM: Extrazellulärmatrix

FCS: Fetales Kälberserum

kDA: Kilodalton

L-M: Laemmli-Puffer ohne Mercaptoethanol

L/G: L-Gluthamin

L+M: Laemmli-Puffer mit Mercaptoethanol

mA: Milliampere

PSN: Penicillin-Streptomycin

PTEN: *phosphate and tension homology deleted on chromosome ten*

SCC: *squamous cell carcinoma* = Plattenepithelkarzinom

TGF-  $\beta$ : *transforming growth factor  $\beta$*  = Transformierender Wachstumsfaktor

TME: *tumor microenvironment* = Tumormikroumgebung

z.B.: zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Belegungsplan 24-Well Platte für den alamarBlue™-Assay.....	24
Abbildung 2: Belegungsplan 96-Well Platte für den alamarBlue™-Assay.....	25
Abbildung 3: Foto: Pipettieren der Zellstocklösung in eine Ibidi-Kammer.....	26
Abbildung 4: Foto: Für die Versuche fertig ausgesäte 6-Well-Platte .....	26
Abbildung 5: Foto: 6-Well-Platte nach Abziehen der Ibidi-Kammer.....	26
Abbildung 6: Darstellung des Kollagen I Western Blot.....	29
Abbildung 7: Darstellung des Kollagen I Western Blot.....	30
Abbildung 8: Gesamtauswertung der Stoffwechselaktivität gingivaler Fibroblasten .....	32
Abbildung 9: Gesamtauswertung der Stoffwechselaktivität der Tumorzellen .....	33
Abbildung 10: Gesamtauswertung des Proliferationsverhaltens gingivaler Fibroblasten .....	34
Abbildung 11: Gesamtauswertung des Proliferationsverhaltens der Tumorzellen.....	35
Abbildung 12: Vergleich des Proliferationsverhaltens von Fibroblasten und Tumorzellen ....	36
Abbildung 13: Gesamtauswertung des Migrationsverhaltens gingivaler Fibroblasten.....	37
Abbildung 14: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Fibroblasten der 1 %-FCS-Kontrollgruppe.....	38
Abbildung 15: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Fibroblasten der Kollagen <sup>60</sup> -Gruppe .....	39
Abbildung 16: Gesamtauswertung des Migrationsverhaltens der Tumorzellen .....	40
Abbildung 17: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Tumorzellen der 1 %-FCS-Kontrollgruppe.....	41
Abbildung 18: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Tumorzellen der Kollagen <sup>60</sup> -Gruppe .....	41
Abbildung 19: Vergleich des Migrationsverhaltens von Fibroblasten und Tumorzellen.....	42

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kollagentypen und ihr Vorkommen .....	2
Tabelle 2: Verwendete Geräte .....	12
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien .....	13
Tabelle 4: Verwendungsfertige Substanzen .....	15
Tabelle 5: Eigens Angesetzte Lösungen.....	16
Tabelle 6: Informationen zu den Kollagenproben .....	17
Tabelle 7: Ansatz der Stimulanzmedien.....	23
Tabelle 8: Zur Auswertung verwendete Computerprogramme .....	27
Tabelle 9: Ergebnisse DC Protein Assays .....	28
Tabelle 10: Datentabelle Auswertung Stoffwechselaktivität Fibroblasten.....	XI
Tabelle 11: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Stoffwechselaktivität Fibroblasten.....	XI
Tabelle 12: Datentabelle Auswertung Stoffwechselaktivität SCC 25-Tumorzellen .....	XI
Tabelle 13: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Stoffwechselaktivität SCC 25-Tumorzellen .....	XII
Tabelle 14: Datentabelle Auswertung Proliferationsverhalten Fibroblasten.....	XII
Tabelle 15: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Proliferationsverhalten Fibroblasten.....	XIII
Tabelle 16: Datentabelle Auswertung Proliferationsverhalten SCC 25-Tumorzellen.....	XIV
Tabelle 17: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Proliferationsverhalten SCC 25-Tumorzellen .....	XV
Tabelle 18: Datentabelle Proliferationsverhalten Vergleich 8 h .....	XV
Tabelle 19: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Proliferationsverhalten Vergleich 8 h ...	XV
Tabelle 20: Datentabelle Proliferationsverhalten Vergleich 12 h .....	XV
Tabelle 21: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Proliferationsverhalten Vergleich 12 h	XVI
Tabelle 22: Datentabelle Proliferationsverhalten Vergleich 24h .....	XVI
Tabelle 23: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Proliferationsverhalten Vergleich 24 h	XVI
Tabelle 24: Datentabelle Proliferationsverhalten Vergleich 36 h .....	XVI
Tabelle 25: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Proliferationsverhalten Vergleich 36 h	XVII
Tabelle 26: Datentabelle Auswertung Migrationsverhalten Fibroblasten .....	XVII
Tabelle 27: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Migrationsverhalten Fibroblasten .....	XVIII
Tabelle 28: Datentabelle Auswertung Migrationsverhalten SCC 25-Tumorzellen .....	XVIII
Tabelle 29: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Migrationsverhalten SCC 25-Tumorzellen .....	XIX
Tabelle 30: Datentabelle Migrationsverhalten Vergleich 4 h.....	XX
Tabelle 31: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Migrationsverhalten Vergleich 4 h.....	XX
Tabelle 32: Datentabelle Migrationsverhalten Vergleich 8 h.....	XX
Tabelle 33: Statistische Auswertung Migrationsverhalten Vergleich 8 h.....	XX
Tabelle 34: Datentabelle Migrationsverhalten Vergleich 12 h.....	XXI
Tabelle 35: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Migrationsverhalten Vergleich 12 h.....	XXI
Tabelle 36: Datentabelle Migrationsverhalten Vergleich 36 h.....	XXI
Tabelle 37: Statistische Auswertung Migrationsverhalten Vergleich 36 h.....	XXI

## 1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Die funktionelle Rolle der Extrazellulärmatrix (EZM), insbesondere die Rolle von Kollagenen, die den größten Anteil an Matrixproteinen ausmachen, ist ein intensiv beforschtes Themengebiet. Die EZM bildet die Mikroumgebung in allen Geweben und ist aus einem Geflecht von Proteinen, Glykoproteinen, Proteoglykanen und Polysacchariden zusammengesetzt. Physiologischerweise erfüllt die EZM die Aufgabe einer Gerüststruktur für umliegende Zellen, sie bindet Wachstumsfaktoren und reguliert so das Zellverhalten. Die Zusammensetzung orientiert sich an den ansässigen Zellen und den Bedürfnissen der jeweiligen Gewebe bezüglich Elastizität, Zugfestigkeit und Stabilität oder Wassergehalt [1, 2]. Die Organisation der EZM wird räumlich und zeitlich reguliert. Eine Dysregulation der EZM kann die Entstehung von Krankheiten wie Tumoren beeinflussen [3].

Die Rolle der EZM bei der Tumorprogression ist ein kontrovers diskutiertes Themengebiet. Tumorassoziiertes Kollagen scheint strukturelle Veränderungen aufzuweisen, die in den unterschiedlichsten Tumorentitäten eine Rolle bei der Invasion, Proliferation, Metastasierung und Malignomtransformation zu spielen scheinen [4]. Untersuchungen zu Tumoren im Kopf-Hals-Bereich beschrieben die Überexpression des Enzyms Lysyloxidase (LOX) als schlechten prognostischer Faktor. Dieses Enzym ist für die räumliche Ausrichtung des Kollagens zuständig, entlang dessen neoplastische Zellen in das Gewebe wandern können, wodurch der Progress des Tumors und die Metastasierung gesteigert werden können [5-7]. Weitere Untersuchungen ergaben beispielsweise einen erhöhten Anteil an Kollagen I (COL1A1) in der EZM von Mammakarzinomen, bei denen im Endstadium die Anzahl und Größe von Lungenmetastasen sowie die Anzahl von zirkulierenden Tumorzellen, im Vergleich zu untersuchten Mammakarzinomen, die keinen erhöhten Kollagen I Anteil aufwiesen, deutlich erhöht waren. Zudem wurde beobachtet, dass die intratumoralen Kollagenfasern senkrecht zur Tumormasse in das umgebende Fettgewebe ausgerichtet waren. Es wird hierbei ein Zusammenhang zwischen der verstärkten Metastasierungsrate und der gesteigerten Expression, sowie der räumlichen Ausrichtung von Kollagen I vermutet [8].

Hauptziele dieser Arbeit waren die Methodenetablierung der Isolation und Quantifizierung von Kollagen I sowie die anschließende Untersuchung des Einflusses von Kollagen I auf die Stoffwechselaktivität, sowie das Proliferations- und Migrationsverhalten von a) humanen gingivalen Fibroblasten und b) der humanen Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC 25.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Komplexität der EZM von Tumoren leisten und womöglich den Weg für neue potenzielle Therapieansätze ebnen.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Kollagen

#### 2.1.1 Kollagentypen und deren Vorkommen

Kollagen ist ein Strukturprotein, das etwa 30 % der Gesamtproteinmasse im menschlichen Körper ausmacht. Vor allem von Fibroblasten sezerniert, lagern sich die Kollagenmoleküle im extrazellulären Raum erst zu Fibrillen und dann zu langkettigen, teils faserbildenden Makromolekülen (= Polymeren) zusammen. Kollagen stellt ein bedeutendes Element der Mikroumgebung zwischen Zellen dar.

Derzeit sind etwa 28 verschiedene Kollagentypen bekannt, die sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung und -abfolge unterscheiden. Diese Kollagentypen erfüllen im Körper verschiedene Aufgaben. Sie fungieren als strukturgebende Moleküle, als Transmembranproteine und als Stoffwechselregulatoren. Sie sind verantwortlich für die Dehnkraft der Haut, den Halt und die Flexibilität in Knochen, Knorpeln, Bändern und dienen somit dem Schutz von Organen und Blutgefäßen. Zudem erfüllen Kollagene andere hochspezialisierte Funktionen, die bisher noch kaum erforscht wurden. Einen Überblick über die wichtigsten Kollagentypen und deren Vorkommen liefert Tabelle 1 [1, 2].

Kollagentyp	Vorkommen
Typ I	Haut, Sehnen, Faszien, Knochen, Gefäße, Dentin
Typ II	Knorpel
Typ III	Bindegewebe, Retikuläre Fasern (= feine, netzartig angeordnete Fasern aus Kollagen Typ III und Glykosaminoglykanen, wichtig für Festigkeit bei gleichzeitiger Elastizität)
Typ IV	Basallamina, Bestandteil des komplexen Filtersystems im Nierenglomerulus
Typ V	Grenzbereich zwischen Dermis und Epidermis der Haut (Dermoepidermale Junctionszone)
Typ VI	Teil der EZM
Typ VII	Ankerfibrillen in der dermoepidermalen Junctionszone
Typ VIII	Auge-Descement-Membran
Typ IX	Knorpel, verbindet Typ II Fibrillen
Typ X	Matrix des hypertrophen Knorpels
Typ XI	Knorpel, in Typ II Fibrillen

Tabelle 1: Kollagentypen und ihr Vorkommen

### 2.1.2 **Aufbau und Synthese von Kollagen I**

Kollagenmoleküle sind aus drei jeweils helikalen alpha-Polypeptid-Ketten aufgebaut. Diese Ketten bestehen aus etwa 1000 repetitiv angeordneten Aminosäuren, die durch Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Glycin ist hierbei immer an erster Stelle der Dreierfolge. Die anderen Positionen werden häufig von Prolin oder Hydroxyprolin belegt. Am zweithäufigsten erfolgt die Belegung mit Lysin und Hydroxylysin. Es folgt eine kurze Erläuterung der Kollagensynthese.

Nach Transkription im Zellkern und Translation an den Ribosomen erfolgt die Hydroxylierung des Prä-Prokollagens am rauen endoplasmatischen Retikulum. Diese Bestückung von Prolin und Lysin mit funktionellen Hydroxylgruppen ist vom Cofaktor Vitamin C abhängig und Voraussetzung für die spätere Quervernetzung. Das Produkt nennt man Prokollagen oder Pro-alpha-Kette. Anschließend wird das Prokollagen bei der Glykosylierung, durch Anbau von Polysacchariden an die Hydroxylysin-Reste, für die Exozytose markiert. Dann erfolgt, durch Ausbildung von Disulfid- und Wasserstoffbrücken zwischen immer drei Pro-alpha-Ketten, die Bildung der Triplehelix des Prokollagens. Diese wird vom Golgi-Apparat als Sekretvesikel abgeschnürt und per Exozytose in die EZM freigesetzt. Extrazellulär erfolgt zunächst die Prozessierung, die die Kollagenmoleküle wasserunlöslich macht. Hierbei werden Propeptide am C- und N-Terminus des Prokollagens abgespalten. Das Produkt nennt man Tropokollagen. Anschließend erfolgt die Fibrillogenese, bei der mehrere Tropokollagene zu einem Bündel, einer Fibrille, verbunden werden. Mehrere Kollagenfibrillen lagern sich dann zum Endprodukt, der Kollagenfaser, zusammen.

Das am häufigsten vorkommende Kollagen I ist ein fibrilläres Kollagen mit einem Fibrillendurchmesser zwischen 50 und 90 nm. Es besteht aus zwei identischen  $\alpha_1(I)$ -Ketten und einer  $\alpha_2(I)$ -Kette, die zusammen ein Molekulargewicht von 100-140 Kilodalton (kDa) haben [1, 2].

## 2.2 **Die Extrazellulärmatrix**

### 2.2.1 **Aufbau und Funktion der physiologischen EZM**

Die EZM ist ein dreidimensionales Netzwerk aus zwei funktionell eng verbundenen Komponenten, die eine Vielzahl von Aufgaben, die der Interaktion zwischen Zellen und dem extrazellulären Raum dienen, bekleidet. Grundlegend besteht sie aus einem hydratisierten Gel mit komplexer molekularer Struktur sowie strukturgebenden Bindegewebsfasern. Der Hauptbestandteil des hydratisierten Gels sind Makromoleküle wie Glykosaminoglykane,

Proteoglykane und verschiedene Glykoproteine. Den größten Volumenanteil bilden Glykosaminoglykane, z.B. Hyaluronsäure, die sich aus langen Kohlenhydratketten aus Disaccharideinheiten ohne Proteinanteil zusammensetzen. Glykosaminoglykane sind maßgeblich für die Bindung von Wasser zuständig. Auch Proteoglykane, z.B. Aggrecan, Decorin, Perlecan, sind wichtig für die Bindung von Wasser und übernehmen zudem Funktionen, wie die Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten. Außerdem gehören regulatorische Funktionen, wie die Inaktivierung von extrazellulären Enzymen sowie Chemotaxis zu ihren Aufgaben. Sie sind Proteine mit kovalent verknüpften Glykosaminoglykan-Seitenketten. Glykoproteine hingegen sind Proteine mit angehängten kurzen Kohlenhydratketten. Die wichtigsten Vertreter der Glykoproteine sind Fibronectin und Laminin. Fibronectin fungiert als Verbindungsprotein. Es schafft, durch Bindung an Kollagen, Verbund zwischen den einzelnen EZM-Komponenten. Durch Bindung an Integrine werden EZM-Komponenten und Zellen miteinander verbunden. Außerdem steuert Fibronectin in der Embryonalentwicklung die Migration von Zellen und vernetzt während der Hämostase die Fibrinmoleküle mit Thrombozyten und Fibroblasten. Als Bestandteil der Basallamina fungiert Laminin, durch Bindung an Integrine und Kollagen, als Verbindungsprotein zwischen der Basallamina, Zellen und anderen EZM-Komponenten. Die zweite Komponente der EZM bilden die strukturgebenden Bindegewebsfasern. Man unterscheidet drei Fasertypen: Kollagenfasern, retikulären Fasern und elastische Fasern. Kollagenfasern und retikuläre Fasern werden aus Kollagenmolekülen gebildet. Elastische Fasern werden durch Vernetzung mehrerer Elastinmoleküle gebildet. Die EZM fungiert nicht nur als interzelluläre Masse, sondern besitzt physiologisch-funktionelle Fähigkeiten. Die Zusammensetzung orientiert sich an den organ-/ gewebespezifischen ansässigen Zellen und den Bedürfnissen des jeweiligen Gewebes [1, 2]. Kollagenfasern und retikuläre Fasern sind flexibel, zugfest und kaum dehnbar und sorgen unter anderem für Zugfestigkeit und Stabilität. Elastische Fasern hingegen sind für die Elastizität verantwortlich [1, 2].

Die EZM ist dynamisch und kann Umbauprozesse durchlaufen. Sie kann, in Abhängigkeit von Topografie, physikalischen Eigenschaften und Zellzusammensetzung, als leitende Struktur für die Zellmigration und -proliferation dienen [9]. Untersuchungen konnten zeigen, dass Zellen aus Regionen mit niedriger EZM-Konzentration zu solchen mit hoher Konzentration wandern können [10]. Neue Studien haben außerdem gezeigt, dass die EZM als Reservoir für den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  (*tissue growth factor  $\beta$* ) fungiert. TGF- $\beta$  ist in der Lage die Ausbreitung von neuronalen und epithelialen Zellen, die Wundheilung und Immunreaktionen zu regulieren. Die EZM spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase [10, 11]. Die Organisation der EZM wird räumlich und zeitlich reguliert,

um das Verhalten und die Differenzierung von Zellen zu steuern. Die Geometrie, Steifigkeit und andere physikalische Eigenschaften werden von den Zellen wahrgenommen und steuern so die Differenzierung und komplexe räumliche und strukturelle Anordnungen der Gewebe [3]. Eine Dysregulation der EZM kann die Entstehung von Krankheiten wie Tumoren beeinflussen [3].

### 2.2.2 Aufbau und Funktion der EZM bei Tumoren

Die Mikroumgebung von Tumoren (*tumor microenvironment* = TME) ist komplex organisiert und umfasst Blutgefäße, umgebende Immunzellen, Fibroblasten, Signalmoleküle und die EZM [12, 13]. Die EZM wird hauptsächlich von tumorassoziierten Fibroblasten (*cancer associated fibroblasts* = CAFs) sezerniert, wobei neuere Untersuchungen gezeigt haben, dass neben den CAFs auch Makrophagen und Tumorzellen zur Kollagenproduktion befähigt sein können [14, 15]. Die EZM besteht ebenfalls aus Glykoproteinen, Kollagenen und Enzymen, die biomechanische Aktivitäten und Funktionen im Körper unterstützen [16, 17]. Weiterer Bestandteil sind Transmembranproteine, wie z.B. Integrine, die sich in der Nähe von Zellmembranen befinden und die Kommunikation zwischen Zellen und der EZM innerhalb der TME unterstützen [10, 18, 19]. Die EZM unterliegt während der Entwicklung von Tumoren einem kontinuierlichen aktiven Umbau und löst biochemische und biophysikalische Signale aus, die die Zelladhäsion und Migration beeinflussen [20]. Als wichtigster Bestandteil der EZM bestimmt das Kollagen die primären funktionellen Eigenschaften der Matrix. Bei der Proliferation von Tumorzellen verändert sich die Dynamik zwischen Mikroumgebung und den ansässigen Zellen. Veränderungen, wie die vermehrte Sekretion von Fibronectin und Kollagen I, III und IV, sowie dem Um- oder Abbau von Kollagen können das Gleichgewicht innerhalb der EZM zusätzlich beeinflussen [21-23]. So zeichnet sich die kollagenreiche EZM von Tumoren durch eine erhöhte Steifigkeit und Dichte aus. Zudem wurden bei tumorassoziiertem Kollagen veränderte räumliche Anordnungen beobachtet. Sowohl die zunehmende Dichte als auch die veränderte räumliche Ausrichtung der Kollagenfasern wurden bereits mit einer schlechten Prognose bei verschiedenen Tumorentitäten assoziiert [24-28].

Die TME beeinflusst die Tumorentstehung und den Progress von Tumorerkrankungen durch Wechselwirkungen zwischen malignen und umgebenden, gesunden Zellen [29, 30]. Die Mikroumgebung von Tumoren ist ein komplexes und kontrovers diskutiertes und beforschtes Thema. Einige Autoren beschreiben die TME als Interaktionsplattform, über die Tumore vor allem mit ihrer Umgebung kommunizieren. So beschreiben Korneev et al. die enge und kontinuierliche Interaktion von Tumoren mit der Mikroumgebung und den Organen über das

Lymph- oder Kreislaufsystem [10]. Tumore können, durch Freisetzung extrazellulärer parakriner Signale in die Mikroumgebung, die periphere Immuntoleranz induzieren und die Angiogenese des Tumors unterstützen und so das Wachstum und die Progression von verschiedenen Tumorentitäten beeinflussen [10]. Andere Autoren beschreiben die TME als Teil des soliden Tumors, der die physiologische Homöostase beeinflusst. LeBleu beforschte die TME als ein komplexes und dynamisches Milieu aus zellulären und azellulären Komponenten [31]. Der zelluläre Anteil besteht aus perivaskulären Zellen, CAFs, mesenchymalen Zellen, Nervenzellen und dem Immuninfiltrat [32-34]. Die EZM als azelluläre Komponente bestehend aus Kollagen, Fibronektin und anderen Matrixproteinen, unterliegt, wie bereits erwähnt, einem ständigen Umbau durch Proteasen. Dieser Umbau wirkt sich auf die strukturelle Steifigkeit und Permeabilität der EZM sowie auf die Freisetzung und Präsentation eingebetteter Wachstumsfaktoren aus, welche das Tumorwachstum und den vaskulären Umbau beeinflussen [35-39]. Die verstärkte Ablagerung von Matrixproteinen wie Kollagen beeinflusst zusätzlich die Zell-Zell-Adhäsion und Zellpolarität und fördert so die Tumorprogression [40]. Die genauen Prozesse, die dem Einfluss der Kollagenablagerungen auf den Tumorprogress zugrunde liegen, sind noch nicht eindeutig geklärt. Neue Untersuchungen zeigen, dass eine verstärkte Kollagenvernetzung und -ablagerung über den Integrin-Signalweg den Progress fördern kann [41, 42]. Zudem erhöht Kollagen die Festigkeit des Tumorgewebes, reguliert die Tumorimmunität und nimmt Einfluss auf die Metastasierung [43, 44]. Andere Studien zeigen, dass auch der Abbau von fibrillären Kollagen I und Kollagen III das maligne Verhalten fördern kann [45, 46]. Insgesamt sind Forscher/-innen sich einig, dass die Zusammensetzung, Struktur und Dynamik der TME und somit die Art und Weise, wie sie die Tumorentwicklung und -progression beeinflusst, je nach Tumorentität und Patient variieren [47].

### **2.3 Wechselwirkungen zwischen Kollagen und Tumoren**

Um die biologischen Eigenschaften der Tumorzellen besser zu koordinieren, wird der Gehalt und die Verteilung des Kollagens innerhalb der Umgebung von Tumorzellen, durch diese selbst, verändert. Beeinflusst wird das Kollagen durch Mutationen von Onkogenen innerhalb von Tumorzellen, Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktionswegen und Rezeptoren [4]. Im Folgenden werden die Mechanismen kurz genauer erläutert.

### Genmutationen

Die Mutation von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen beeinflussen die Kollagenzusammensetzung in der Tumormatrix. Studien konnten zeigen, dass der Gehalt und die Architektur von Kollagen im Tumor durch mutierte Tumorsuppressorgene in Tumorzellen stark verändert wird. Beispielsweise wird die tumorassoziierte Kollagensignatur-3 beschrieben. Die Kollagenfibrillen sind hier um 60° bis 90° zur Tumorgrenze abgewinkelt. Diese Kollagensignatur wurde im Zusammenhang mit verstärkter Proliferation und Invasion von Tumoren beobachtet, was auf die veränderte räumliche Anordnung des Kollagens zurückgeführt wird. Die Zellen benutzen diese veränderte Struktur als eine Art Strickleiter, an der sie sich in das Gewebe weiter fortbewegen. Die Bildung dieser Kollagensignatur wird über ein mutiertes p53 Protein reguliert [48]. Des Weiteren scheint es Interaktionen mit anderen Tumorsuppressorgenen zu geben, die zu einer verstärkten Rekrutierung von CAFs und somit zu einer verstärkten Produktion von Kollagen I (COL1A1) führt. Für diese Regulierung wird das vollständige Ausschalten oder das Löschen einer Kopie des Gens PTEN (*phosphate and tension homology deleted on chromosome ten*) verantwortlich gemacht [49, 50].

### Transkriptionsfaktoren und Signaltransduktionswege

Transkriptionsfaktoren können die Expression von Zielgenen beeinflussen und somit die Tumorentstehung begünstigen. Tumorzellen kommunizieren unter anderem über diese Signalwege mit Kollagen im Rahmen der Proliferation, Differenzierung und auch der Apoptose. In zahlreichen Studien wurde dem TGF- $\beta$ , als Teil der Serin/Threonin-Kinase-Signaltransduktion, eine fördernde Rolle bei der Kollagentransformation zugesprochen. Die veränderte Architektur und Mechanik des Kollagens fördert Steifigkeit und Fibrose, was beispielsweise im Bereich des Pankreasepithel den Progress von Tumoren fördert [9, 51-55]. Unter Fibrose versteht man die Vermehrung von Bindegewebe, durch die eine Gewebeverhärtung erfolgt. Welche genauen Mechanismen hinter der Fibrosebildung stehen, konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Andere Signalwege wurden mit dem Progress von malignen Melanomen in Verbindung gebracht. Durch gesteigerte Kollagensynthese und Aktivierung des p38-Signalwegs wurden Melanomzellen zur Teilung aktiviert. Die dadurch gesteigerte Zellvermehrung wurde als Progredienzfaktor beschrieben [53]. Eine andere Untersuchung zeigte einen gesteigerten Umbau in eine malignomfördernde EZM, durch die Überexpression von tRNA<sub>i</sub><sup>MET</sup> (*initiator methionine transfer RNA*). Die Übergabe der tRNA<sub>i</sub><sup>MET</sup> an das Ribosom ist ein wichtiger Schritt bei der Initiierung der Proteinbiosynthese [55]. Die Überexpression dieser RNA erhöhte die Produktion von Kollagenen, insbesondere von Kollagen II, und Prozessierungsenzymen, die den Umbau der EZM fördern [54].

## Rezeptoren

Die Interaktion zwischen Kollagen und Tumorzellen geschieht hauptsächlich über Rezeptoren, die eine Unterfamilie der Tyrosinkinase-Rezeptoren darstellen. Integrin als typisches Adhäsionsmolekül beeinflusst in Kombination mit Kollagen häufig das Verhalten von Tumorzellen. Verschiedene Arten von Kollagen binden an verschiedene Integrine in zahlreichen Signalwegen. Untersuchungen von Hayashido et al. zeigten, dass eine Überexpression von Integrin- $\alpha$ v die Bildung von Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 8-Heterodimeren induzierte. Die Bindung von Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 8-Heterodimeren an Kollagen I löste über Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges eine gesteigerte Proliferation und Invasion von Plattenepithelkarzinomzellen (SCC = *squamous cell carcinoma*) aus [52]. Untersuchungen von Yufei Shen et al. zeigten, dass fibrilläres Kollagen I durch die Modulation des Integrin-PTEN/PI3K/AKT-Signalwegs bei der Umgestaltung der EZM eine wichtige Rolle spielt und die Invasion aggressiver Eierstocktumorzellen beeinflusst [56]. Auch bei strahleninduziertem Brustkrebs konnte die Linealisierung und Matrixverdichtung von Kollagen I über  $\beta$ 1-Integrin Signalisierung gezeigt werden [57]. Kollagen kann noch weitere Signalwege in Tumorzellen stimulieren. So führt die erhöhte Expression von Kollagen I (COL1A1) zur Aktivierung eines Signalwegs (Caspase-3/PI3K/AKT) um die Zellapoptose in Gebärmutterhalskrebszellen zu hemmen [58]. Barcus et al. fanden einen Zusammenhang zwischen erhöhten Anteilen von Kollagen I (COL1A1) in der EZM bei Brustkrebs und hormonellen Signalen. Die Anzahl und Größe von Lungenmetastasen im Endstadium sowie die Anzahl von zirkulierenden Tumorzellen waren im Vergleich zu untersuchten Mammakarzinomen, die keinen erhöhten Kollagen I Anteil aufwiesen, deutlich erhöht. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die intratumoralen Kollagenfasern senkrecht zur Tumormasse in das angrenzende Fettpolster ausgerichtet waren. Die Forscher vermuten einen Zusammenhang der verstärkten Metastasierungsrate und der Ausrichtung der Kollagenfasern vom Tumor hin in das umgrenzende Gewebe [8].

Eine weitere Rolle scheinen Rezeptoren der G-Protein-Familie zu spielen. So wurde beobachtet, dass die G-Proteine die Steifigkeit der Matrix durch die Veränderung der Kollagenausrichtung fördern können. Die hohe Steifigkeit wurde als Induktionsfaktor für die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und die Invasion und Metastasierung beobachtet [59]. EMT beschreibt eine Umwandlung des epithelialen Phänotyps einer Zelle in eine mesenchymale Form. Physiologischerweise ist die EMT beispielweise während der Embryonalentwicklung oder bei Wundheilungsprozessen wichtig. Tumore können die EMT manipulieren um dadurch Vorteile für das eigene Überleben und die Invasion zu erlangen [16]. Die Zellmigration aus dem Primärtumor und die Invasion in das angrenzende Bindegewebe

erfordern einen Umbau in der EZM. Schnell proliferierende neoplastische Zellen üben eine mechanische Belastung auf die Basalmembran aus, die sich infolgedessen wölbt. Angrenzende CAFs verstärken die Ablagerungen von Kollagen. Das aus dem TME stammende Enzym Lysyloxidase (LOX) richtet das Kollagen aus. Nach einer gewissen Zeit hält die Basalmembran dem Druck nicht mehr stand und wird durchlässig. Die neoplastischen Zellen wandern nun entlang des ausgerichteten Kollagens in das darunterliegende Gewebe [5]. Die Überexpression von LOX wurde bei verschiedenen Tumorentitäten, einschließlich Kopf-Hals-Tumoren, als schlechter prognostischer Marker beschrieben [6, 7]. Insgesamt verbessert das, von Tumorzellen induzierte, Umformen des Kollagens die Kommunikation von Kollagen und Zellen und kann das Fortschreiten des Tumors begünstigen [4].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Kollagen im Umfeld von Tumoren stärker linearisiert und quervernetzt zu sein scheint [60, 61]. Der Einfluss, den Kollagen auf Tumorzellen und die EZM ausübt, scheint in den unterschiedlichsten Tumorentitäten eine Rolle bei der Invasion, Proliferation, Metastasierung und Malignomtransformation zu spielen [4].

## **2.4 Kollagen im Zusammenhang mit Tumoren im Bereich der Mundhöhle**

Orale Malignome zählen weltweit zu den häufigsten soliden Tumorentitäten, nehmen Platz 8 in der Häufigkeitsreihenfolge ein und sind trotz medizinischer Fortschritte weiterhin mit einer hohen Mortalität verbunden [62]. Aktuell werden jedes Jahr über 350 000 Neuerkrankungen diagnostiziert [63], wobei 90-95 % der bösartigen Tumore ihren Ursprung im oralen Plattenepithel haben [64]. Häufige Prädilektionsstellen sind der Zungenrand, der Mundboden und die Alveolarfortsätze [65]. Die Ätiologie ist multifaktoriell, wobei insbesondere das Zusammenspiel aus chronischem Tabak- und Alkoholkonsum das Entstehungsrisiko exponentiell steigert. Der Co-Konsum erhöht das Risiko für eine Karzinomentstehung hierbei signifikant [66]. Auch die Infektion mit dem humanen Papillomvirus (HPV), besonders dem „high-risk“-Typ HPV 16, stellt einen weiteren Risikofaktor dar [67], was jedoch jüngsten Erkenntnissen nach vor allem beim Pharynxkarzinom und weniger beim Mundhöhlenkarzinom eine prognostische Rolle spielt [68]. Die Therapie richtet sich nach der Ausdehnung des Primärtumors, der Metastasierung, dem Alter, sowie dem Allgemeinzustand der Patienten und erfolgt interdisziplinär. Der aktuelle therapeutische Standard besteht bei kurativer Intention aus der chirurgischen Resektion des Primärtumors unter größtmöglichem Erhalt funktionell und ästhetisch relevanter Strukturen mit stadienabhängiger adjuvanter Radiatio und/oder Chemotherapie [69]. Die 5-Jahres Überlebensrate beträgt circa 50 % und blieb, trotz stetigen Fortschritts und Weiterentwicklung der Therapieverfahren, über die letzten Jahre konstant [70]. Die Invasion, der Progress, die Metastasierungsrate, das Therapieansprechen der Tumore

und somit die Morbiditäts- und Mortalitätsrate der Patienten sind sehr individuell [47]. Hier stellt sich die Frage nach der Ursache der Individualität dieser Tumorerkrankungen. Ein Erklärungsansatz vermutet die Gründe der Verhaltensdiversität in der Struktur und den Vorgängen innerhalb der TME bzw. EZM, die bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurden. Aktuell zu klären bleibt, welche strukturellen Eigenschaften das Kollagen in der TME von Tumoren im Vergleich zu Kollagen innerhalb unveränderter Gewebe aufweist. Die Mundhöhle besteht aus verschiedenen Hart- und Weichgeweben, bei denen Kollagene einen Hauptbestandteil bilden. Hierbei handelt es sich im Wesentlichen um Knochen, Bindegewebe, Muskeln, Sehnen, Knorpel und Mundschleimhaut [71]. In diesem Zusammenhang könnte ein weiterer möglicher Einflussfaktor die unterschiedliche strukturelle Gewebeszusammensetzung der verschiedenen Schleimhautregionen innerhalb der Mundhöhle sein, welche sich regionsabhängig insbesondere hinsichtlich Quantität und der räumlichen Ausrichtung von Kollagen unterscheidet. Im Folgenden wird insbesondere auf die Zusammensetzung der Mundschleimhaut in unterschiedlichen Arealen der Mundhöhle eingegangen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen mastikatorischer Schleimhaut, auskleidender Schleimhaut und spezialisierter Schleimhaut. Die spezialisierte Schleimhaut befindet sich im Bereich des Zungenrückens und besteht aus verhorntem Plattenepithel, welches spezielle Strukturen, sogenannte Papillen, aufweist, die für die Geschmacks- und Temperaturwahrnehmung sowie den Tastsinn zuständig sind. Die mastikatorische Schleimhaut befindet sich im Bereich der befestigten Gingiva und dem harten Gaumen. Die auskleidende Schleimhaut bekleidet das Vestibulum, den Mundboden, den weichen Gaumen, die Wangen und Innenseite der Lippen ausgehend vom Lippenrot [1]. Es lassen sich sowohl funktionelle als auch morphologische Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Arten von Schleimhäuten feststellen, was in erster Linie auf unterschiedliche Aufgaben innerhalb der Mundhöhle zurückzuführen ist. Während das Epithel auf dem Zungenrücken für die Geschmacks- und Temperaturwahrnehmung, sowie den Tastsinn verantwortlich ist, unterscheiden sich die mastikatorische und auskleidende Schleimhaut vor allem durch das Ausmaß der physischen Belastung während des Kauvorgangs [72]. Die auskleidende Schleimhaut besteht aus mehrschichtig unverhorntem Plattenepithel. Sie beinhaltet viele kleine und größere Speicheldrüsen, ist stark vaskularisiert und dient vor allem der Nährstoffversorgung der umliegenden Gewebe. Sie ist gut verschieblich und elastisch und enthält im Gegensatz zur mastikatorischen Schleimhaut wenig organisierte Kollagenfasern und mehr elastische Fasern [1]. Die befestigte Gingiva und der harte Gaumen werden insgesamt stärker belastet und erfordern dementsprechend eine starrere, widerstandsfähigere Mikroanatomie. Die mastikatorische Schleimhaut besteht aus mehrschichtig verhorntem Plattenepithel [73].

Darunter liegt ein kompaktes faseriges Gewebe, die Lamina propria, die aus der Papillarschicht und der tieferen Retikularschicht besteht. Die oberflächlichen Kollagenfasern in der Papillarschicht sind willkürlich ausgerichtet und die Übergangsbereiche zum Epithel sind oft unregelmäßig und mit wellenförmigen Papillenrippen, die eine Oberflächenvergrößerung für den Nährstofftransport bieten [73]. Die basalen Kollagenfasern in der retikulären Schicht orientieren sich senkrecht zur Knochenhaut, dem Periost, um dieses zu befestigen. Diese faserigen Anhänge zwischen Lamina propria und Periost, genannt Mukoperiost, machen die mastikatorische Schleimhaut unbeweglich und sorgen für Widerstandsfähigkeit gegenüber Kompression und Scherkräften während des Kauvorgangs [74, 75]. Das Gewebe ist insgesamt stark vaskularisiert und beinhaltet viel interstitielle Flüssigkeit, die durch mechanische Dämpfung den darunterliegenden Strukturen Schutz bietet [76]. Die Grenze zwischen mastikatorischer und auskleidender Schleimhaut nennt man mukogingivale Grenze. Inwieweit die unterschiedliche Quantität und Qualität an Kollagen insbesondere zwischen mastikatorischer und auskleidender Schleimhaut eine Rolle bei der Entstehung, der Invasion und dem Tumorprogress eine Rolle spielt, bleibt weiterhin unklar.

Diese Studie untersucht die grundsätzliche Fragestellung nach dem Einfluss von Kollagen I auf das Proliferations- und Migrationsverhalten, sowie auf die Stoffwechselaktivität der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC 25 sowie humaner gingivaler Fibroblasten.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte

Gerät	Artikelnummer	Hersteller
Brutschrank	97106375	Heraeus
Chemilumineszenz Bildgebung: Fusion Solo S	15200482	Vilber
Mikroplattenreader SpectraMax® ID	BNR: 06493	Molecular Devices
Mikroskop Leica DMI1	592201	Leica Microsystems
Mikrozentrifuge Fresco 21	41110659	Thermo Scientific
Netzgerät Power Pac 300	1645050	Bio-Rad
Pipette Pipetman P 10	S56968L	Gilson
Pipette Pipetman P 100	U64435A	Gilson
Pipette Pipetman P 1000	U726396	Gilson
Pipette Pipetman P 20	S57421E	Gilson
Pipette Pipetman P 200	S60116L	Gilson
Pipettierhilfe Accu-jet pro	04J75167	Brand
Homogenisierer: SpeedMill plus	10-3280-001-26	Analytic jena
Sterilbank Hera Safe	97106795	Heraeus
Thermomixer Compact	No. 5350 24415	Eppendorf
Western Blot Kammer: Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	1703930	Bio-Rad
Western Blot Trans Blot Semi Dry	170-3940	Bio-Rad
Zellzählsystem Luna-II Cell Counter	L-40001-LG	Vita Scientific
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16	41840144	Thermo Scientific

Tabelle 2: Verwendete Geräte

#### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Artikelnummer	Hersteller
Einfriergefäß Cryoröhrchen PP 2 ml	1034-4691	Thermo Fisher Scientific
Einwegskalpell Figur 11	00636471	Feather
Einwegskalpell Figur 12	00636488	Feather
Einwegskalpell Figur 15	00636494	Feather
Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml	120.086	Eppendorf
Gel Western Blot 4-20 % Mini-PROTEAN TGX Stain- Free Gel 10 well	4568094	Bio-Rad
Handschuhe Latex puderfrei Gr. S	112-2750	VWR

Material	Artikelnummer	Hersteller
Ibidi Kammern (2Well silicone inserts) 25 stk.	80209	ibidi
Konisches Gefäß 2 ml	79656	Qiagen
Microplatte 96 Well PS µClear Schwarz	655090	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	F 167101	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen	F 167103	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen	F167104	Thermo Fisher Scientific
Transfer-Membran PVDF Pore Size 0,45 µm Immobilon®-P	R7EA8784F Cat.No.: IPVH00010	Immobilon
Serolog. Pipette 10 ml	607180	Greiner Bio-One
Serolog. Pipette 25 ml	760180	Greiner Bio-One
Serolog. Pipette 2 ml	710180	Greiner Bio-One
Serolog. Pipette 5 ml	606180	Greiner Bio-One
Whatman™ Papier 3MM CHR	1730852402	Cytiva
Zellkulturflasche 175 cm <sup>2</sup>	660175	Greiner Bio-One
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	658175	Greiner Bio-One
Zellkulturplatte 24 Well	662160	Greiner Bio-One
Zellkulturplatte 6 Well	657160	Greiner Bio-One
Zellkulturplatte 96 Well	655160	Greiner Bio-One
Zellzählkammer LUNA™ Cell counting slides	L12001	Logos bio
Zentrifugen Filtereinheit Amicon® Ultra-4	C7719	Amicon
Zentrifugenröhrchen Corning™ Falcon™ 50 ml	10788561	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

### 3.3 Chemikalien

#### 3.3.1 Verwendungsfertige Substanzen

Substanz	Artikel-Nr.	Hersteller	Verwendungszweck
2-Mercapthoethanol	M6250	Sigma	Vorbereitung der Proben für den Western Blot
Accutase®	A6964	Sigma	Ablösen der Zellen von der Kulturflasche
alamarBlue™	DAL1100	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	alamarBlue™-Assay
DC Protein Assay Kit	5000112	Bio Rad	Durchführung DC Protein Assay zur Gesamtproteinbestimmung
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)	B230673	Ampuwa	Reinigung der Hautproben, Ansetzen von Lösungen

<b>Substanz</b>	<b>Artikel-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendungszweck</b>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 1x) + 1 g/L dGlucose, L-Glutamine + Pyruvate	31885-023	Gibco	Zellkultur Fibroblasten
Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Ham (DME/F-12, 1:1)	D6421	Sigma	Zellkultur Tumorzellen SCC25
Dulbecco's PBS	D 8537	Sigma	Waschen der Zellen in der Zellkultur
ECL™ Prime Western Blotting Detection Regents	17495087	Amersham™	Immunhistochemischer Nachweis
Fetales Kälberserum (FCS)	10270-106	Life Technologies	Zusatz für Zellkulturmedien
Flächendeinfektionskonzentrat Terralin® <i>protect</i>	SMH181610	Schülke	Flächendesinfektion
Glycine	G7126	Sigma	Ansetzen des 5fach konzentrierten Laufpuffers
Hydrocortison	H 0888	Sigma	Zusatz für Zellkulturmedien
L-Glutamine	G 7513	Sigma	Zusatz für Zellkulturmedien
Laemmlipuffer (4x <i>laemmlisample-buffer</i> )	1610747	Bio Rad	Vorbereitung der Proben für den Western Blot
Marker Western Blot ( <i>Full Range Rainbow Marker</i> )	RPN800E	Amersham	Marker für den Western Blot
Methanol	1.060.081.000	Merck	Vorbereitung der Membran für den Blot
Milchpulver	68514-61-4	Carl Roth	Ansetzen der Blocking Solution und Antikörper Solution
Mykoplasmandetektionskit (Venor® GeM <i>One Step Mycoplasma Detection Kit for qPCR</i> )	11-91100	MB Minerva Biolabs	Mykoplasmentest für die Zellkultur
Natriumacetatpulver	S-7545	Sigma	Ansetzen der 0,5 M Natriumacetatlösung
Natriumcitratpulver tri-Natriumcitrat-Dihydrat	106448	Merck	Ansetzen der 0,5 M Natriumcitratlösung
Norleucin-DL	N1398	Sigma	Ansetzen des Kathodenpuffers
Penicillin-Streptomycin (PSN)	P0781	Sigma	Zusatz für Zellkulturmedien
Primärantikörper COL 1A1 (E6A8E) Verhältnis 1:1000	39952S	Cell Signaling Technology	Immunhistochemischer Nachweis
Proteinstandard Albumin Standard (Bovines Serumalbumin – BSA)	23209	Thermo Fisher Scientific	Ansetzen der Standardverdünnungsreihe für den DC Protein Assay

Substanz	Artikel-Nr.	Hersteller	Verwendungszweck
Ripa Puffer	R0278	Sigma	Vorbereitung der Proben für den Western Blot
Salzsäure (HCl) 1N	181021.1211	PanReac AppliChem ITW Reagents	Einstellen von pH-Werten
SDS 10 % (Natriumdodecylsulfat)	3423265	Thermo Fisher Scientific	Ansetzen des 1x Laufpuffers
Sekundärantikörper Anti- Rabbit igG Verhältnis 1:1000	7074S	Cell Signaling Technology	Immunhistochemischer Nachweis
Trizma® Base	T1503	Sigma	Ansetzen von Pufferlösungen
Trypan Blau 0,4 %	T8154	Sigma	Anfärben der Zellen für den Zählvorgang
Tween 20	655204-100	Thermo Fisher Scientific	Ansetzen der Waschlösung TBS-W

Tabelle 4: Verwendungsfertige Substanzen

### 3.3.2 Eigens angesetzte Lösungen

Lösung	Rezept	Verwendungszweck
Laufpuffer (1x konzentriert)	200 ml 5x Laufpuffer + 1 ml 10 % SDS ad 1000ml aqua dest	Western Blot
Laufpuffer (5x konzentriert)	150 g Tris-Base + 720 g Glycin ad 5000 ml aqua dest.	Western Blot
Natriumacetat (0,5 M) pH 4,2	20,5 g Natriumacetatpulver ad 500 ml aqua dest., pH Wert von 4,2 mit 1 M Salzsäure einstellen	Kollagenisolierung: Herauslösen von andersartigen Proteinen aus der Haut
Natriumcitrat (0,5 M) pH 7,2	2,415 g Natriumcitratpulver ad 500 ml aqua dest., pH Wert von 7,2 mittels 1 M Salzsäure einstellen	Kollagenisolierung: Herauslösen des Kollagens aus Haut
Anodenpuffer 1	18,1 g Tris-Base + 100 ml Methanol + 400 ml aqua dest.	Western Blot
Anodenpuffer 2	1,5 g Tris-Base + 100 ml Methanol + 400 ml aqua dest.	Western Blot
Kathodenpuffer	3,03 g TrisBase + 5,25 g Norleucin-DL + 2,5 ml SDS 10 % + 1000 ml aqua dest.	Western Blot
Blockingsolution	10 g Milchpulver + 200 ml TBS-W	Western Blot: Immunhistochemischer Nachweis

<b>Lösung</b>	<b>Rezept</b>	<b>Verwendungszweck</b>
Antikörpersolution	2,5 g Milchpulver + 50 ml TBS-W	Western Blot: Immunhistochemischer Nachweis
Waschlösung TBS-W	50 ml 10x TBS + 8 ml Tween 20 ad 1900 ml aqua dest	Western Blot: Waschlösung während des Immunhistochemischen Nachweis
TBS (10fach konzentriert) pH 7,4	81,8 g NaCl (1,4M) + 12,1 g Tris-Base (0,1M) ad 1000 ml aqua dest pH 7,4 mit 1 M Salzsäure einstellen	Western Blot: Ansatz für Waschlösung TBS-W

Tabelle 5: Eigens Angesetzte Lösungen

### 3.4 Isolation von Kollagen I aus humanen dermalen Gewebeproben

#### 3.4.1 Gewebeproben

Bei den zur Kollagengewinnung verwendeten Gewebeproben handelte es sich um humane Hautproben, die bei chirurgischen Eingriffen im Kopf-/Halsbereich als Überschussmaterial verworfen und als biologisches Material vernichtet worden wären. Zu den operativen Eingriffen, bei denen die Proben gewonnen wurden, gehörten unter anderem plastische Operationen wie Hals-Wangen Straffungen (Facelift) und Ober- und Unterlidstraffungen. Hierbei wurde die überschüssige Haut im Bereich des Gesichts, des Halses und der Augenlider nach dem Straffungsprozess entfernt. Außerdem wurde überschüssige Haut nach resektiven Eingriffen von Kopf-Hals Tumoren und anschließender Rekonstruktion mittels mikrovaskulärer Lappentransplantate, zum Beispiel freien Vollhaut- oder Spalthauttransplantaten, fasziokutanen Transplantaten wie Ulnaris- und Radialis-Lappen, myokutane Latissimus dorsi Transplantaten oder osteomyokutane Fibula- oder Skapula Transplantaten gesammelt und verwertet.

Insgesamt wurden für die Kollagengewinnung Proben von 43 verschiedenen, anonymisierten Patienten unterschiedlichen Alters (25 bis 79 Jahre, Gesamterschnitt 58 Jahre) mit einem Gesamtgewicht von 56,9 g verwendet. Alle Gewebeproben wurden bis zur Verarbeitung, spätestens 7 Tage nach Entnahme, in destilliertem Wasser (aqua dest.) bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Proben, die innerhalb einer Woche bei Operationen gesammelt werden konnten, wurden gepoolt und verarbeitet. Insgesamt wurden die Hautproben über fünf Wochen gesammelt und verarbeitet.

Name der Probe	Datum der Kollagenisolierung	Anzahl der Hautproben	Gesamtgewicht der Hautproben	Anzahl der Patienten	Geburtsjahre (Intervallskaliert)	Gewonnene Kollagenprobe
K1	20.01.2021	7	6 g	7	1943-1960	200 µl
K2	04.02.2021	7	11,3 g	7	1955-1981	420 µl
K3	17.02.2021	14	7 g	14	1955-1994	380 µl
K4	04.03.2021	6	16 g	6	1945-1968	510 µl
K5	14.05.2021	10	8,9 g	10	1953-1997	2500 µl

Tabelle 6: Informationen zu den Kollagenproben

### 3.4.2 Etablierung einer neuen Methode zur Extraktion von Kollagen I

Die angewandte Methode zur Kollagengewinnung basiert auf den Vorarbeiten und Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Dr. C.A. Pacak, J.M. Powers und Dr. D. B. Cowan der Harvard Universität in Boston, welche im Rahmen ihrer gemeinsamen Publikation „Ultrapurification of Collagen Type I for Tissue Engineering Applications“ beschrieben wurde [77].

Die gesamte Kollagenisolierung erfolgte bei einer Temperatur von 4 °C. Alle benötigten Reagenzien wurden im Vorfeld auf diese Temperatur heruntergekühlt. Um eine Kontamination der Proben zu vermeiden, wurde die Kollagenisolierung unter einer sterilen Werkbank auf einer mit Terralin® desinfizierten Arbeitsfläche und mit autoklavierten Pipetten und Gefäßen durchgeführt.

#### Vorbereitung der Hautproben

Zunächst erfolgte die gründliche Reinigung der Hautproben in eisgekühltem, destilliertem Wasser. OP-Markierungen und abgestorbene Hautschuppen wurden hierbei entfernt. Anschließend wurden, mithilfe eines Skalpells und einer Pinzette, Haare und andere Verunreinigungen wie Nahtmaterial, Fett und Bindegewebe entfernt. Gewebeareale, die durch die intraoperative Verwendung von bipolaren Kautern beschädigt waren, wurden ebenfalls entfernt. Anschließend wurden die Proben in etwa 5 x 5 mm messende Stücke zerkleinert und erneut in eiskaltem, destilliertem Wasser gereinigt.

#### Herauslösen von anderen Proteinen und Polysacchariden

Im Anschluss an die Vorbereitung und Reinigung wurden die zerkleinerten Hautproben in konische Gefäße, aus denen vorher die Kügelchen entfernt wurden, überführt, sodass diese bis zur Hälfte mit Gewebeproben befüllt waren. Um andere Proteine und Polysaccharide aus den Proben herauszulösen, pipettierte man 1 ml einer 0,5 M Natriumacetatlösung zu jeder Probe hinzu. Die Röhrchen wurden eine Minute im Bench-Top Homogenisator gemischt. Danach wurde die Flüssigkeit abpipettiert und verworfen. Frisches Natriumacetat wurde auf die Hautproben gegeben und dieser Waschvorgang insgesamt sieben Mal wiederholt. Im

Anschluss an die sieben Waschvorgänge wurden die Hautstücke aus den konischen Gefäßen entnommen und in destilliertem Wasser gereinigt. Um sicherzustellen, dass die Proben keine überschüssige Flüssigkeit mehr enthielten, wurden die Gewebeproben am Rand der konischen Gefäße mechanisch komprimiert und in die gleiche Anzahl an neuen konischen Gefäßen überführt.

#### Extraktion von Kollagen I

Für die Kollagenisolierung gab man anschließend 1 ml einer 0,075 M Natriumcitratlösung zu den Gewebeproben. Nach einer Minute im Bench-Top Homogenisator wurde die Flüssigkeit erneut abpipettiert und erneut 1 ml frisches Natriumcitrat hinzugegeben. Dann erfolgte das Mischen im Bench-Top-Homogenisator für insgesamt 6 Minuten am Stück. Der anschließend abpipettierte Überstand wurde in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Hiernach wurden die Hautproben ein letztes Mal mit 1 ml frischem Natriumcitrat versetzt und für eine Minute gemischt. Der Überstand wurde mit dem Überstand des ersten Durchgangs im Eppendorfgefäß vereint. Die Gefäße mit Resten der verwendeten Hautproben wurden entsorgt. Es folgte die Zentrifugation der gewonnenen Flüssigkeit für 10 Minuten bei 4 °C und 3200 x g. Die so geklärte Flüssigkeit wurde abpipettiert und in Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon® Ultra-4) gegeben. Wie viele Filtereinheiten verwendet wurden war abhängig von der Menge der geklärten Flüssigkeit. Die Filtereinheiten wurden jeweils bis zur obersten Markierung gefüllt. Die Filtereinheiten wurden dann für 30 Minuten bei 4 °C und 3200 x g zentrifugiert. Im oberen Kompartiment der Filtereinheit befand sich nun die gereinigte und gefilterte Kollagenprobe. Diese wurde abpipettiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Probe wurde entweder bei 4 °C im Kühlschrank zur zeitnahen Weiterverarbeitung oder bei -80 °C für einen längeren Zeitraum gelagert. Die restliche Flüssigkeit im unteren Kompartiment der Filtereinheit wurde verworfen.

### **3.5 Gesamtproteinbestimmung mittels DC-Protein Assay**

Der DC-Protein-Assay ist ein kolorimetrischer Assay zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Messung basiert auf einer Redoxreaktion, bei der das Protein in einer Lösung mit einem Folin-Reagenz und einer alkalischen Kupfertartatlösung reagiert. Insbesondere die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sind dazu fähig, das im Kit enthaltene Reagenz zu reduzieren. Das Ergebnis der Reaktion ist die Bildung eines blauen Produkts. Je mehr Protein die zu testende Lösung enthält, desto dunkler wird das Blau. Im Folgenden wird die Durchführung des Assays beschrieben.

Der erste Schritt war das Ansetzen der Standard-Verdünnungsreihe mit dem Protein Bovines Serumalbumin (BSA). Der Standard wurde im gleichen Puffer wie die zu messenden Proben angesetzt, in diesem Fall in Natriumcitrat mit einem pH-Wert von 7,2. Folgende Konzentrationen des Standards wurden danach auf eine 96-Well Platte pipettiert: 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 25 µg/ml und 0 µg/ml. Es wurden immer 3 Wells mit jeweils 5 µl des Standards oder der Probe pipettiert. Anschließend wurden 25 µl von Reagenz A und 200 µl von Reagenz B des Kits jedem Well hinzugefügt und die Platte vorsichtig händisch gemischt. Nach 15 Minuten konnte die Absorption bei 750 nm im Plate Reader gemessen werden. Die so bestimmte Gesamtproteinmenge, die das Computerprogramm des Plate Readers ausgab, wurde dann als Berechnungsgrundlage für die zu pipettierende Proteinmenge im Western Blot verwendet.

### **3.6 Untersuchung der gewonnenen Kollagenproben mittels Western Blot**

Den Nachweis von spezifischen Proteinen innerhalb eines Proteingemischs durch Übertragung auf eine Membran und anschließender Identifizierung mittels Antikörperdetektion, nennt man Western Blot. Es ist ein etabliertes Verfahren, um Proteingemische anhand ihrer Molekularmasse aufzutrennen und so zu untersuchen. Im Folgenden wird der, für die Arbeit verwendete, Ablauf des Western Blots beschrieben.

Zunächst wurden die benötigte Probenmenge, anhand der, im DC Protein Assay bestimmten Gesamtproteinmenge, berechnet. Vorversuche zeigten, dass sich bei den Kollagenproben eine Proteinmenge von 40 µg gut detektieren ließ. Im Folgenden wird die optimale Probenaufbereitung für den Western Blot beschrieben. Die Probenaufbereitung, die in dieser Arbeit Anwendung fand und reproduzierbare Ergebnisse lieferte, wird im Rahmen der Etablierungsarbeit im Ergebnisteil genau beschrieben. Die gesamte Verarbeitung der Proteinproben erfolgte auf Eis. Die benötigte Menge der Proteinproben wurde zunächst in Eppendorfgläser überführt. Den Proteinproben wurde dann zunächst RIPA-Puffer im Verhältnis 2:1 zugesetzt (2 Volumeneinheiten Probe + 1 Volumeneinheit RIPA-Puffer). Anschließend wurde dem Gemisch Laemmli-Puffer im Verhältnis 4:1 zugesetzt (4 Volumeneinheiten Probe mit RIPA-Puffer + 1 Volumeneinheit Laemmli-Puffer). Dann erfolgte das Aufkochen der Proben für fünf Minuten bei 96 °C. Anschließend wurden die Proben umgehend wieder auf Eis gelagert. Diese Behandlung diente der Denaturierung und Ladungsausrichtung der Proteine, damit diese anhand ihres Molekulargewichts im 4-20 % Mini-PROTEAN TGX Stain-free Gel aufgetrennt werden konnten. Anschließend wurde die Gelelektrophoresekammer nach Herstellerangaben zusammengebaut und mit 1x Laufpuffer

befüllt. Dann erfolgte das Beladen des Gels nach einem vorher festgelegten Schema. Es wurden 10 µl des Full Range Rainbow Markers in die erste Tasche und anschließend die Proben nacheinander in die verbleibenden Taschen an der Oberseite des Gels pipettiert. Die Elektrophorese wurde durch Anlegen einer Spannung von 20 mA (Milliampere) des PowerPack 300 gestartet. Nach 10 Minuten wurde die Spannung auf 40 mA erhöht und nach 30 bis 45 Minuten wieder gestoppt, nachdem sich die Proben und der Marker im Gel sichtbar aufgetrennt hatten. Das Gel wurde aus der Kammer genommen und 15 Minuten in Kathodenpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde entsprechend der Größe des Gels zugeschnitten und kurz in Methanol geschwenkt, anschließend zweimal in destilliertem Wasser gewaschen und dann für fünf Minuten in destilliertem Wasser äquilibriert. Es wurden 8 Stücke Whatman Papier zugeschnitten. Jeweils zwei Stücke inkubierte man in Anodenpuffer 1 und zwei Stücke in Anodenpuffer 2, sowie vier Stücke in Kathodenpuffer. Als Nächstes wurde die „Semi-dry-unit“ im Trans Blot Semi Dry von BioRad aufgebaut. Die Abfolge gestaltete sich von unten nach oben wie folgt: 2 x Whatman Papier in Anodenpuffer 1, 2 x Whatman-Papier in Anodenpuffer 2, PVDF-Membran, Gel, 4 x Whatman in Kathodenpuffer. Mit einer Glaspipette wurde über den Stapel aus Whatmanpapier, Membran und Gel gerollt, um sicherzustellen, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen befanden. An den Trans Blot Semi Dry wurde für 20 Minuten eine Spannung von 300 mA angelegt, sodass der Blot der Proteine auf die Membran erfolgte.

Im Anschluss wurden die Proteine immunhistochemisch auf der Membran nachgewiesen. Hierfür inkubierte man die Membran mit Blocking Solution in einem 50 ml Falcon Tube auf dem Rollmischer für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, COL 1A1 im Verhältnis 1:1000 zur Antikörpersolution (5 µl Antikörper + 5 ml Antikörpersolution) über Nacht bei 4°C. Diese Inkubation erfolgte ebenfalls in einem 50 ml Falcon Tube auf einem Rollmischer im Kühlschrank. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für jeweils 10 Minuten auf dem Rollmischer mit TBS-W gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Rabbit im Verhältnis 1:1000 zur Antikörpersolution (5 µl Antikörper + 5 ml Antikörpersolution) in einem 50 ml Falcon Tube für eine Stunde auf dem Rollmischer bei Raumtemperatur. Dann wusch man die Membran dreimal für etwa 10 Sekunden händisch mit TBS-W und anschließend wieder dreimal für 10 Minuten auf dem Rollmischer. War dieser Vorgang abgeschlossen wurde die abgetropfte Membran auf eine Glasplatte gelegt. Die beiden Substanzen aus dem ECL Western Blot Detection Kit wurden im Verhältnis 1:1 mit jeweils 300 µl angesetzt und auf die Membran gegeben. Die Entwicklung der Membran erfolgte im Anschluss im Chemilumineszenzmessgerät Fusion Solo S.

## 3.7 Zellversuche

### 3.7.1 Zellkultur

#### Allgemein

Das Anmischen der Medien, die Inkulturnahme der Zellen, das Aussäen der Zellen für die Versuche und die Versuchsdurchführung erfolgte unter sterilen Bedingungen an der Sterilwerkbank. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit Ventilöffnung ausgesät und bei 37 °C und einer Innenatmosphäre des Brutschranks von 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen passagiert. Die humanen gingivalen Fibroblasten wurden von Provitro (CRL-1619) bezogen. Verwendet wurden Fibroblasten, die sich maximal in Passage 10 befanden. Die SCC 25-Plattenepithelkarzinom-Zelllinie wurde von ATCC (CRL\_1628) bezogen.

Für die Kultur der humanen gingivalen Fibroblasten wurde DMEM Medium der Firma Gibco verwendet. Dem Medium wurden zehn Volumenprozent fetales Kälberserum, ein Volumenprozent Penicillin-Streptomycin (PSN) und ein Volumenprozent L-Glutamin (L/G) zugesetzt. Für die Kultivierung der Tumorzelllinie SCC 25 wurden dem DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham Medium von Sigma zehn Volumenprozent fetales Kälberserum, ein Volumenprozent PSN, ein Volumenprozent L/G und ein Volumenprozent Hydrocortison zugesetzt. Im Folgenden wird der Begriff „Medium“ für das jeweils passende Medium für die jeweilige Zelllinie verwendet. Alle verwendeten Zellen wurden vor Versuchsstart negativ auf Durchseuchung mit Mykoplasmen getestet

#### Vorbereitung für die Zellaussaat

Nach Verwerfen des verbrauchten Mediums wurden die Zellen mit 10 ml *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 6 ml Accutase bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und das Ablösen der Zellen nach 5 bis 10 Minuten unter dem Mikroskop überprüft. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt und die gesamte Zellsuspension in ein 50 ml Falcon Tube überführt. Die Zentrifugation erfolgte für die Fibroblasten für 5 Minuten bei 1500 x g und für die SCC 25-Tumorzellen für 5 Minuten bei 800 x g. Nach Dekantieren des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in 10 ml frischem Medium wurden 50 µl der jeweiligen Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau 1:1 gemischt. Zur Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurden 10 µl der jeweiligen Zelllösung in eine Zählkammer pipettiert und im Luna Zellzähler gezählt. Da Trypanblau nicht durch die intakte Zellmembran in eine vitale Zelle eindringen kann, bleibt das Zytosol farblos. Bei devitalen Zellen mit defekter Zellmembran färbt sich das Zytosol blau. Die für den jeweiligen Versuch erforderliche Zellstocklösung wurde auf der Grundlage der

gezählten vitalen Zellen berechnet und angesetzt. Die Zellen wurden je nach Versuchsanforderung ausgesät. Die nicht verwendeten Zellen wurden mit 20 ml Medium resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung erneut in Zellkulturflaschen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Größe der Zellkulturflasche war abhängig von der reinkubierten Zellmenge.

#### Verwendete Medien zur Stimulation

Bei allen Versuchen wurden die Zellen nach einer Ruhezeit von 24 Stunden mit unterschiedlichen Stimulanzmedien inkubiert. Die Basis der Stimulanzmedien bildete das jeweils passende Medium für die jeweilige Zellart. Die Mengen der Zusätze PSN, L/G und Hydrocortison blieben die gleichen, lediglich das fetale Kälberserum wurde von zehn auf ein Volumenprozent reduziert. Dem 1 %-FCS-Medium wurde unmittelbar vor dem Mediumswechsel die passende Menge Kollagen I bzw. Natriumcitrat zugemischt, sodass die Zellen nach dem Wechsel mit sechs unterschiedlichen Medien (siehe Tabelle 7) inkubiert wurden. Für die Kollagenproben wurde die Probe K5 verwendet, da bei dieser Probe der hohe Kollagen I Gehalt im Western Blot in zwei unabhängigen Durchläufen bestätigt werden konnte. Dem Vorgehen lag die Annahme zugrunde, dass der Gesamtproteingehalt dem Kollagengehalt entspricht. Um eine Konzentration von 20 µg/ml, 40 µg/ml und 60 µg/ml zu erreichen, wurde aus der K5-Probe die entsprechende Probenmenge entnommen. Die exakt pipettierten Mengen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Da das Kollagen in Natriumcitrat gelöst war, musste auch eine Kontrollgruppe mit Natriumcitrat angesetzt werden, um den potenziellen Einfluss des Natriumcitrats auf die Zellen abschätzen zu können. Da das verwendete Maximalvolumen an Kollagenlösung 18,6 µl betrug, wurde angenommen, dass dieses Volumen an Natriumcitrat geeignet war, um den Effekt des Lösungsmittels nach oben abzuschätzen. Deshalb wurde die gleiche Menge für die Natriumcitrat Kontrollgruppe verwendet. Im Folgenden wird die Schreibweise der Stimulanzmedien mit den unterschiedlichen Kollagen I-Konzentrationen im Fließtext vereinfacht. Das Medium mit 20 µg/ml entspricht Kollagen<sup>20</sup>, das mit 40 µg/ml entspricht Kollagen<sup>40</sup> und das mit 60 µg/ml entspricht Kollagen<sup>60</sup>.

Stimulanzmedium	Pipettierte Substanzen
Kollagenprobe 20 µg/ml = Kollagen <sup>20</sup>	6,2 µl Probe K5 + 1993,8 µl 1 %-FCS Medium
Kollagenprobe 40 µg/ml = Kollagen <sup>40</sup>	12,4 µl Probe K5 + 1987,6 µl 1 %-FCS Medium
Kollagenprobe 60 µg/ml = Kollagen <sup>60</sup>	18,6 µl Probe K5 + 1981,4 µl 1 %-FCS Medium
Kontrolle Natriumcitrat	18,6 µl Natriumcitrat + 1981,4 µl 1 %-FCS Medium
Kontrolle 10 %-FCS	2 ml 10 %-FCS Medium
Kontrolle 1 %-FCS	2 ml 1 %-FCS Medium

Tabelle 7: Ansatz der Stimulanzmedien

### Vorversuche

Um ein gleichmäßiges Wachstumsverhalten und einen standardisierten Arbeitsablauf zu gewährleisten, mussten vorab die Effekte der Nährmedien mit Zusatz von 10 %-FCS und 1 %-FCS getestet werden. Zudem wurde in Vorversuchen die ausgesäte Zellzahl, die Kulturdauer und dementsprechend die zeitlichen Abstände der Dokumentation unter dem Mikroskop und Messung im Plate Reader im Vorfeld getestet und optimiert. Diese Vorversuche waren Gegenstand der Etablierungsarbeit im Rahmen dieser Dissertation, werden im Weiteren aber nicht näher beschrieben. Beide Zellarten verhielten sich unter dem Einfluss von 10 %-FCS und 1 %-FCS annähernd gleich, sodass daraus geschlossen wurde, dass der verminderte FCS-Gehalt die Zellfunktion nicht negativ beeinflusste. Alle drei Zellversuche (alamarBlue™-Assay, Proliferationsassay und Scratch Assay) wurden sowohl mit Fibroblasten als auch mit den SCC 25-Tumorzellen durchgeführt. Es erfolgten drei unabhängige, identisch durchgeführte Durchgänge pro Test.

### 3.7.2 Untersuchung der Stoffwechselaktivität mittels alamarBlue™-Assay

AlamarBlue™ ist ein Reagenz der Firma Invitrogen, das den Farbstoff Resazurin enthält. Im alamarBlue™-Assay wird unter anderem die Stoffwechselaktivität von Zellen untersucht. Lebende Zellen betreiben Stoffwechsel und setzen blaues, nicht fluoreszierendes Resazurin um. Das Produkt dieser Redox-Reaktion ist pinkes, fluoreszierendes Resofurin. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen Reduzierung des Resazurins und der Zellzahl, also indirekt auch der Proliferation und Stoffwechselaktivität in einem bestimmten Konzentrationsbereich. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen ist es notwendig, in allen Durchgängen, alle Schritte im gleichen Zeitabstand durchzuführen. Der Versuchsaufbau wird im Folgenden beschrieben. Das Medium, das in Kombination mit dem alamarBlue™ Farbstoff verwendet wurde, wurde eigens für den Versuch angesetzt. Als Basis dienten die Grundmedien für die jeweilige Zellart. Es enthielt weder FCS noch Hydrocortison, lediglich ein Volumenprozent PSN

und ein Volumenprozent L/G. In eine 24-Well Platte wurden, wie in Abbildung 1 gezeigt, 30 000 Zellen pro Well in 1 ml Medium ausgesät. Die Reihe D der Platte blieb frei von Zellen und diente als Kontrolle, in der Abbildung als „Blank“ beschrieben. Zum Anwachsen wurden die Zellen in ihrem normalen Nährmedium mit zehn Volumenprozent FCS-Anteil im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumswechsel. Die vier Wells der sechs Spalten der Platte wurden mit den unterschiedlichen Stimulanzmedien versetzt und erneut inkubiert. Die Farbcodierung in Abbildung 1 dient der Zuordnung der Stimulanzmedien zur jeweiligen Reihe.

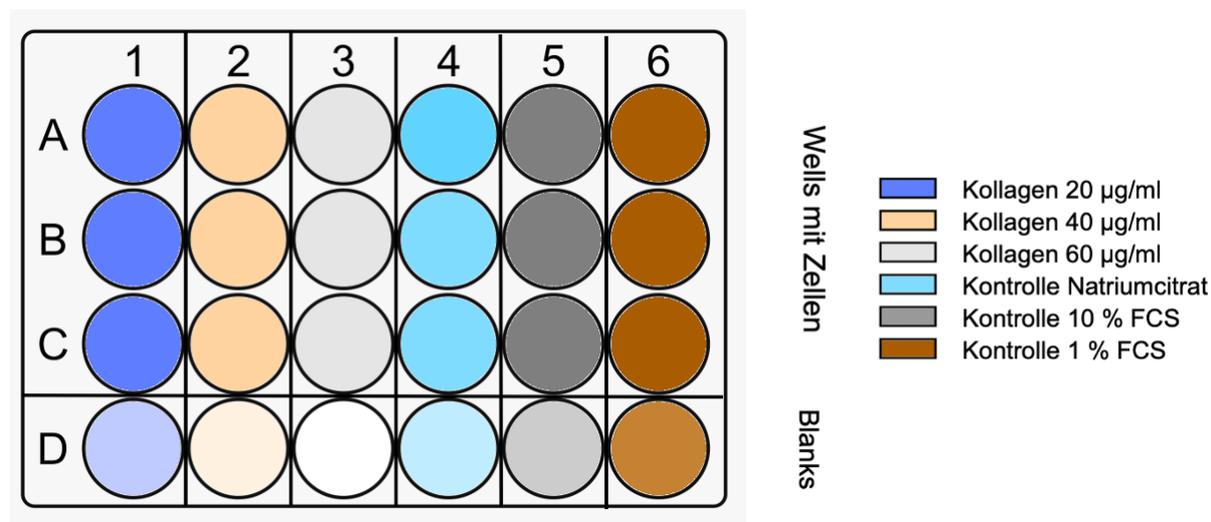


Abbildung 1: Belegungsplan 24-Well Platte für den alamarBlue™-Assay. In die Wells A-C aller Reihen wurden Zellen ausgesät. Die Reihe D diente als Kontrolle und wurde in der Abbildung als „Blank“ bezeichnet. Die Farbcodierung der Reihen 1-6 stehen für die unterschiedliche Behandlung mit den Stimulanz- bzw. Kontrollmedien (siehe Legende).

Nach 21 h wurden jeweils 25 ml der alamarBlue™-Medien mit 2,5 ml alamarBlue™ angesetzt. Die Stimulanzmedien wurden abpipettiert, in beschriftete Eppendorfgefäße überführt und bis zur Reinkubation an einem sauberen Ort bei Raumtemperatur aufbewahrt. Je 1 ml des alamarBlue™-Mediums wurden in jedes Well gegeben und die Platte anschließend für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der 3 h erfolgte die Duplett-Messung der Absorption in einer dunklen 96-Well-Platte mit einem durchsichtigen Boden. Hierfür wurde aus jedem Well der 24-Well Platte zweimal 100 µl abpipettiert und nach dem, in Abbildung 2 beschriebenen, Schema in die 96-Well-Platte gegeben. Die Reihen 1-6 wurden für die Messung bei Probenentnahme nach 24 h verwendet. Die Reihen A-F enthielten Proben aus den Wells mit Zellen, die Reihen G und H aus den Blanks. Analog erfolgte die Probenentnahme und das Pipettieren in die Reihen 7-12 bei Probenentnahme nach 48 h. Die Farbcodierung steht für die unterschiedliche Behandlung mit den Stimulanzmedien bzw. den Kontrollmedien. Im SpectraMax Plate Reader wurde bei einer Exzitation von 538 nm und einer

Emission von 600 nm mittels Endpoint Messung und Wellscan ein Messpunkt pro Well gemessen. Die Messung erfolgte direkt nach dem Pipettieren.

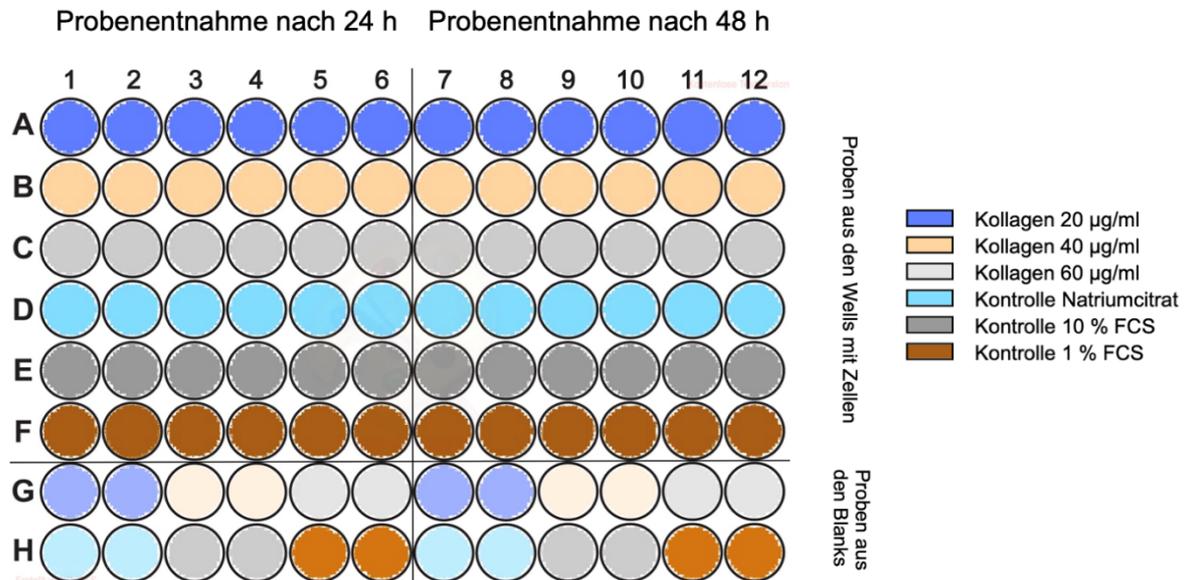


Abbildung 2: Belegungsplan 96-Well Platte zur Messung der Absorption beim alamarBlue™-Assay. Die Reihen 1-6 wurden für die Messung bei Probenentnahme nach 24 h verwendet. Pro Well der 24-Well Platte (siehe Abbildung 1) wurden je zweimal 100 µl abpipettiert und nebeneinander in die 96-Well-Platte gegeben. Die Reihen A-F enthielten Proben aus den Wells mit Zellen, die Reihen G und H aus den Blanks. Analog erfolgte die Probenentnahme und das Pipettieren in die Reihen 7-12 bei Probenentnahme nach 48 h. Die Farbcodierung steht für die unterschiedliche Behandlung mit den Stimulanzmedien bzw. den Kontrollmedien.

Anschließend wurde das restliche alamarBlue™ Medium aus der 24-Well Platte abpipettiert, die Stimulanzmedien erneut auf die Zellen gegeben und die Platte wieder im Brutschrank inkubiert. Nach weiteren 19 h wiederholte man den Vorgang. So erhielt man jeweils eine Messung 24 h und 48 h nach Beginn der Stimulation mit den Kollagenproben und Kontrollmedien. Die Ergebnisse der Messungen wurden anschließend in einem Tabellenkalkulationsprogramm dokumentiert und ausgewertet.

### 3.7.3 Untersuchung des Migrationsverhaltens mittels Scratch Assay

Der Scratch Assay ist eine Methode zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen *in vitro*. Die Methode beruht auf der Beobachtung, dass sich Zellen am Rande eines künstlich geschaffenen Spalts, inmitten eines konfluenten Zellrasens, in den Spalt migrieren und diesen vollständig oder teilweise schließen. Der für diese Arbeit verwendete Versuchsaufbau wird im Folgenden geschildert. Der Versuch wurde in 6-Well Platten durchgeführt, je eine Platte pro Zelltyp, wobei in der Wellmitte eine Ibidi-Kammer aus Silikon platziert wurde. Die Silikonformen bestanden aus zwei gleich großen, durch einen Steg getrennte Kammern.

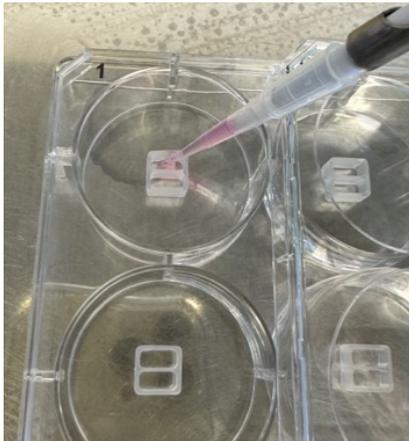


Abbildung 3: Foto: Pipettieren der Zellstocklösung in eine am Boden angedrückte Ibidi-Kammer.

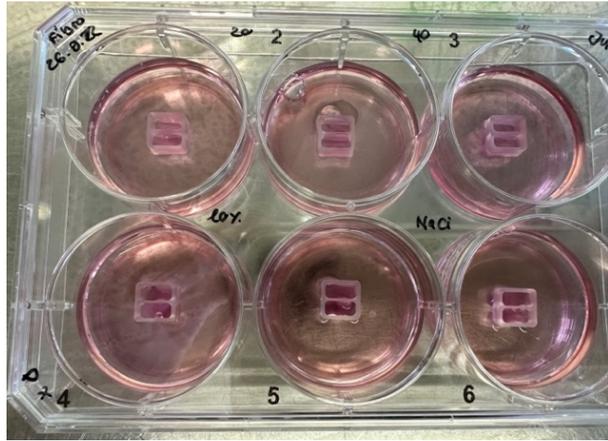


Abbildung 4: Foto: Für den Proliferations- und Migrationsassay fertig ausgesäte 6-Well-Platte.

In jede Kammer wurde 70  $\mu$ l der vorher angesetzten Zellstocklösung pipettiert (Abbildung 3) bei den Fibroblasten mit einer Zellkonzentration von 400 000 Zellen pro ml, bei den SCC 25-Tumorzellen mit einer Zellkonzentration von 500 000 Zellen pro ml. Nach 24 h waren die Zellen angewachsen und die Kammern konnten abgezogen werden (Abbildung 5).

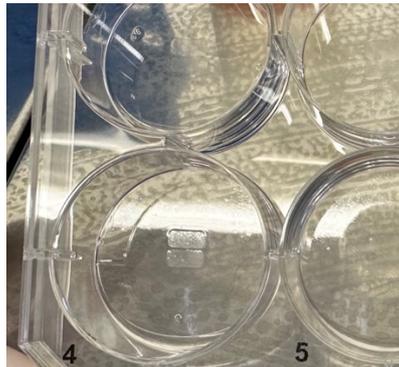


Abbildung 5: Foto: 6-Well-Platte nach Abziehen der Ibidi-Kammer, unten links ist der angewachsene Zellrasen sichtbar.

Es erfolgte dann die Inkubation mit den entsprechenden Stimulanz- und Kontrollmedien. Der durch den Steg blockierte Teil des Wells war nun als Spalt erkennbar (Abbildung 5), und wurde unter dem Mikroskop über die gesamte Fläche mittels vier Fotos dokumentiert. Nach 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 36 h wiederholte man die Aufnahme der Fotos, um das Schließen des Spalts durch die Zellen zu dokumentieren. Zwischen den Fotodokumentationen wurden die Platten im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms TScratch (vgl. Tabelle 8), welches die relative nicht-besiedelte Fläche auf den Fotos analysiert und prozentual darstellt.

### 3.7.4 Untersuchung des Proliferationsverhaltens

Für die Untersuchung des Proliferationsverhaltens wurden die gleichen Platten verwendet, wie beim Scratch Assay. Im Bereich um die Kammern herum wurden 10 000 Zellen ausgesät. Nach 24 h erfolgte der Mediumswechsel und Inkubation mit den Stimulanz- und Kontrollmedien. Analog zum Migrationsassay wurde zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 36 h an vier zufällig gewählten Stellen der jeweiligen Wells insgesamt Fotos gemacht. Anschließend wurden die Fotos mittels der open-source-Software imageJ ausgewertet, indem die Zellzahl auf den Fotos händisch gezählt wurde.

### 3.8 Datenauswertung

Die Datenauswertung erfolgte mithilfe der, in Tabelle 8 aufgelisteten, Computerprogramme. Zunächst wurden die Daten im Tabellenkalkulationsprogramm Excel dokumentiert und graphisch dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism.

Ausgewerteter Versuch	Verwendetes Programm	Version
Migrationsassay: Scratch Assay	TScratch	1.0 Copyright 2008 Tobias Geback, Martin Schulz ETH Zurich
Proliferationsassay	ImageJ	1.53k Wayne Rasband and contributors National Institutes of Health, USA
Stoffwechselaktivitäts und Viabilitätsassay: alamarBlue™-Assay	Microsoft® Excel für Mac (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA)	Version 16.68 (22121100)
Statistische Gesamtauswertung	GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., Californien, USA)	Version 6

Tabelle 8: Zur Auswertung verwendete Computerprogramme

### 3.9 Statistik

Alle Versuche wurden in drei Durchgängen unabhängig voneinander durchgeführt.

Da drei Durchgänge nicht ausreichen, um die Daten auf Normalverteilung statistisch testen zu können, wurde diese im Rahmen dieser Pilotstudie angenommen. Die Daten wurden mit einem 2-Way-Anova statistisch ausgewertet, wobei die Variablen Zeit und unterschiedliche Behandlung der Gruppen untersucht wurden. Mithilfe der Bonferroni-Methode wurde die Alphafehler-Kumulation bei multiplen Vergleichen neutralisiert. Die p-Werte sind in den Graphen wie folgt dargestellt: \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ . Die in den Graphen aufgetragenen Werte stellen die Mittelwerte aus den drei Durchgängen inklusive der positiven und negativen Standardabweichungen dar.

## 4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche präsentiert. Zunächst werden die ermittelten Gesamtproteinkonzentrationen, sowie die berechnete Gesamtkollagenmenge der einzelnen Kollagenproben tabellarisch aufgeführt. Anschließend erfolgt die Beschreibung der Ergebnisse des Western Blots, sowie darauffolgend die der Zellversuche. Hier wird zunächst die untersuchte Stoffwechselaktivität im alamarBlue<sup>TM</sup>-Assay dargestellt. Anschließend werden die Ergebnisse des Proliferationsassays und der Untersuchung des Migrationsverhaltens im Scratch Assay aufgeführt.

### 4.1 Kollagenisolation

#### 4.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration in den gewonnenen Kollagenproben

Die gemessenen Gesamtproteinkonzentrationen der Kollagenproben in  $\mu\text{g/ml}$  sowie die berechneten Gesamtkollagenmengen in  $\mu\text{g}$ , sind in der nachfolgenden Tabelle 9 aufgeführt.

Probe	Gesamtproteinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$	Gesamtkollagenmenge $\mu\text{g}$
Kollagen K1	3376,823	675,365
Kollagen K2	1987,296	794,918
Kollagen K3	3521,807	1138,287
Kollagen K4	4638,954	2365,866
Kollagen K5	2081,208	5203,02

Tabelle 9: Ergebnisse DC Protein Assays

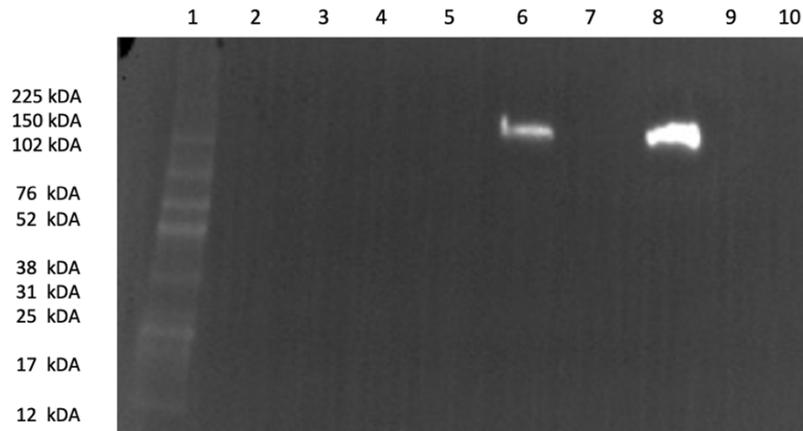
#### 4.1.2 Analyse des Kollagens im Western Blot

Aufgrund der komplexen Molekularstruktur von Kollagen bedurfte dessen Prozessierung mittels Western Blot zusätzlicher Schritte im Vorfeld. Zunächst musste herausgefunden werden, welche Behandlung der Proben ein reproduzierbares Ergebnis im Western Blot erzielte. Die Proben wurden im Vorfeld unterschiedlich behandelt. Alle Proben wurden zunächst mit RIPA Puffer versetzt (2 Volumeneinheiten Probe + 1 Volumeneinheit RIPA-Puffer). Anschließend wurden die mit RIPA Puffer versetzten Proben entweder mit Laemmli-Puffer und zusätzlich Mercapthoethanol (L+M) (4 Volumeneinheiten Probe mit RIPA-Puffer + 1 Volumeneinheit Laemmli-Puffer (9 Volumeneinheiten Laemmli-Puffer + 1 Volumeneinheit Mercapthoethanol)) versetzt oder mit Laemmli-Puffer ohne Mercapthoethanol (L-M) (4 Volumeneinheiten Probe mit RIPA-Puffer + 1 Volumeneinheit Laemmli-Puffer). Außerdem wurden die Proben vor der Überführung ins Gel entweder bei  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgeköcht oder ohne vorheriges Erhitzen in das Gel pipettiert. Es stellte sich heraus, dass die aufgekochten Proben

mit Laemmli-Puffer und ohne Mercaptoethanol am besten im Western Blot prozessiert werden konnten.

Exemplarisch sind hier zwei Durchläufe der durchgeführten Western Blot Untersuchungen aufgeführt. In Abschnitt A der Abbildung 6 sieht man das Ergebnis, in Abschnitt B den Belegungsplan des Western Blots „D5“.

A)



B)

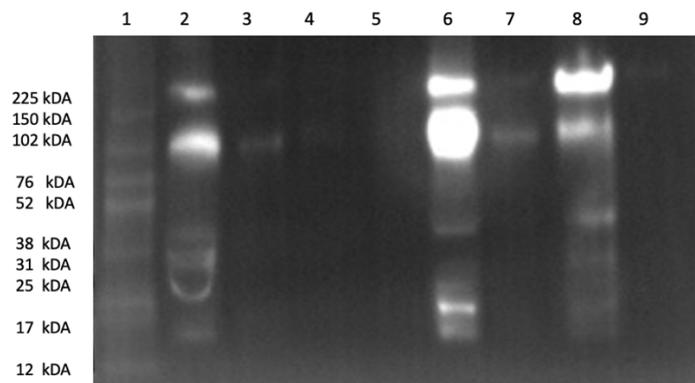
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Marker Full Range Rainbow 10 µg										
K3 40 µg L+M gekocht										
K3 40 µg L+M nicht gekocht										
K3 40 µg L-M gekocht										
K3 40 µg L-M nicht gekocht										
K5 40 µg L+M gekocht										
K5 40 µg L+M nicht gekocht										
K5 40 µg L-M gekocht										
K5 40 µg L-M nicht gekocht										
K3 5 µg L+M gekocht										

Abbildung 6: Darstellung des Kollagen I Western Blot "D5". Im Abschnitt A ist das Ergebnis abgebildet. Die Abbildung zeigt links den aufgetrennten Marker. In den Lanes 6 und 8 befindet sich jeweils auf Höhe der Markerbande zwischen 102 kDa und 150 kDa ein Chemilumineszenzsignal, welches bei Lane 8 stärker imponiert. In Abschnitt B ist der Belegungsplan dargestellt. Es wurden 10 Taschen belegt. Ganz links wurde der Marker in die Tasche pipettiert, anschließend jeweils 40 µg der K3 und K5 Probe. Die Proben wurden unterschiedliche behandelt. In der letzten Tasche befindet sich eine Probe mit 5 µg der K3 Probe.

Der Abschnitt B der Abbildung 6 zeigt den Belegungsplan des Western Blot „D5“. In den Taschen 2-5 befanden sich jeweils 40 µg der Kollagenprobe K3. Die Taschen 6 bis 9 wurden mit 40 µg der Kollagenprobe K5 belegt. Die letzte Tasche wurde von einer geringeren Menge, 5 µg, der Kollagenprobe K3 besetzt. Der Abschnitt A der Abbildung 6 zeigte die Membran nach Entwicklung im Chemilumineszenzentwickler Fusion Solo S. Die Alpha 1 und Alpha 2 Ketten von reifem Kollagen I haben ein Molekulargewicht zwischen 100 und 140 kDa. Die Alpha 1

und Alpha 2 Ketten von Prokollagen I haben ein Molekulargewicht zwischen 140 und 200 kDa. Auf der linken Seite befanden sich die Banden des Markers inklusive Legende (kDa). Man erkannte an den Positionen 6 und 8 ein Chemilumineszenzsignal in Form einer Bande, welches an Position 8 deutlich stärker imponierte. Beide Banden befanden sich auf der Höhe zwischen 102 kDa und 150 kDa und wurden als Beweis für das Vorliegen von Kollagen I angesehen. Die Proben sind gekocht worden und das Signal bei der Probe ohne Mercaptoethanol erschien deutlich stärker.

A)



B)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Marker Full Range Rainbow 10 µg										
K1 40 µg L-M gekocht										
K1 5 µg L-M gekocht										
K3 40 µg L-M gekocht										
K3 5 µg L-M gekocht										
K4 40 µg L-M gekocht										
K4 5 µg L-M gekocht										
K5 40 µg L-M gekocht										
K5 5 µg L-M gekocht										
										/

Abbildung 7: Darstellung des Kollagen I Western Blot „D6“. In Abschnitt A ist das Ergebnis dargestellt. Man erkennt die stärksten Chemilumineszenzsignale in den Lanes 2, 6 und 8. Man erkennt deutlich 2 Signale, eines der beiden etwa auf Höhe der 225 kDa Markerbande und das andere etwa auf der Höhe zwischen 102 kDa und 150 kDa. Abschnitt B zeigt den Belegungsplan des Gels „D6“. Es wurden 9 der 10 Taschen belegt. Ganz links wurde der Marker in die Tasche pipettiert, anschließend jeweils abwechselnd 5 µg und 40 µg der K5 Probe. Die Proben wurden unterschiedliche behandelt.

In Abschnitt A sieht man das Ergebnis des Western Blots „D6“ und in Abschnitt B der Abbildung 7 den dazugehörigen Belegungsplan des Western Blot „D6“. Es wurden jeweils zwei unterschiedliche Mengen (5 µg und 40 µg) der Proben K1, K3, K4 und K5 getestet. Die Proben wurden mit RIPA-Puffer und Laemmli-Puffer versetzt und bei 96 °C aufgekocht. An den Positionen 2, 6 und 8 waren die Signale am stärksten. Man erkennt 2 Signale, wobei sich eines auf Höhe der Markerbande bei 225 kDa und das andere etwa auf der Höhe zwischen 102 kDa

und 150 kDa befand. Das Signal bei 225 kDa deutete darauf hin, dass in diesem Durchlauf zusätzlich zu Kollagen I auch die Vorstufe Prokollagen I detektiert werden konnte. Prokollagen I hat ein Molekulargewicht von etwa 200 kDa bis 250 kDa. Das stärkste Signal für Kollagen I wurde an Position 6 bei 40 µg K4 detektiert, doch auch an Position 2 und 8 bei den Proben K3 und K5 konnten eindeutig erneut Kollagen I detektiert werden.

Da die Kollagenmenge aus den Probenlösungen K3 und K4 nicht für alle weiteren Versuche ausgereicht hätten, erfolgten die nachfolgenden Zellversuche mit Probe K5.

## **4.2 Messung der Stoffwechselaktivität**

Im alamarBlue™-Assay wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen untersucht. Es wurden Messungen nach einer Inkubationsdauer von 24 h und 48 h mit den Stimulanzmedien, die unterschiedliche Kollagenmengen enthielten, durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Folgenden aufgezeigt und erläutert.

### **4.2.1 Stoffwechselaktivität der Fibroblasten**

Die Inkubation von humanen Fibroblasten mit unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen zwischen 20 und 60 µg/ml konnte keinen Einfluss auf deren Stoffwechselaktivität nehmen (Abbildung 8). Weder nach 24 h noch 48 h Inkubation zeigten sich signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit Medium mit 1 % FCS inkubiert wurde. Insgesamt zeigten die Zellen ein sehr heterogenes Verhalten. Nach 24 h wies die Kollagen<sup>20</sup>-Gruppe eine um etwa die Hälfte reduzierte Stoffwechselaktivität im Vergleich zu den anderen Gruppen auf, deren Stoffwechselaktivität sich kaum unterschied. Nach 48 h erreichte die Kollagen<sup>20</sup>-Gruppe nun etwa die gleiche Stoffwechselaktivität, wie die 1 %-FCS Kontrollgruppe. Die Kollagen<sup>40</sup>-Gruppe, Kollagen<sup>60</sup>-Gruppe und die Natriumcitratkontrolle wiesen nach 48 h, im Vergleich zur 1 %-FCS Kontrolle, einen etwa doppelt so hohen Wert der Stoffwechselaktivität auf, wobei sehr große Standardabweichungen detektiert wurden. Die Standardabweichungen dieser drei Gruppen waren so stark, dass kaum von einem signifikanten Unterschied in der Stoffwechselaktivität der verschiedenen Gruppen gesprochen werden kann.

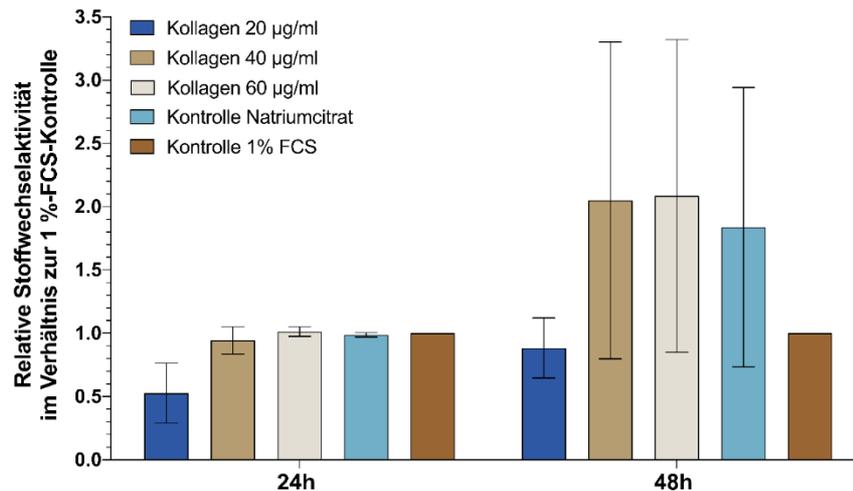


Abbildung 8: Gesamtauswertung der Stoffwechselaktivität gingivaler Fibroblasten. Das Balkendiagramm zeigt die relative Stoffwechselaktivität, im Verhältnis zur 1 %-FCS-Kontrolle, der Fibroblasten zu den Messzeitpunkten 24 h und 48 h nach Beginn der Inkubation mit den unterschiedlichen Stimulanzmedien. Aufgetragen sind die Mittelwerte der drei Durchgänge inklusive der positiven und negativen Standardabweichungen. Dargestellt sind die drei Gruppen, die mit den unterschiedlichen Kollagen I-Konzentrationen stimuliert wurden, die Natriumcitratkontrolle und die 1 %-FCS-Kontrolle. Für jeden Versuchsdurchlauf wurden die Mittelwerte der 1 %-FCS-Kontrolle des jeweiligen Messzeitpunkts als Richtwert angenommen, auf 1 gesetzt und alle anderen Mittelwerte des jeweiligen Durchgangs wurden darauf bezogen. Die 10 %-FCS-Kontrolle diente zur Evaluation, ob die Zellen in ihrer Stoffwechselaktivität durch die Reduktion des FCS-Anteils im Medium von zehn auf ein Volumenprozent verändert wurden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Stoffwechselaktivität durch die Reduktion des FCS-Anteils, daher wurde die 10 %-FCS-Kontrolle im Diagramm nicht mitaufgetragen. Die Daten wurden mittels 2-Way-Anova statistisch ausgewertet, wobei die Behandlungen mit den verschiedenen Stimulanzmedien pro Messzeitpunkt mit der 1 %-FCS-Kontrolle verglichen wurden. Signifikante Unterschiede wurden mit \* markiert wobei \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

#### 4.2.2 Stoffwechselaktivität der Tumorzelllinie SCC 25

Die Inkubation von SCC 25-Tumorzellen mit unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen zwischen 20 und 60 µg/ml konnte in den beiden niedrigeren Konzentrationen einen negativen Einfluss auf deren Stoffwechselaktivität nehmen (Abbildung 9). Bei Betrachtung der Gruppen zum Zeitpunkt 24 h zeigte sich, dass die Kollagen<sup>60</sup>-Gruppe sowie die Natriumcitratkontrolle im Vergleich zur 1 %-FCS-Kontrolle kaum Unterschiede in der Stoffwechselaktivität aufwiesen. Es fiel die um die Hälfte, somit signifikant ( $p < 0,0001$ ), reduzierte Aktivität der Kollagen<sup>20</sup>-Gruppe auf. Noch deutlicher war die auf ein Zehntel, im Vergleich zur 1 %-FCS Kontrolle, signifikant ( $p < 0,0001$ ) reduzierte Stoffwechselaktivität der Kollagen<sup>40</sup>-Gruppe. Beim zweiten Messpunkt nach 48 h waren die Werte der Stoffwechselaktivität der Kollagen<sup>20</sup> -, und Kollagen<sup>40</sup>-Gruppe im Vergleich zur 1 %-FCS-Kontrolle noch immer signifikant niedriger (Kollagen<sup>20</sup>:  $p \leq 0,001$ ; Kollagen<sup>40</sup>:  $p = 0,0002$ ). Auch die Kollagen<sup>60</sup>-Gruppe zeigte im Vergleich zur 1 %-FCS Kontrolle eine leichte Tendenz zur reduzierten Stoffwechselaktivität.

Die Stoffwechselaktivität der Natriumcitratkontrolle wies erneut keinen Unterschied zur 1 %-FCS-Kontrolle auf.

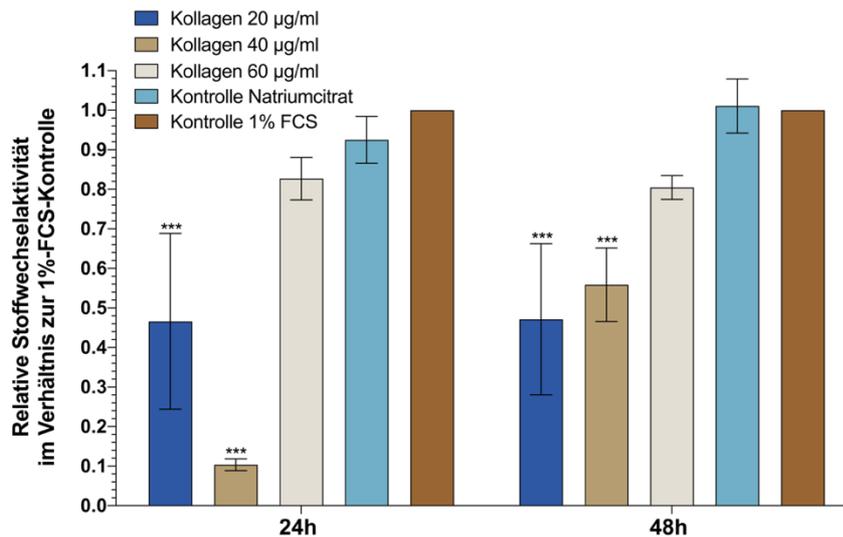


Abbildung 9: Gesamtauswertung der Stoffwechselaktivität der SCC 25-Tumorzellen. Das Balkendiagramm zeigt die relative Stoffwechselaktivität, im Verhältnis zur 1 %-FCS-Kontrolle, der Tumorzellen zu den Messzeitpunkten 24 h und 48 h nach Beginn der Inkubation mit den unterschiedlichen Stimulanzmedien. Aufgetragen sind die Mittelwerte der drei Durchgänge inklusive der positiven und negativen Standardabweichungen. Dargestellt sind die drei Gruppen, die mit den unterschiedlichen Kollagen I-Konzentrationen stimuliert wurden, die Natriumcitratkontrolle und die 1 %-FCS-Kontrolle. Für jeden Versuchsdurchlauf wurden die Mittelwerte der 1 %-FCS-Kontrolle des jeweiligen Messzeitpunkts als Richtwert angenommen, auf 1 gesetzt und alle anderen Mittelwerte des jeweiligen Durchgangs wurden darauf bezogen. Die 10 %-FCS-Kontrolle diente zur Evaluation, ob die Zellen in ihrer Stoffwechselaktivität durch die Reduktion des FCS-Anteils im Medium von zehn auf ein Volumenprozent verändert wurden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Stoffwechselaktivität durch die Reduktion des FCS-Anteils, daher wurde die 10 %-FCS-Kontrolle im Diagramm nicht mitaufgetragen. Die Daten wurden mittels 2-Way-Anova statistisch ausgewertet, wobei die Behandlungen mit den verschiedenen Stimulanzmedien pro Messzeitpunkt mit der 1 %-FCS-Kontrolle verglichen wurden. Signifikante Unterschiede wurden mit \* markiert wobei \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

### 4.3 Zellproliferation

Für die Untersuchung des Proliferationsverhaltens wurden 10 000 Zellen ausgesät, nach 24 h mit den Stimulanzmedien inkubiert und nach 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 36 h wurde an vier zufällig gewählten Stellen der jeweiligen Wells Fotos aufgenommen. Anschließend wurden die Fotos mittels ImageJ ausgewertet, indem die Zellzahl auf den Fotos händisch gezählt wurde.

#### 4.3.1 Proliferationsverhalten der Fibroblasten

Die Inkubation von humanen gingivalen Fibroblasten mit unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen zwischen 20 und 60 µg/ml konnte einen geringen Einfluss auf deren Proliferationsverhalten nehmen (Abbildung 10). Nach 4 h, 8 h und 12 h gab es nur geringfügige Unterschiede zwischen den Gruppen. Nach 24 h stieg die Zellzahl in allen

Gruppen an. Bei den Kollagen-Gruppen konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Trend zur stärkeren Proliferation beobachtet werden. Die Zellproliferation bei Kollagen<sup>20</sup> lag nach 36 h signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,0238$ ). Bei Kollagen<sup>40</sup> ( $p = 0,5881$ ), sowie bei Kollagen<sup>60</sup> ( $p = 0,1369$ ) nahm das Proliferationsverhalten ebenfalls zu, blieb jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Abbildung 10). Die Werte der 10 %-FCS-Kontrolle sowie der Natriumcitratkontrolle unterschieden sich nicht signifikant von der 1 %-FCS-Kontrollgruppe, weshalb die Werte dieser beiden Gruppen aus Gründen der besseren Übersicht hier nicht aufgeführt sind.

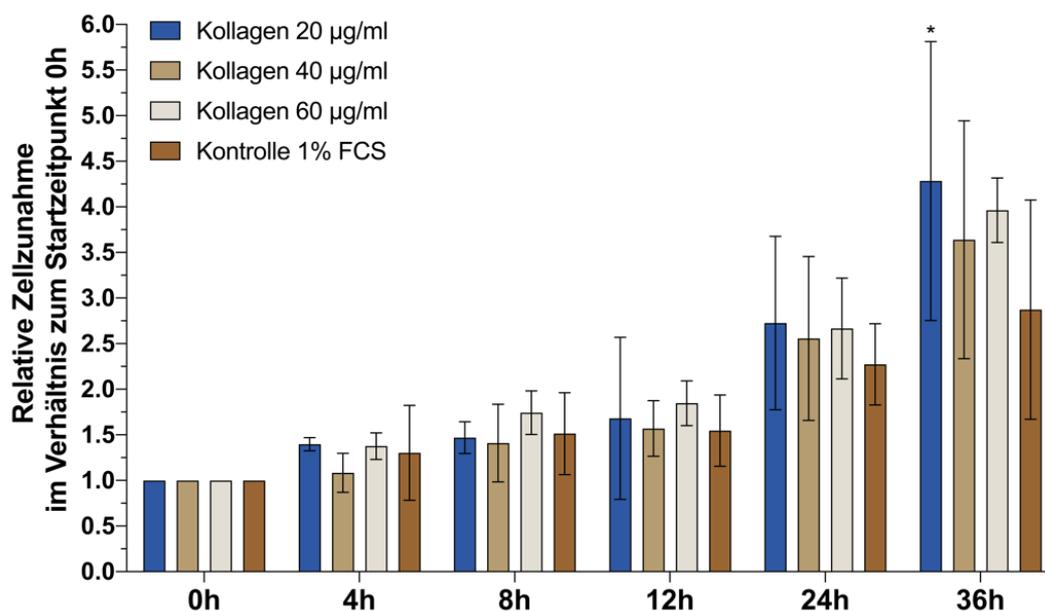


Abbildung 10: Gesamtauswertung des Proliferationsverhaltens gingivaler Fibroblasten. Das Balkendiagramm zeigt die relative Zellzunahme der Fibroblasten in Relation zum Zeitpunkt 0 h (=1). Die Mittelwerte aus allen drei Durchgängen von allen Gruppen, die mit den unterschiedlichen Kollagen I-Stimulanzmedien behandelt wurden, sowie die 1 %-FCS-Kontrolle zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 36 h nach Inkubation mit den Stimulanzmedien sind mit positiver und negativer Standardabweichung aufgetragen. Die Zellzahl beim Messpunkt 0 h wurden als Startzeitpunkt als Bezugswert angenommen, auf 1 gesetzt und alle anderen Mittelwerte des jeweiligen Durchgangs wurden darauf bezogen. So wurden die Daten im Bezug zum Startzeitpunkt 0 h dargestellt. Die Werte der 10 %-FCS-Kontrolle sowie der Natriumcitratkontrolle unterschieden sich nicht statistisch signifikant von der 1 %-FCS-Kontrollgruppe, weshalb die Werte dieser beiden Gruppen aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht aufgeführt sind. Die Daten wurden mittels 2-Way-Anova statistisch ausgewertet, wobei die unterschiedlichen Behandlungen mit den Kollagen I-Stimulanzmedien pro Messzeitpunkt mit der 1 %-FCS-Kontrolle verglichen wurden. Signifikante Unterschiede wurden mit \* markiert wobei \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

#### 4.3.2 Proliferationsverhalten der Tumorzelllinie SCC 25

Das Proliferationsverhalten der SCC 25-Tumorzellen wurde durch den Zusatz von Kollagen beeinflusst (Abbildung 11). Während es nach 4 h, 8 h, 12 h und 24 h zu einer konstanten, aber nicht signifikanten Zunahme der Zellproliferation im Vergleich zur 1 %-FCS-Kontrollgruppe kam, war die Zellzahl nach 36 h in allen drei Kollagengruppen signifikant höher als in der

Kontrollgruppe ( $p < 0,0001$ ). Innerhalb der Kollagen Gruppen lagen keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf vor (Kollagen<sup>20</sup>:  $p < 0,0001$ ; Kollagen<sup>40</sup>:  $p < 0,0001$ ; Kollagen<sup>60</sup>:  $p < 0,0001$ ) (Abbildung 11). Die Werte der 10 %-FCS-Kontrolle, sowie der Natriumcitratkontrolle unterschieden sich nicht signifikant von der 1 %-FCS-Kontrollgruppe, weshalb die Werte dieser beiden Gruppen aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht aufgeführt wurden.

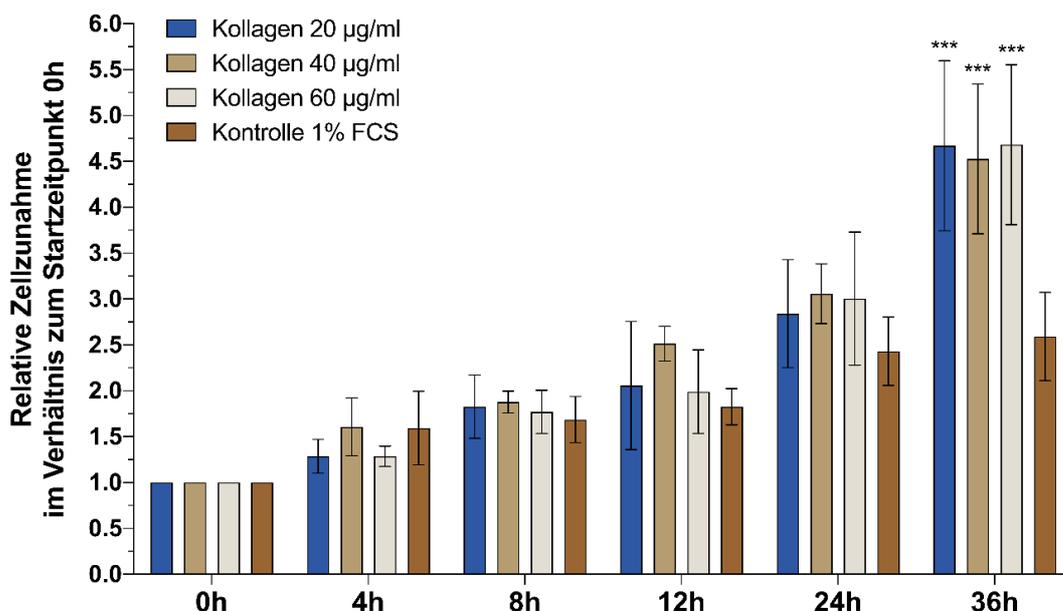


Abbildung 11: Gesamtauswertung des Proliferationsverhaltens der SCC 25-Tumorzellen. Das Balkendiagramm zeigt die relative Zellzunahme der Tumorzellen in Relation zum Zeitpunkt 0 h (=1). Die Mittelwerte aus allen drei Durchgängen von allen Gruppen, die mit den unterschiedlichen Kollagen I-Stimulanzmedien behandelt wurden, sowie die 1 %-FCS-Kontrolle zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 36 h nach Inkubation mit den Stimulanzmedien sind mit positiver und negativer Standardabweichung aufgetragen. Die Zellzahl beim Messpunkt 0 h wurden als Startzeitpunkt als Bezugswert angenommen, auf 1 gesetzt und alle anderen Mittelwerte des jeweiligen Durchgangs wurden darauf bezogen. So wurden die Daten im Bezug zum Startzeitpunkt 0 h dargestellt. Die Werte der 10 %-FCS-Kontrolle sowie der Natriumcitratkontrolle unterschieden sich nicht statistisch signifikant von der 1 %-FCS-Kontrollgruppe, weshalb die Werte dieser beiden Gruppen aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht aufgeführt wurden. Die Daten wurden mittels 2-Way-Anova statistisch ausgewertet, wobei die unterschiedlichen Behandlungen mit den Kollagen I-Stimulanzmedien pro Messzeitpunkt mit der 1 %-FCS-Kontrolle verglichen wurden. Signifikante Unterschiede wurden mit \* markiert wobei \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

#### 4.3.3 Vergleich des Proliferationsverhaltens zwischen Fibroblasten und der Tumorzelllinie SCC 25

Beim Vergleich des Proliferationsverhaltens zeigte sich eine leichte Tendenz zur stärkeren Zellzunahme der SCC 25-Tumorzellen im Vergleich zu den Fibroblasten innerhalb der Gruppen unter Kollageneinfluss (Abbildung 12). Nach 8 h zeigte sich eine tendenziell stärkere Zunahme der Tumorzellzahl in den Kollagen Gruppen (Abbildung 12 A). Nach 12 h und 24 h schienen Fibroblasten und Tumorzellen ähnlich stark durch das Kollagen beeinflusst worden

zu sein (Abbildung 12 B und C). Nach 36 h zeigte sich eine Tendenz zum stärkeren Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Tumorzellen, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abbildung 12 D).

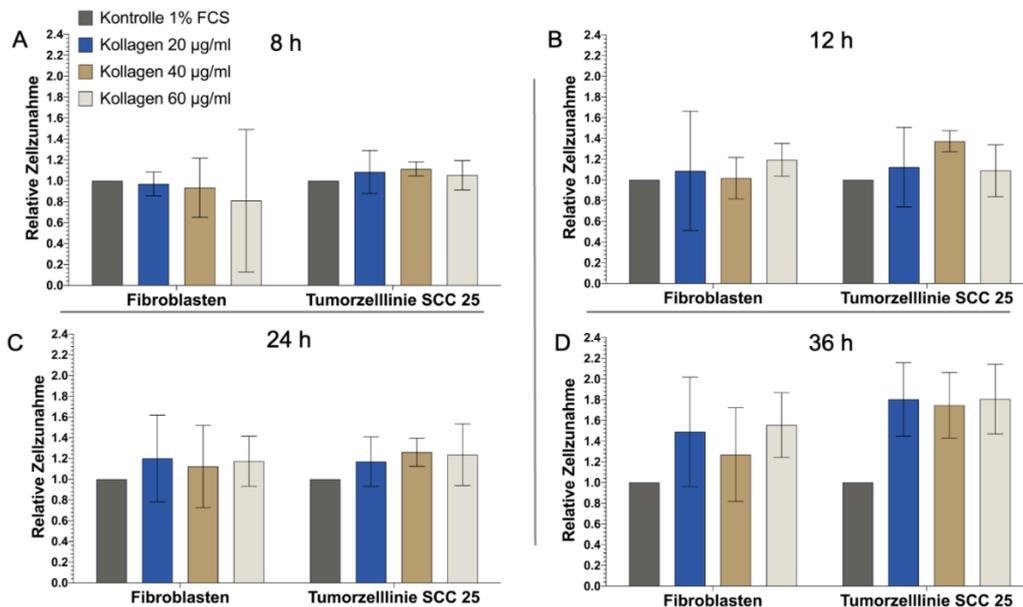


Abbildung 12: Vergleich des Proliferationsverhaltens von Fibroblasten und SCC 25-Tumorzellen zu verschiedenen Zeitpunkten: (A) 8 h, (B) 12 h, (C) 24 h, (D) 36 h. Dargestellt wird die relative Zellzunahme der Kollagengruppen zwischen Fibroblasten und Tumorzellen in Relation zum Zeitpunkt 0 h (=1) und im Verhältnis zur 1 %-FCS-Kontrolle, verglichen. Die Zellzahl beim Messpunkt 0 h wurden als Startzeitpunkt als Bezugswert angenommen, auf 1 gesetzt und alle anderen Mittelwerte des jeweiligen Durchgangs wurden darauf bezogen. Anschließend wurden die Werte der 1 % FCS-Kontrolle des jeweiligen Durchgangs und Messzeitpunkts als Bezugswert angesehen, auf 1 gesetzt und alle anderen Mittelwerte darauf bezogen. Die Diagramme zeigten die Mittelwerte der drei Durchgänge inklusive negativer und positiver Standardabweichung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inkubation mit den Stimulanzmedien. Die Legende im Bereich A gilt für die gesamte Abbildung. Die Daten wurden mittels 2-Way-Anova statistisch ausgewertet, wobei Zellzahlen zwischen Fibroblasten und Tumorzellen mit derselben Behandlung zum selben Zeitpunkt miteinander verglichen wurde.

## 4.4 Migrationsverhalten

Im Scratch Assay wurde das Migrationsverhalten von gingivalen Fibroblasten und SCC 25-Tumorzellen *in vitro* untersucht. Die Methode beruhte auf der Beobachtung, dass sich Zellen vom Rande eines, inmitten eines konfluenten Zellrasens künstlich geschaffenen Spalts, in Richtung des Spaltes bewegen und diesen in einem bestimmten Zeitraum teilweise oder vollständig schließen. Dieser Spalt wurde unter dem Mikroskop über die gesamte Fläche zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 36 h dokumentiert.

### 4.4.1 Migrationsverhalten der Fibroblasten

Die Inkubation von humanen gingivalen Fibroblasten mit unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen zwischen 20 und 60 µg/ml zeigte einen statistisch signifikanten

Einfluss auf deren Migrationsverhalten (Abbildung 13). Nach 4 h Inkubation konnte eine Tendenz zur stärkeren Migration der Zellen der Kollagengruppen mit den beiden höheren Konzentrationen im Vergleich zur 1 %-FCS-Kontrolle festgestellt werden (Kollagen<sup>40</sup>:  $p = 0,2531$ , Kollagen<sup>60</sup>:  $p = 0,2126$ ). Nach 8 h zeigte sich die Zellmigration bei allen Kollagenkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe bereits signifikant gesteigert (Kollagen<sup>20</sup>:  $p \leq 0,0146$ ; Kollagen<sup>40</sup> und Kollagen<sup>60</sup>  $p < 0,001$ ) (Abbildung 13). Nach 12 h und 24 h war das Migrationsverhalten in allen drei Kollagengruppen ebenso signifikant höher ( $p < 0,001$ ). Nach 36 h erreichten alle Kollagengruppen den Wert 1, was einer vollständigen Besiedlung / einem Verschluss der offenen Fläche entsprach (Abbildung 13). Die Werte der 10 %-FCS-Kontrolle sowie der Natriumcitratkontrolle unterschieden sich nicht statistisch signifikant von der 1 %-FCS-Kontrollgruppe, weshalb die Werte dieser beiden Gruppen aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit hier nicht aufgeführt wurden. Die Messzeitpunkte von 0 h wurden nicht in das Diagramm mit aufgenommen, da hier die Werte in allen Gruppen, im Sinne einer Baseline, 0 waren.

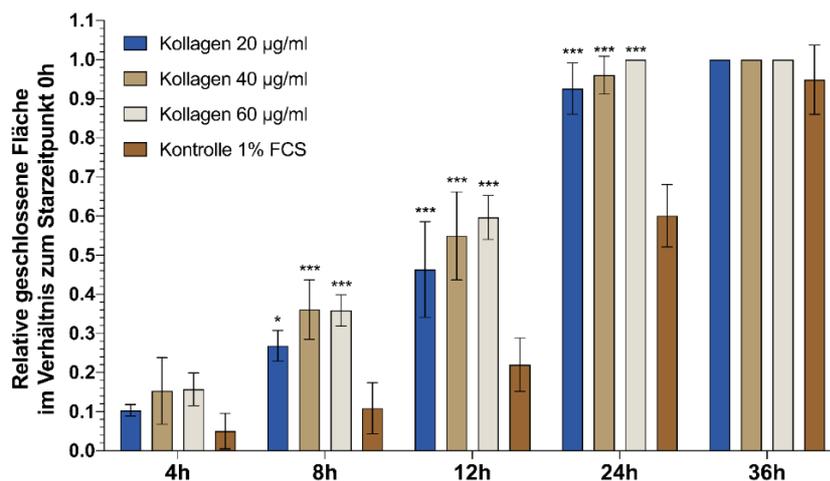


Abbildung 13: Gesamtauswertung des Migrationsverhaltens gingivaler Fibroblasten. Das Balkendiagramm zeigt die relative geschlossene Fläche der Fibroblasten in Relation zum Zeitpunkt 0 h (=0). Die Mittelwerte aus allen drei Durchgängen von allen Gruppen, die mit den unterschiedlichen Kollagen I-Stimulanzmedien behandelt wurden, sowie die 1 %-FCS-Kontrolle zu den Zeitpunkten 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 36 h nach Inkubation mit den Stimulanzmedien sind mit positiver und negativer Standardabweichung aufgetragen. Die geschlossene Fläche wurde zum Startzeitpunkt als Bezugswert angenommen, auf 0 gesetzt und alle anderen Mittelwerte des jeweiligen Durchgangs wurden darauf bezogen. So wurden die Daten im Bezug zum Startzeitpunkt 0 h dargestellt. Die Daten wurden mittels 2-Way-Anova statistisch ausgewertet, wobei die unterschiedliche Behandlung mit den Kollagen I-Stimulanzmedien pro Messzeitpunkt mit der 1 %-FCS-Kontrolle verglichen wurden. Signifikante Unterschiede wurden mit \* markiert wobei \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

Zur Veranschaulichung wurden im Folgenden exemplarisch zwei repräsentative Fotoreihen des unter dem Mikroskop dokumentierten Migrationsverhaltens der Fibroblasten abgebildet (Abbildung 14 und Abbildung 15). Zur Verdeutlichung der Grenzen zwischen Zellen und dem

unbewachsenen Spalt, wurden diese blau markiert. Dargestellt ist hier auch der Startzeitpunkt (0 h), um zu verdeutlichen, dass in allen Gruppen der Spalt nahezu identisch groß war. Ebenso verdeutlichen die Fotos nach 36 h Inkubation, dass in beiden Gruppen die Zellen den Spalt bereits vollständig besiedelt / geschlossen hatten. Abbildung 14 zeigt die 1 %-FCS-Kontrolle des zweiten Durchgangs zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h. Man erkannte zum Zeitpunkt 0 h deutlich die klaren Grenzen des Spalts, der durch den Steg der Ibidi-Kammer zustande kam. Im Verlauf der dokumentierten Fotos wuchsen die Zellen vom Bereich des konfluenten Zellrasens in Richtung des Spalts, bis sie ihn nach 24 h nahezu vollständig besiedelt hatten. Nach 36 h imponierte ein konfluenter Zellrasen. Abbildung 15 zeigt die Kollagen<sup>60</sup>-Gruppe des zweiten Durchgangs zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h. Man erkennt bei Versuchsbeginn (0 h) deutlich die klaren Spaltgrenzen. Im Verlauf der dokumentierten Fotos wuchsen die Zellen vom Bereich des konfluenten Zellrasens in Richtung des Spalts, den sie nach 24 h bereits vollständig besiedelt hatten (Abbildung 15 E). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe war deutlich zu erkennen, dass die Fibroblasten, die mit dem Stimulanzmedium inkubiert wurden, den Spalt deutlich schneller schließen konnten.

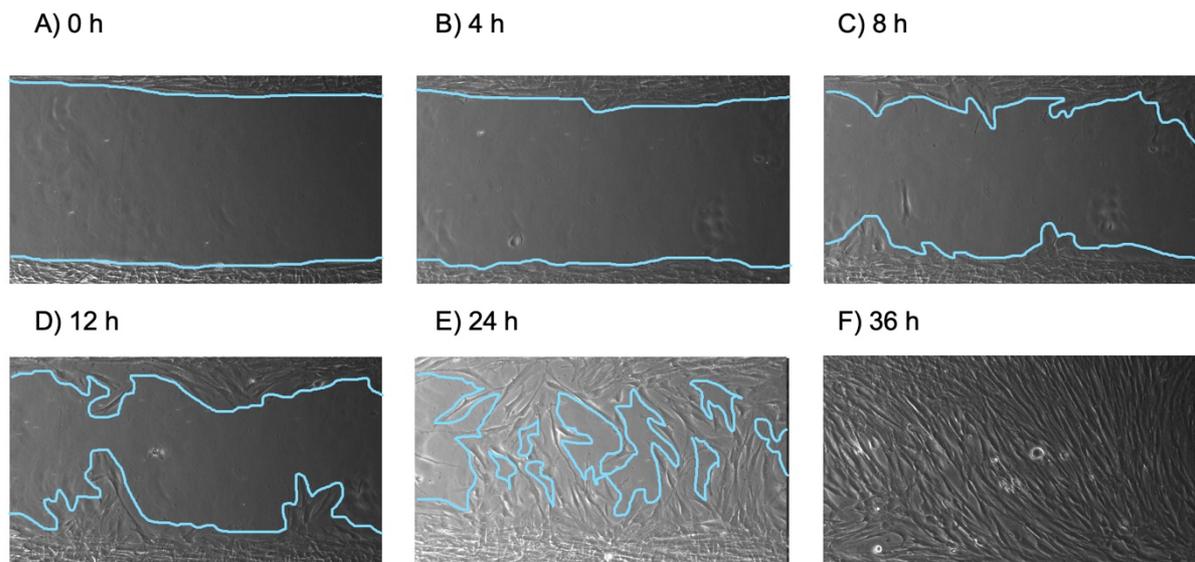


Abbildung 14: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten der 1 %-FCS-Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h. Die Grenzen zwischen den Zellen und dem unbewachsenen Spalt sind blau markiert. Nach 0 h (A) erkennt man die, den Spalt klar begrenzenden Zellreihen. Nach 4 h (B) erschienen die Grenzen unklarer zu werden. Nach 8 h (C) begannen einzelne Zellen in den Spalt hineinzuwachsen, ähnliche Situation nach 12 h (D). Nach 24 h (E) hatten die Zellen den Spalt annähernd zugewachsen. Nach 36 h (F) imponierte ein konfluenter Zellrasen, es ist kein Spalt mehr sichtbar.

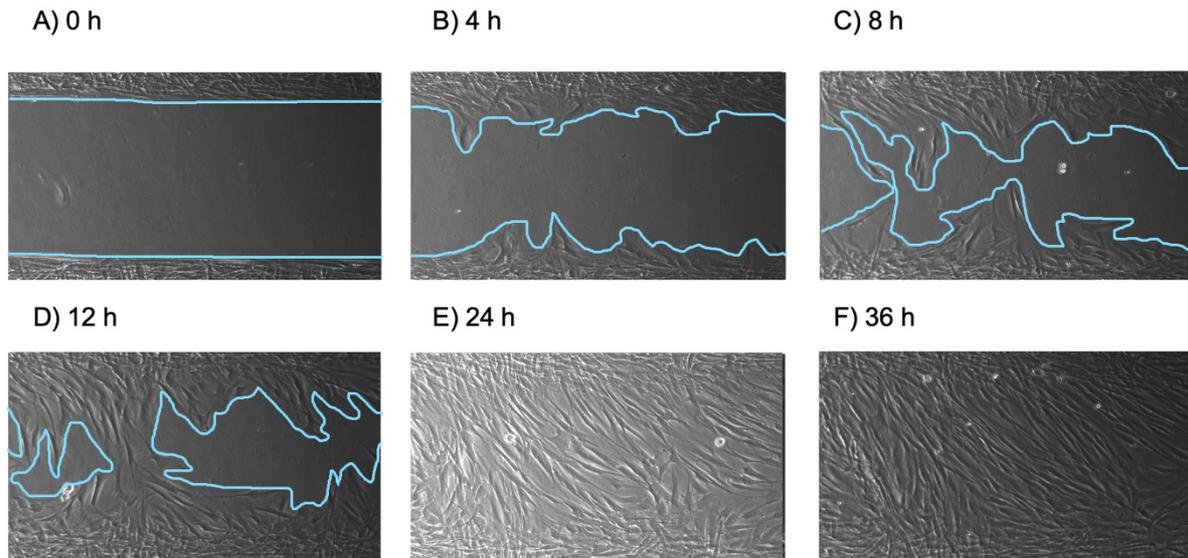


Abbildung 15: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Fibroblasten der Kollagen<sup>60</sup>-Gruppe zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h. Die Grenzen zwischen den Zellen und dem unbewachsenen Spalt sind blau markiert. Nach 0 h (A) erkannte man die, den Spalt klar begrenzenden Zellreihen. Nach 4 h (B) begannen einzelne Zellen in den Spalt hineinzuwachsen, ähnliche Situation stellte sich nach 12 h (D) dar. Nach 24 h (E) hatten die Zellen den Spalt bereits zugewachsen. Nach 36 h (F) imponierte ein konfluenter Zellrasen, es ist kein Spalt mehr sichtbar.

#### 4.4.2 Migrationsverhalten der Tumorzelllinie SCC 25

Die Inkubation von SCC 25-Tumorzellen mit den Kollagenkonzentrationen 20, 40 und 60  $\mu\text{g/ml}$  zeigte einen statistisch signifikanten Einfluss auf das Zellmigrationsverhalten (Abbildung 16). Nach 4 h zeigte sich die Zellmigration in den Gruppen mit Kollagen gegenüber der 1 %-FCS-Kontrolle nicht signifikant aber im Sinne einer erkennbaren Tendenz erhöht (Kollagen<sup>20</sup>:  $p = 0,8671$ ; Kollagen<sup>40</sup>:  $p = 0,9292$ , Kollagen<sup>60</sup>:  $p = 0,2355$ ). Nach 8 h war die Zellmigration bei allen Kollagenkonzentrationen im Sinne einer großflächigeren Spaltbesiedlung gegenüber der 1 %-FCS Kontrolle signifikanter erhöht (Kollagen<sup>20</sup>:  $p = 0,0022$ ; Kollagen<sup>40</sup>:  $p = 0,0062$ ; Kollagen<sup>60</sup>:  $p < 0,0001$ ). Den gleichen signifikanten Unterschied konnte man ebenso nach 12 h ( $p < 0,0001$ ) und 24 h ( $p < 0,0001$ ) erkennen. Nach 36 h erreichten alle Kollagengruppen im Sinne einer vollständigen Spaltbesiedlung den Wert 1 (Abbildung 16). Auf die Darstellung der 10 %-FCS-Kontrolle, sowie der Natriumcitratkontrolle wurde bei fehlendem Unterschied zur 1 %-FCS-Kontrolle aus Gründen der besseren Übersicht verzichtet. Die Messzeitpunkte von 0 h wurden nicht in das Diagramm mit aufgenommen, da hier die Werte in allen Gruppen im Sinne einer Baseline 0 waren.

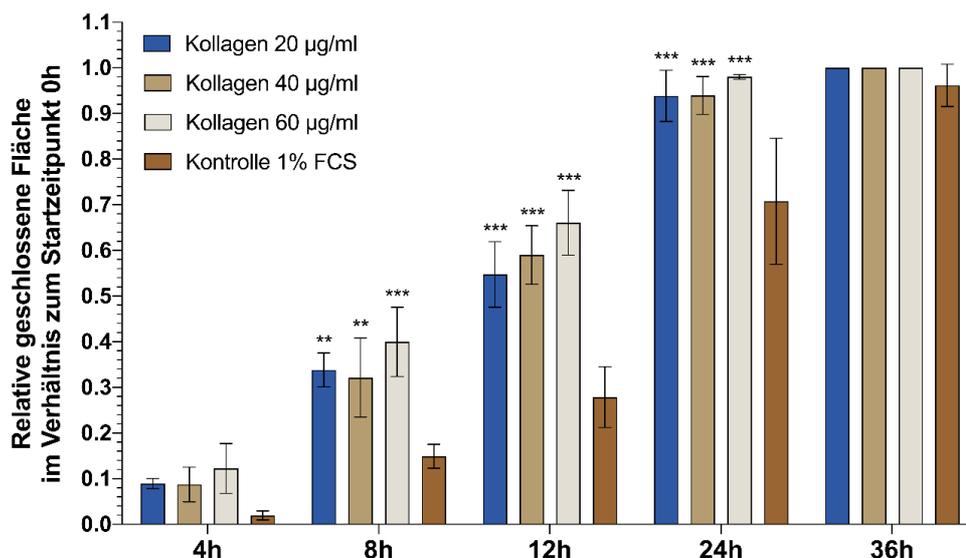


Abbildung 16: Gesamtauswertung des Migrationsverhaltens der SCC 25-Tumorzellen. Das Balkendiagramm zeigt die relative geschlossene Fläche der Tumorzellen in Relation zum Zeitpunkt 0 h (=0). Die Mittelwerte aus allen drei Durchgängen von allen Gruppen, die mit den unterschiedlichen Kollagen I-Stimulanzmedien behandelt wurden, sowie die 1%-FCS-Kontrolle zu den Zeitpunkten 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 36 h nach Inkubation mit den Stimulanzmedien sind mit positiver und negativer Standardabweichung aufgetragen. Die geschlossene Fläche wurde zum Startzeitpunkt als Bezugswert angenommen, auf 0 gesetzt und alle anderen Mittelwerte des jeweiligen Durchgangs wurden darauf bezogen. So wurden die Daten im Bezug zum Startzeitpunkt 0 h dargestellt. Die Daten wurden mittels 2-Way-Anova statistisch ausgewertet, wobei die unterschiedliche Behandlung mit den Kollagen I-Stimulanzmedien pro Messzeitpunkt mit der 1%-FCS-Kontrolle verglichen wurden. Signifikante Unterschiede wurden mit \* markiert wobei \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

Zur Veranschaulichung wurden im Folgenden exemplarisch zwei fotomikroskopische Bildreihen zum Migrationsverhalten der SCC 25-Tumorzellen abgebildet (Abbildung 17 und Abbildung 18). Zum Vergleich stellt Abbildung 17 das Migrationsverhalten der 1%-FCS-Kontrollgruppe, sowie Abbildung 18 das Migrationsverhalten der Kollagen<sup>60</sup> Gruppe dar. Zur Verdeutlichung der Spaltgrenzen wurden diese blau markiert. Während die Spaltfläche zu Beginn im Gruppenvergleich nahezu identisch groß war (Abbildung 17 A und Abbildung 18 A), so zeigte sich die Migration nach 12 h und 24 h in der 1%-FCS-Kontrollgruppe (Abbildung 17 D und E) im Vergleich zur Kollagen<sup>60</sup>-Gruppe (Abbildung 18 D und E) sichtbar weniger fortgeschritten. Nach 36 h hatten die Zellen in der Kollagen<sup>60</sup>-Gruppe (Abbildung 18 F) die Fläche bereits vollständig geschlossen, wobei bei den Zellen der 1%-FCS-Kontrollgruppe (Abbildung 17 F) ein Restspalt detektiert werden konnte, der Spalt also nur annähernd vollständig geschlossen war.

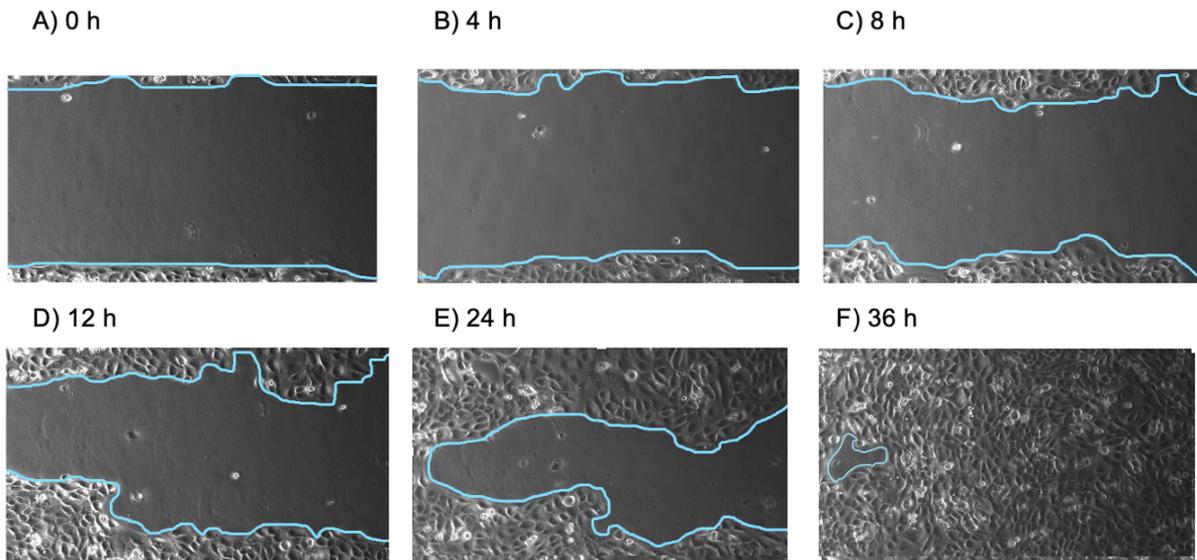


Abbildung 17: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der SCC 25-Tumorzellen der 1%-FCS-Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h. Die Grenzen zwischen den Zellen und dem unbewachsenen Spalt sind blau markiert. Nach 0 h (A) erkennt man die, den Spalt klar begrenzenden, Zellreihen. Nach 4 h (B) erschienen die Grenzen unklarer zu werden. Nach 8 h (C) begannen einzelne Zellen in den Spalt hineinzuwachsen, ähnliche Situation nach 12 h (D). Nach 24 h (E) und nach 36 h (F) waren schon viele Zellen in den noch klar detektierbaren Spalt hineingewachsen.

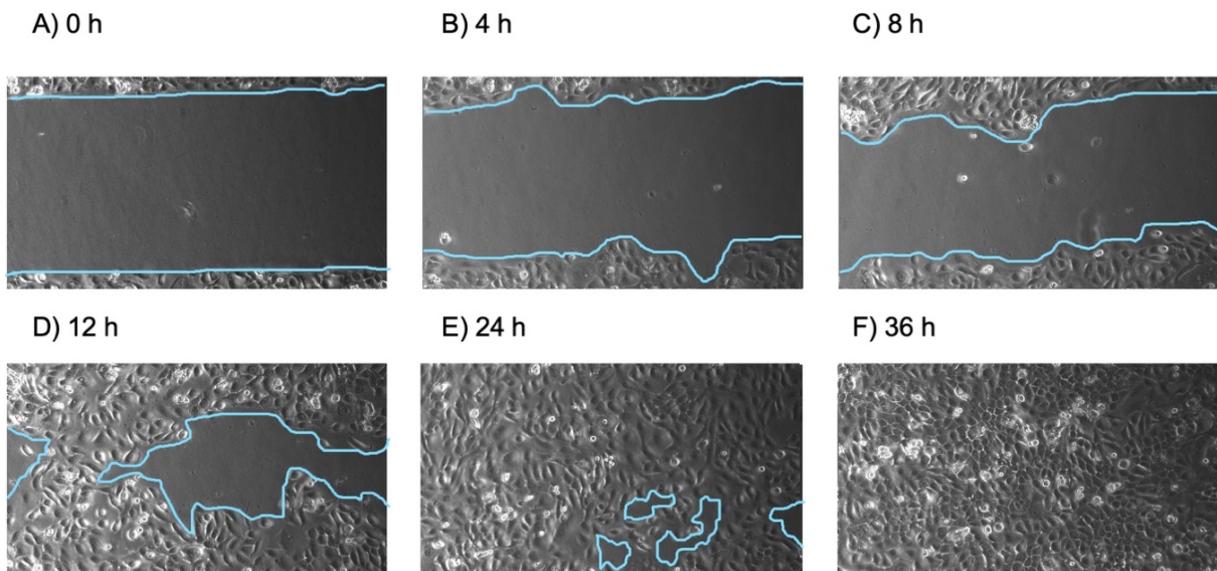


Abbildung 18: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der SCC 25-Tumorzellen der Kollagen<sup>60</sup>-Gruppe zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h. Die Grenzen zwischen den Zellen und dem unbewachsenen Spalt sind blau markiert. Nach 0 h (A) erkannte man die, den Spalt klar begrenzenden, Zellreihen. Nach 4 h (B) begannen die Zellen in den Spalt hineinzuwachsen, ähnliches Bild nach 8 h (C) Nach 12 h (D) war nur noch ein kleiner Spalt zu sehen. Nach 24 h (E) war der Spalt nahezu vollständig geschlossen und nach 36 h (F) imponierte ein konfluenter Zellrasen ohne erkennbaren Spalt.

#### 4.4.3 Vergleich des Migrationsverhaltens zwischen Fibroblasten und der Tumorzelllinie SCC 25

Im Vergleich zwischen Fibroblasten und SCC 25-Tumorzellen zeigte sich, dass Kollagen einen signifikant stärkeren Einfluss auf das dynamische Migrationsverhalten der Tumorzellen hatte als auf die Fibroblastenmigration (Abbildung 19). Nach 4 h konnte eine Tendenz zum ausgeprägteren Einfluss des Kollagens auf die Tumorzellen beobachtet werden (Kollagen<sup>20</sup>:  $p = 0,1591$ ; Kollagen<sup>40</sup>:  $p = 0,8601$ ; Kollagen<sup>60</sup>:  $p = 0,051$ ; Abbildung 19 A). Nach 8 h und 12 h relativierte sich das Bild (Abbildung 19 B und C), wobei der Einfluss auf die Migration der Tumorzellen mit Kollagen<sup>40</sup> nach 8 h signifikant erhöht war, im Vergleich zum Einfluss auf die Fibroblasten ( $p = 0,015$ ; Abbildung 19 B). Nach 24 h zeigte sich der Einfluss aller drei Kollagenkonzentrationen auf die Tumorzellmigration signifikant stärker als der Einfluss auf die Fibroblastenmigration (Kollagen<sup>20</sup>:  $p = 0,0017$ ; Kollagen<sup>40</sup>:  $p = 0,0002$ ; Kollagen<sup>60</sup>:  $p = 0,0001$ ; Abbildung 19 D). Da sich die Größe der unbesiedelten Spaltfläche zu Versuchsbeginn (0 h), sowie bei Versuchsende (36 h) im Gruppenvergleich zwischen Fibroblasten und Tumorzellen kaum unterschied, wurde auf die Darstellung der beiden Zeitpunkte aus Gründen der besseren Übersicht verzichtet. Gleiches gilt für die Darstellung der 10 %-FCS- sowie der Natriumcitratkontrolle, die sich nicht statistisch signifikant von der 1 %-FCS-Kontrolle unterschieden.

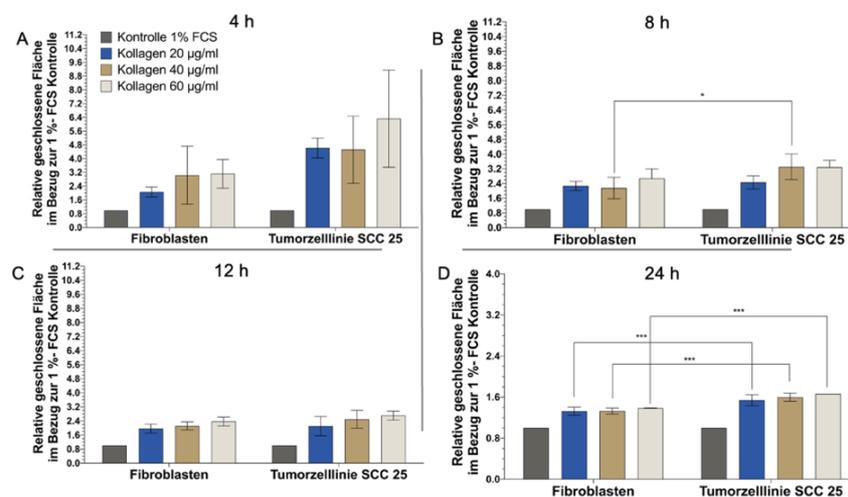


Abbildung 19: Vergleich des Migrationsverhaltens von Fibroblasten und SCC 25-Tumorzellen zu verschiedenen Zeitpunkten: (A) 4 h, (B) 8 h, (C) 12 h, (D) 24 h. Die Legende im Bereich A gilt für die gesamte Abbildung. Aufgetragen sind die Mittelwerte der drei Durchgänge, die die relative geschlossene Fläche im Verhältnis zum Startzeitpunkt 0 h und zur 1 %-FCS Kontrolle der jeweiligen Zellart pro Messzeitpunkt inklusive negativer und positiver Standardabweichungen. Pro Zellart wurden die Daten der 1 %-FCS-Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt als Bezugswert auf 1 gesetzt. Gegenübergestellt wurden die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kollagen I behandelten Gruppen der jeweiligen Zellart. Die Daten wurden mittels 2-Way-Anova statistisch ausgewertet, wobei die unterschiedliche Behandlung mit den Kollagen I-Stimulanzmedien pro Messzeitpunkt im Verhältnis zur 1 %-FCS-Kontrolle zwischen Fibroblasten und Tumorzellen verglichen wurden. Signifikante Unterschiede wurden mit \* markiert wobei \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

## 5 Diskussion

Hauptziele dieser Arbeit waren die Methodenetablierung zur Isolierung und Quantifizierung von Kollagen I aus humanen dermalen Gewebeproben, sowie die anschließende Untersuchung des Einflusses von Kollagen I auf die Stoffwechselaktivität, sowie das Proliferations- und Migrationsverhalten von a) humanen gingivalen Fibroblasten und b) der humanen Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC 25.

Das extrahierte Kollagen I konnte im DC Protein Assay quantifiziert werden. Anschließend konnte die, mit RIPA-Puffer und Laemli-Puffer ohne Mercapthoethanol versetzte Probe, die bei 96 °C aufgekocht wurde, im Western Blot prozessiert werden.

Die nachfolgenden Zellversuche ergaben, dass Kollagen I in den untersuchten Konzentrationen keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Stoffwechselaktivität von gingivalen Fibroblasten und SCC 25-Tumorzellen nahm. Im Gegensatz dazu konnte Kollagen I in den untersuchten Konzentrationen von 20 bis 60 µg/ml im Vergleich zu den Kontrollgruppen beide Zellarten zu einer verstärkten Proliferation anregen. Zudem konnte auch das Migrationsverhalten beider Zellarten durch Inkubation mit Kollagen I in Konzentrationen von 20 bis 60 µg/ml im Vergleich zu den Kontrollgruppen statistisch signifikant gesteigert werden. Beim Vergleich des Migrationsverhaltens zwischen Fibroblasten und SCC 25-Tumorzellen konnte ein statistisch signifikant ( $p \leq 0,001$ ) größerer Einfluss des Kollagens auf die Migration der Tumorzellen gegenüber dem Einfluss auf Fibroblasten festgestellt werden.

### 5.1 Diskussion der Methodik

#### Kollagenextraktion aus humanen dermalen Gewebeproben

Bei den verwendeten Hautproben handelte es sich um Überschussmaterial aus chirurgischen Eingriffen. Die Altersspanne der den Proben zugrundeliegenden Patienten, betrug 25 bis 79 Jahre. Der Durchschnittsalter der Patienten, von denen Proben zur Kollagenisolierung verwendet wurden, betrug 58 Jahre. In der Studie, welche das Verfahren zur Kollagenextraktion erstbeschreibt, wurden hingegen nur Hautproben von 38-jährigen Menschen verwendet. Bei chronologisch gealterter Haut ist eine verringerte Synthese von Kollagen I und III charakteristisch [78]. Dies könnte eine Erklärung für die Diskrepanz im Gesamtgewicht der verwendeten Hautproben und den unterschiedlichen Kollagen I Mengen der fünf Versuchsdurchläufe sein.

### Western Blot

Die Analyse der Kollagenproben im Western Blot stellte sich insgesamt als schwierig heraus. Kollagen ist ein großes und komplexes Molekül. Das intakte, disulfidgebundene Kollagen I hat ein Molekulargewicht von etwa 250 kDa [79]. Die in der Literatur beobachteten Molekulargewichtsbereiche der Alpha 1 und Alpha 2 Ketten von Prokollagen liegen bei 140-200 kDa. Die Ketten des reifen Kollagen I haben ein Molekulargewicht von 100-140 kDa [79-81]. Bei der Verarbeitung können auch Kollagen I-Spaltprodukte entstehen, die zwischen 20 und 80 kDa liegen [82, 83]. Für die Untersuchungen wurden die Beobachtungen von Iannarone et al. zugrunde gelegt [84]. In ihrer Arbeit wurde muskuläres Kollagen I untersucht, weshalb für die in dieser Studie verwendeten, humanen Kollagen I Proben zunächst noch die optimalen Versuchsbedingungen etabliert werden mussten.

Um ein reproduzierbares Ergebnis im Western Blot zu erzielen, mussten sowohl die detektierbare Menge an Protein als auch die Behandlung der Proben optimiert werden. Hierzu wurden zum einen unterschiedliche Gesamtproteinmengen appliziert, sowie zum anderen die Proben im Vorfeld unterschiedlich behandelt. Hierbei wurden die Proben entweder mit a) RIPA-Puffer, Laemmli-Puffer und zusätzlich Mercapthoethanol (L + M) versetzt oder b) nur mit RIPA-Puffer und Laemmli-Puffer (L - M). Außerdem wurde ein Teil der Proben vor der Gelüberführung bei 96 °C aufgeköcht. Bei dem verwendeten Gel handelte es sich um ein 4-20 % Mini-PROTEAN TGX Stain-free Gel mit 10 Kammern. Letztlich stellte sich heraus, dass die erhitzten Proben mit Laemmli-Puffer aber ohne Mercaptoethanol, die validesten Ergebnisse im Western Blot erzielten.

### Zellversuche

Zur Beurteilung der Stoffwechselaktivität von Zellen ist alamarBlue™ ein etabliertes und in zahlreichen Studien eingesetztes Verfahren, wobei mehrere Studien einen kombinatorischen Ansatz unter Verwendung unterschiedlicher Assays für die Untersuchung der Stoffwechselaktivität empfehlen und dabei die aussagekräftigsten und repräsentativsten *in vitro*-Ergebnisse erzielten [85-88]. Dieser kombinierte Ansatz hätte womöglich auch in der vorliegenden Arbeit zur Verbesserung der Ergebnisqualität beitragen können.

Um die Genauigkeit des Migrationsassays zu überprüfen, wäre in Folgestudien neben dem Migrationsassay die begleitende Durchführung eines Genexpressionsassays oder eines Western Blots denkbar, wodurch mehr Informationen über den eigentlichen Migrationsprozess und die zugrundeliegenden zellulären Prozesse gesammelt werden könnten.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse der Zellversuche

### 5.2.1 Stoffwechselaktivität

Es schien, dass Kollagen unabhängig von der Konzentration weder nach 24 h noch nach 48 h einen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität von gingivalen Fibroblasten nahm. Zu beiden Zeitpunkten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur 1 %-FCS-Kontrollgruppe. Möglicherweise beeinflusste die Kombination aus Natriumcitrat und Kollagen I in höherer Konzentration die Stoffwechselaktivität der Zellen. Ob die Kombination einen positiven oder negativen Effekt auf die Stoffwechselaktivität der Zellen ausübte, konnte nicht abschließend festgestellt werden.

Die Stoffwechselaktivität der Tumorzelllinie wich von der, der Fibroblasten ab. Die Kollagen<sup>60</sup>-Gruppe sowie die Natriumcitratkontrolle zeigten im Vergleich zur 1 %-FCS Kontrolle weder nach 24 h noch 48 h Unterschiede in der Stoffwechselaktivität. Während nach 24 h nur eine leichte Reduktion der Stoffwechselaktivität in den Kollagen<sup>20</sup>- und Kollagen<sup>40</sup>-Gruppen gegenüber der 1 %-FCS-Kontrollgruppe beobachtet werden konnte, war die Reduktion der Stoffwechselaktivität nach 48 h signifikant reduziert ( $p \leq 0,001$ ).

Zusammengefasst wurde die Stoffwechselaktivität der Tumorzelllinie SCC 25 in den Gruppen mit niedriger Kollagenkonzentration (20 und 40  $\mu\text{g}$ ) negativ beeinflusst. Literaturdaten zum Vergleich gibt es bisher keine.

### 5.2.2 Proliferationsverhalten

Das Proliferationsverhalten zeigte sich 36 h Inkubationszeit sowohl bei den Fibroblasten als auch den Tumorzellen durch Kollagen signifikant gesteigert. Während dies bei den Fibroblasten nur in der Kollagen<sup>20</sup>-Gruppe imponierte ( $p = 0,0238$ ), war die Proliferation der Tumorzellen bei allen drei Kollagenkonzentrationen signifikant erhöht (Fibroblasten: Kollagen<sup>20</sup>:  $p = 0,0238$ ; Kollagen<sup>40</sup>:  $p = 0,5881$ ; Kollagen<sup>60</sup>:  $p = 0,1369$ ; Tumorzellen: Kollagen<sup>20</sup>:  $p < 0,0001$ ; Kollagen<sup>40</sup>:  $p < 0,0001$ ; Kollagen<sup>60</sup>:  $p < 0,0001$ ). Dass Kollagen zu einer Steigerung der Zellproliferation führt, zeigte bereits eine *in vitro* Studie von Atkinson et al. [89]. Hierbei wurde Kollagen I, IV und VI aus der humanen Plazenta isoliert und anschließend zur Stimulation von Mäuse-Fibroblasten (NIH-3T3), humanen Fibrosarkomzellen (HT 1080) und humanen Fibroblasten eingesetzt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, konnten Atkinson et al. einen signifikanten Anstieg der Zellzahl aller Zellarten, allerdings nur bei den mit Kollagen VI stimulierten Gruppen feststellen. Die Zugabe von Kollagen I und IV zeigte hingegen keinen Anstieg der Zellzahl. Die unterschiedlichen Ergebnisse zur vorliegenden Arbeit könnten auf die abweichende Kollagenisolationsmethodik, sowie den unterschiedlichen Ursprung des isolierten Kollagens zurückzuführen sein.

Vergleicht man die prozentuale Zellzahlzunahme der Fibroblasten und Tumorzellen, die mit Kollagen I stimuliert wurden, untereinander, so kann ein leicht erhöhter, allerdings nicht signifikanter gesteigerter Einfluss des Kollagens auf die Proliferation der Tumorzellen beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl Fibroblasten als auch SCC 25-Tumorzellen, im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen, durch Kollagenzusatz signifikant stärker proliferierten.

### 5.2.3 Migrationsverhalten

Die Migration der Fibroblasten und der SCC 25-Tumorzellen wurde durch Kollagen I in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollgruppen statistisch signifikant gesteigert. Während sich zu Beginn ein tendenziell stärkerer Einfluss des Kollagens auf die Tumorzellen abzeichnete, zeigte sich nach 36 h ein nun signifikant höherer Einfluss auf die kollagenstimulierten Tumorzellen im Vergleich zu den Fibroblasten (Kollagen<sup>20</sup>  $p = 0,0017$ ; Kollagen<sup>40</sup>  $p = 0,0002$ ; Kollagen<sup>60</sup>  $p = 0,0001$ ).

Der Einfluss von Kollagen I auf das Migrationsverhalten von Tumorzellen wurde auch in anderen Studien beschrieben. So untersuchte die Arbeitsgruppe um Ji et al. die regulatorische MikroRNA Signatur let-7 bei hepatozellulären Karzinomen (HCC) [90]. Kollagen I (COL1A1) wurde als potenzielles Ziel von let-7 untersucht. MikroRNA's sind körpereigene, nicht-codierende RNAs, die die zelluläre Genexpression regulieren und funktionell mit der Tumorentstehung verbunden sind. Let-7 fungiert als Tumorsuppressor. Untersuchungen zeigten, dass die Herunterregulation von let-7 bei Bronchialkarzinomen, Melanomen und Plattenepithelkarzinomen der Schleimhaut im Kopf-Hals-Bereich den Tumorprogress begünstigen. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von let-7 das Wachstum von Tumorzellen hemmen kann [91, 92]. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Rolle von let-7 bei der Progression des HCC. Die hemmende Wirkung von let-7 auf die Migration von HCC-Zellen konnte in einem kammerbasierten Zellmigrationstest und einem *in vitro*-Modell zur Wundheilung, ähnlich dem in dieser Studie durchgeführten Scratch Assay, festgestellt werden. Anschließend wurde überprüft, ob Kollagene mögliche Ziele von let-7 sind, wozu man die Gesamtmenge löslichen Kollagens im extrahierten Medium der verwendeten Zellen bestimmte. Hierbei stellte man fest, dass die Produktion von löslichen Kollagenen, besonders von Kollagen I (COL1A2) signifikant verringert war. Zusätzlich konnte man in einem weiteren Versuch nachweisen, dass der, die Zellmigration hemmende Effekt von let-7, durch die Zugabe von Kollagen I vollständig aufgehoben werden konnte [90]. Obwohl der

Mechanismus hinter der Hemmung des Migrationsverhaltens bislang unklar ist, so unterstreichen die Ergebnisse doch den Einfluss von Kollagen I auf die Zellmigration.

Orale Malignome zählen weltweit zu den häufigsten soliden Tumorentitäten, nehmen Platz 8 in der Häufigkeitsreihenfolge ein und sind trotz medizinischer Fortschritte weiterhin mit einer hohen Mortalität verbunden [62]. Die 5-Jahres Überlebensrate beträgt circa 50 % und blieb, trotz stetigen Fortschritts und Weiterentwicklung der Therapieverfahren, über die letzten Jahre konstant [70]. Die Invasion, der Progress, die Metastasierungsrate, das Therapieansprechen der Tumore und somit die Morbiditäts- und Mortalitätsrate der Patienten sind sehr individuell [47]. Hier stellt sich die Frage nach der Ursache der Individualität dieser Tumorerkrankungen.

Ein Erklärungsansatz vermutet die Gründe der Verhaltensdiversität in der Struktur und den Vorgängen innerhalb der TME bzw. EZM. Die Bandbreite an in der Literatur beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Kollagen I, weiteren Bestandteilen der TME, sowie benignen und malignen Zellen in der Tumorumgebung ist groß und wird stetig weiter erforscht. Zusammenfassen lässt sich, dass Kollagen im Umfeld von Tumoren stärker linearisiert und quervernetzt, gegebenenfalls sogar strukturell verändert ist und tumorspezifische Signaturen trägt [48, 60, 61]. Aktuell zu klären bleibt, welche strukturellen Eigenschaften Kollagen in der TME von Tumoren im Vergleich zu Kollagen innerhalb unveränderter Gewebe aufweist. Wie bereits beschrieben besteht die Mundhöhle aus verschiedenen Hart- und Weichgeweben, bei denen Kollagene einen Hauptbestandteil bilden. In diesem Zusammenhang könnte ein weiterer möglicher Einflussfaktor die unterschiedliche strukturelle Gewebzusammensetzung der verschiedenen Schleimhautregionen innerhalb der Mundhöhle sein, welche sich regionsabhängig insbesondere hinsichtlich Quantität und der räumlichen Ausrichtung von Kollagen unterscheidet. Inwieweit die unterschiedliche Quantität und Qualität an Kollagen insbesondere zwischen mastikatorischer und auskleidender Schleimhaut eine Rolle bei der Entstehung, der Invasion und dem Tumorprogress eine Rolle spielt, bleibt weiterhin unklar. Die Prädilektionsstellen an Zungenrand, Mundboden und Alveolarfortsätzen sind vor allem von auskleidender Schleimhaut mit eher wenig organisierten Kollagenfasern bekleidet. Eine möglicher Erklärungsansatz ist, dass die lockere Kollagenanordnung die Ausbildung des primären Tumors und der EZM günstig beeinflussen, da das Größenwachstum und die Invasion im weniger dichten Gewebe besser voranschreiten können. Möglicherweise könnte somit im weiteren Tumorprogress das weniger dichte, unorganisierte Kollagen, vom Tumor beeinflusst, seine Struktur und räumliche Anordnung ändern, um den Progress und die Metastasierung weiter zu begünstigen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen ein deutlich verstärktes Migrationsverhalten der Zellen, die mit Kollagen I inkubiert wurden.

Kollagen I könnte als eine Art Leitstruktur fungieren, entlang derer Zellen verstärkt migrieren. In den vorliegenden Untersuchungen konnte zudem festgestellt werden, dass innerhalb der Kollagengruppen die SCC 25-Tumorzellen im Vergleich zu den Fibroblasten signifikant stärker migrierten. Dies spricht dafür, dass das Migrationsverhalten der Tumorzellen stärker von Kollagen I beeinflusst wurde und möglicherweise eine Erklärung für den Progress von Tumoren im kollagenreichen Gewebe sein. In der derberen mastikatorischen Schleimhaut hingegen, ist das Kollagen klarer organisiert und quantitativ mehr vorhanden. Möglicherweise hat dies negative Auswirkungen auf die initiale Tumorentstehung, da der Tumor mehr Kraft benötigt, um das organisierte Bindegewebe zu durchbrechen. Andererseits ist die mastikatorische Schleimhaut mechanisch deutlich stärker belastet und durch begleitende epitheliale Mikrotraumata, häufigeren Reparaturprozessen und Zellproliferation mit einem konsekutiv erhöhten Entartungsrisiko ausgesetzt. Diese Vermutung nach unterschiedlichen Prävalenzen je nach Lokalisation kann durch fehlende Literaturdaten aktuell noch nicht bestätigt werden.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Kollagen I auf die Stoffwechselaktivität, sowie das Proliferations- und Migrationsverhalten von humanen gingivalen Fibroblasten und der humanen SCC 25 Plattenepithelkarzinomzelllinie zu untersuchen.

Zunächst konnte die Methode zur Kollagenisolierung aus humanen Gewebeproben etabliert werden. Die gewonnenen Proben wurden anschließend hinsichtlich ihrer Gesamtproteinmenge quantifiziert. Nach mehrschrittiger Prozessierung konnte Kollagen I im Western Blot valide und reproduzierbar detektiert werden.

Die im Anschluss durchgeführten Zellversuche beinhalteten die Inkubation von humanen gingivalen Fibroblasten und Tumorzellen der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC 25 mit drei unterschiedlichen Kollagen I-Konzentrationen (20, 40 und 60 µg/ml). Als Kontrollgruppen diente Kulturmedium versetzt mit Natriumcitrat, 10 %-FCS und reduziertem Anteil von 1 %-FCS. Natriumcitrat diente als Kontrollgruppe, um auszuschließen, dass die Zellen durch Natriumcitrat als Lösungsmittel selbst beeinflusst werden. 10 %-FCS entspricht der Menge an Wachstumsfaktoren, die Zellen normalerweise in Kultur zugegeben wird. Um den Effekt von Kollagen I deutlich herauszustellen, wurden die Kollagen I-Stimulanzmedien mit einem verringertem 1 %-FCS-Medium inkubiert. Um aber auszuschließen, dass der verringerte Wachstumsfaktoranteil einen negativen Einfluss auf die Zellen ausübt, wurde 1 %-FCS-Kontrollmedium als Kontrollgruppe verwendet.

Die Ergebnisse aus den Zellversuchen lassen sich insgesamt wie folgt zusammenfassen. Kollagen I nahm konzentrationsunabhängig weder nach 24 h noch nach 48 h einen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität von gingivalen Fibroblasten. Die Stoffwechselaktivität der SCC 25-Tumorzellen wurde in den beiden niedrigeren Konzentrationen (20 und 40 µg/ml) negativ durch Kollagen I beeinflusst. Das Proliferationsverhalten wurde bei beiden Zellarten von Kollagen I positiv beeinflusst. Im Vergleich von Fibroblasten und Tumorzellen konnte ein Trend zur stärkeren Stimulation der Tumorzellproliferation im Vergleich zu den Fibroblasten beobachtet werden. Das Migrationsverhalten der Fibroblasten und der SCC 25-Tumorzellen wurde durch die unterschiedlichen Kollagen I Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollgruppen statistisch signifikant gesteigert. Im Vergleich der unterschiedlichen Gruppen zwischen den beiden Zellarten in Relation zum Startzeitpunkt 0 h und im Verhältnis zur 1 %-FCS-Kontrolle, konnte nach 36 h ein statistisch signifikant stärkerer Einfluss des Kollagens auf das Migrationsverhalten der Tumorzellen beobachtet werden. Die fehlende bis negative Beeinflussung der Stoffwechselaktivität durch Kollagen I deutet in Verbindung mit der

signifikanten Zunahme der Zellproliferation und Migration darauf hin, dass Kollagen I die Zellen besonders stark zur Migration anregt. Dieses Phänomen zeigte sich bei den Tumorzellen signifikant deutlicher als bei den Fibroblasten. Die Ergebnisse dieser Studie deuten also darauf hin, dass Kollagen I aus unverändertem Gewebe die Migration humaner Fibroblasten und SCC 25-Tumorzellen signifikant steigert.

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf die Untersuchung der Einflussnahme von Kollagen I aus unverändertem Gewebe auf humane Schleimhautfibroblasten und SCC 25-Tumorzellen, sodass in Folgestudien eine Durchführung mit tumorassoziiertem Kollagen I einen interessanten Ansatz darstellt, um der Frage einer veränderten Wirkung in Abhängigkeit vom Kollagenursprung nachzugehen. Ob letztlich die Anordnung, die Quantität, die strukturellen Kollageneigenschaften oder möglicherweise die Kombination aus mehreren, Kollagen-assoziierten Faktoren eine Rolle spielen, ist bisher unklar und sollte weiterführend untersucht werden. Insbesondere die strukturellen Eigenschaften von „gesundem“ und tumorassoziiertem Kollagen gilt es vertiefend zu erforschen. Problematisch gestaltet sich hierbei die tumorassoziierte Kollagenisolierung. Nach der Resektion werden die Tumorpräparate mitsamt dem miterfassten Umgebungsgewebe direkt der histopathologischen Aufarbeitung und Untersuchung zugeführt. Die Ergebnisse geben Aufschluss über den Operationserfolg und sind damit entscheidend für das weitere therapeutische Prozedere [69]. Da die Beurteilbarkeit des Primärtumorpräparates nicht negativ beeinflusst werden darf, ist die Gewebeentnahme zu Forschungszwecken nur sehr eingeschränkt möglich. In diesem Zusammenhang stellt die artifizielle Herstellung von Tumoren einen hochinteressanten Ansatz zukünftiger Forschungsansätze dar. Durch innovative Biodrucktechniken besteht bereits jetzt die Möglichkeit zur Erstellung kompartimentierter Tumoroide, um gezielt spezifische Zell-Zell- oder Zell-Matrixinteraktionen zu untersuchen [93]. Weiter wäre hierdurch das „Ernten“ von tumorassoziiertem Kollagen denkbar, welches anschließend elektronenmikroskopisch auf seine strukturellen, sowie funktionellen Eigenschaften hin untersucht werden kann. So könnte sein Einfluss auf das Proliferations- und Migrationsverhalten, sowie die Stoffwechselaktivität von Fibroblasten und Tumorzellen, wie sie in dieser Studie mittels Kollagen I aus unverändertem Gewebe beschrieben wurde, erforscht werden. Der potenzielle Informationsgewinn könnte entscheidend zu einem tieferen Verständnis zum Stellenwert der Tumormikroumgebung beitragen und womöglich die Grundlage für zukünftige prognostische Vorhersagen und therapeutische Ansätze darstellen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch, *Histologie*. Vol. 2. Auflage. 2006: Thieme.
2. al., R.e., *Duale Reihe Biochemie*. Vol. 2. Auflage. 2008: Thieme.
3. Walker, C., E. Mojares, and A. del Río Hernández, *Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(10).
4. Xu, S., et al., *The role of collagen in cancer: from bench to bedside*. Journal of Translational Medicine, 2019. **17**(1).
5. Lu, P., et al., *Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011. **3**(12): p. a005058-a005058.
6. Le, Q.-T., et al., *Validation of Lysyl Oxidase As a Prognostic Marker for Metastasis and Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Radiation Therapy Oncology Group Trial 90-03*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(26): p. 4281-4286.
7. Gupta, A., et al., *Deciphering the "Collagen code" in tumor progression*. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 2021. **17**(1).
8. Barcus, C.E., et al., *Elevated collagen-I augments tumor progressive signals, intravasation and metastasis of prolactin-induced estrogen receptor alpha positive mammary tumor cells*. Breast Cancer Research, 2017. **19**(1).
9. Arneth, B., *Tumor Microenvironment*. Medicina, 2020. **56**(1): p. 15.
10. Korneev, K.V., et al., *TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis*. Cytokine, 2017. **89**: p. 127-135.
11. McAndrews, K.M., et al., *Mesenchymal Stem Cells Induce Directional Migration of Invasive Breast Cancer Cells through TGF- $\beta$* . Scientific Reports, 2015. **5**(1).
12. Spill, F., et al., *Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis*. Current Opinion in Biotechnology, 2016. **40**: p. 41-48.
13. Del Prete, A., et al., *Leukocyte trafficking in tumor microenvironment*. Current Opinion in Pharmacology, 2017. **35**: p. 40-47.
14. Madsen, D.H., et al., *Tumor-Associated Macrophages Derived from Circulating Inflammatory Monocytes Degrade Collagen through Cellular Uptake*. Cell Reports, 2017. **21**(13): p. 3662-3671.
15. Afik, R., et al., *Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix*. J Exp Med, 2016. **213**(11): p. 2315-2331.
16. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
17. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, Inflammation, and Cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-899.
18. Anderson, B.O., et al., *Optimisation of breast cancer management in low-resource and middle-resource countries: executive summary of the Breast Health Global Initiative consensus, 2010*. The Lancet Oncology, 2011. **12**(4): p. 387-398.
19. Feig, C., et al., *Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(50): p. 20212-20217.
20. Geiger, B. and K.M. Yamada, *Molecular Architecture and Function of Matrix Adhesions*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011. **3**(5): p. a005033-a005033.
21. Fang, M., et al., *Collagen as a double-edged sword in tumor progression*. Tumor Biology, 2013. **35**(4): p. 2871-2882.
22. Provenzano, P.P., et al., *Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion*. BMC Medicine, 2006. **4**(1).
23. Malik, R., P.I. Leikes, and E. Cukierman, *Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer*. Trends in Biotechnology, 2015. **33**(4): p. 230-236.

24. Li, H.-X., et al., *Expression of  $\alpha v\beta 6$  integrin and collagen fibre in oral squamous cell carcinoma: association with clinical outcomes and prognostic implications*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2013. **42**(7): p. 547-556.
25. Conklin, M.W., et al., *Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma*. The American Journal of Pathology, 2011. **178**(3): p. 1221-1232.
26. Ohno, S., et al., *Role of stromal collagen in immunomodulation and prognosis of advanced gastric carcinoma*. International Journal of Cancer, 2002. **97**(6): p. 770-774.
27. Esbona, K., et al., *The Presence of Cyclooxygenase 2, Tumor-Associated Macrophages, and Collagen Alignment as Prognostic Markers for Invasive Breast Carcinoma Patients*. The American Journal of Pathology, 2018. **188**(3): p. 559-573.
28. Drifka, C.R., et al., *Highly aligned stromal collagen is a negative prognostic factor following pancreatic ductal adenocarcinoma resection*. Oncotarget, 2016. **7**(46): p. 76197-76213.
29. Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann, *The tumor microenvironment at a glance*. Journal of Cell Science, 2012. **125**(23): p. 5591-5596.
30. Hanahan, D. and Lisa M. Coussens, *Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 309-322.
31. LeBleu, V.S., *Imaging the Tumor Microenvironment*. The Cancer Journal, 2015. **21**(3): p. 174-178.
32. Hynes, R.O., *The extracellular matrix: not just pretty fibrils*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1216-9.
33. Hynes, R.O. and A. Naba, *Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(1): p. a004903.
34. Oskarsson, T., *Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis*. Breast, 2013. **22 Suppl 2**: p. S66-72.
35. Cretu, A. and P.C. Brooks, *Impact of the non-cellular tumor microenvironment on metastasis: potential therapeutic and imaging opportunities*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 391-402.
36. Maeshima, Y., et al., *Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21340-8.
37. Kamphaus, G.D., et al., *Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth*. J Biol Chem, 2000. **275**(2): p. 1209-15.
38. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52-67.
39. Mason, S.D. and J.A. Joyce, *Proteolytic networks in cancer*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(4): p. 228-37.
40. Paszek, M.J., et al., *Tensional homeostasis and the malignant phenotype*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 241-254.
41. Levental, K.R., et al., *Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling*. Cell, 2009. **139**(5): p. 891-906.
42. Karagiannis, G.S., et al., *Cancer-Associated Fibroblasts Drive the Progression of Metastasis through both Paracrine and Mechanical Pressure on Cancer Tissue*. Molecular Cancer Research, 2012. **10**(11): p. 1403-1418.
43. Discher, D.E., et al., *Matrix Mechanosensing: From Scaling Concepts in 'Omics Data to Mechanisms in the Nucleus, Regeneration, and Cancer*. Annual Review of Biophysics, 2017. **46**(1): p. 295-315.
44. Yamauchi, M., et al., *The fibrotic tumor stroma*. Journal of Clinical Investigation, 2018. **128**(1): p. 16-25.
45. Özdemir, Berna C., et al., *Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival*. Cancer Cell, 2014. **25**(6): p. 719-734.

46. Arnold, S.A., et al., *Lack of host SPARC enhances vascular function and tumor spread in an orthotopic murine model of pancreatic carcinoma*. Disease Models & Mechanisms, 2010. **3**(1-2): p. 57-72.
47. Bussard, K.M., et al., *Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment*. Breast Cancer Research, 2016. **18**(1).
48. Kenny, T.C., et al., *Patient-derived Interstitial Fluids and Predisposition to Aggressive Sporadic Breast Cancer through Collagen Remodeling and Inactivation of p53*. Clinical Cancer Research, 2017. **23**(18): p. 5446-5459.
49. Álvarez-García, V., et al., *Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity*. Seminars in Cancer Biology, 2019. **59**: p. 66-79.
50. Jolly, L.A., et al., *Fibroblast-Mediated Collagen Remodeling Within the Tumor Microenvironment Facilitates Progression of Thyroid Cancers Driven by BrafV600E and Pten Loss*. Cancer Research, 2016. **76**(7): p. 1804-1813.
51. Laklai, H., et al., *Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matrix fibrosis and tumor progression*. Nature Medicine, 2016. **22**(5): p. 497-505.
52. Hayashido, Y., et al., *Overexpression of integrin  $\alpha$ v facilitates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via MEK/ERK signaling pathway that is activated by interaction of integrin  $\alpha$  $\beta$ 8 with type I collagen*. International Journal of Oncology, 2014. **45**(5): p. 1875-1882.
53. Jenkins, M.H., et al., *The BRAFV600E inhibitor, PLX4032, increases type I collagen synthesis in melanoma cells*. Matrix Biology, 2015. **48**: p. 66-77.
54. Clarke, Cassie J., et al., *The Initiator Methionine tRNA Drives Secretion of Type II Collagen from Stromal Fibroblasts to Promote Tumor Growth and Angiogenesis*. Current Biology, 2016. **26**(6): p. 755-765.
55. Choi, S.K., et al., *Promotion of met-tRNA<sup>i</sup>Met binding to ribosomes by yIF2, a bacterial IF2 homolog in yeast*. Science, 1998. **280**(5370): p. 1757-60.
56. Shen, Y., et al., *Fibrillar Type I Collagen Matrices Enhance Metastasis/Invasion of Ovarian Epithelial Cancer Via  $\beta$ 1 Integrin and PTEN Signals*. International Journal of Gynecologic Cancer, 2012. **22**(8): p. 1316-1324.
57. Blockhuys, S., et al., *Radiation-induced myosin IIA expression stimulates collagen type I matrix reorganization*. Radiotherapy and Oncology, 2013. **108**(1): p. 162-167.
58. Liu, S., G. Liao, and G. Li, *Regulatory effects of COL1A1 on apoptosis induced by radiation in cervical cancer cells*. Cancer Cell International, 2017. **17**(1).
59. Wei, S.C., et al., *Matrix stiffness drives epithelial–mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1–G3BP2 mechanotransduction pathway*. Nature Cell Biology, 2015. **17**(5): p. 678-688.
60. Provenzano, P.P., et al., *Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion*. BMC Med, 2006. **4**(1): p. 38.
61. Levental, K.R., et al., *Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling*. Cell, 2009. **139**(5): p. 891-906.
62. Lima, A.M., et al., *Delay in diagnosis of oral cancer: a systematic review*. Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal, 2021: p. e815-e824.
63. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018. **68**(6): p. 394-424.
64. Panarese, I., et al., *Oral and Oropharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route*. Expert Review of Anticancer Therapy, 2019. **19**(2): p. 105-119.
65. Kämmerer, P.W., et al., *Diagnostik potenziell maligner Mundschleimhautveränderungen in der Zahnarztpraxis*. wissen kompakt, 2017. **11**(3): p. 105-120.

66. Blatt, S., et al., *Diagnosing oral squamous cell carcinoma: How much imaging do we really need? A review of the current literature*. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 2016. **44**(5): p. 538-549.
67. Yakin, M., et al., *Human papillomavirus and oral and oropharyngeal carcinoma: the essentials*. Australian Dental Journal, 2019. **64**(1): p. 11-18.
68. Blahak, J., et al., *HPV, protein p16 and squamous cell carcinoma of the oral cavity*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2020. **164**(3): p. 292-299.
69. AWMF, *S3-Leitlinie Diagnostik-Therapie-Mundhöhlenkarzinom, Version 3.0 - März 2021*. 2021.
70. Marsh, D., et al., *Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients*. The Journal of Pathology, 2011. **223**(4): p. 470-481.
71. D'souza, Z., et al., *Collagen – structure, function and distribution in orodental tissues*. Journal of Global Oral Health, 2020. **2**: p. 134-139.
72. Ciano, J. and B.L. Beatty, *Regional Quantitative Histological Variations in Human Oral Mucosa*. The Anatomical Record, 2015. **298**(3): p. 562-578.
73. Kydd, W.L. and C.H. Daly, *The biologic and mechanical effects of stress on oral mucosa*. The Journal of Prosthetic Dentistry, 1982. **47**(3): p. 317-329.
74. Squier, C. and K. Brogden, *Human oral mucosa: development, structure and function*. 2010: John Wiley & Sons.
75. Fleisch, L. and J.C. Austin, *A histologic study of the response of masticatory and lining mucosa to mechanical loading in the vervet monkey*. The Journal of Prosthetic Dentistry, 1978. **39**(2): p. 211-216.
76. Kronka, M.C., et al., *Corrosion casts of young rabbit palatine mucosa angioarchitecture*. Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger, 2000. **182**(6): p. 529-531.
77. Pacak, C.A., J.M. Powers, and D.B. Cowan, *Ultraprapid Purification of Collagen Type I for Tissue Engineering Applications*. Tissue Engineering Part C: Methods, 2011. **17**(9): p. 879-885.
78. Varani, J., et al., *Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin*. The American Journal of Pathology, 2006. **168**(6): p. 1861-1868.
79. Blackstock, C.D., et al., *Insulin-like growth factor-1 increases synthesis of collagen type I via induction of the mRNA-binding protein LARP6 expression and binding to the 5' stem-loop of COL1a1 and COL1a2 mRNA*. J Biol Chem, 2014. **289**(11): p. 7264-74.
80. Fisher, P.W., et al., *Increased CCN2, substance P and tissue fibrosis are associated with sensorimotor declines in a rat model of repetitive overuse injury*. Journal of Cell Communication and Signaling, 2015. **9**(1): p. 37-54.
81. McDonald, J.A., et al., *A monoclonal antibody to the carboxyterminal domain of procollagen type I visualizes collagen-synthesizing fibroblasts. Detection of an altered fibroblast phenotype in lungs of patients with pulmonary fibrosis*. Journal of Clinical Investigation, 1986. **78**(5): p. 1237-1244.
82. Kadler, K.E., *Fell Muir Lecture: Collagen fibril formation in vitro and in vivo*. International Journal of Experimental Pathology, 2017. **98**(1): p. 4-16.
83. Frara, N., et al., *Substance P increases CCN2 dependent on TGF-beta yet Collagen Type I via TGF-beta1 dependent and independent pathways in tenocytes*. Connective Tissue Research, 2017. **59**(1): p. 30-44.
84. Iannarone, V.J., et al., *The answer depends on the question: Optimal conditions for western blot characterization of muscle collagen type 1 depends on desired isoform*. Journal of Biological Methods, 2019. **6**(3).
85. Rampersad, S.N., *Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays*. Sensors, 2012. **12**(9): p. 12347-12360.
86. Longhin, E.M., et al., *The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials*. Frontiers in Toxicology, 2022. **4**.

87. Al-Shudiefat, A.A.-R.S., et al., *The effects of some natural products compared to synthetic products on the metabolic activity, proliferation, viability, migration, and wound healing in sheep tenocytes*. Saudi Journal of Biological Sciences, 2022. **29**(9).
88. Kundik, A., et al., *Quantifying metabolic activity of Ascaris suum L3 using resazurin reduction*. Parasites & Vectors, 2023. **16**(1).
89. Atkinson, J.C., et al., *Collagen VI Regulates Normal and Transformed Mesenchymal Cell Proliferation in Vitro*. Experimental Cell Research, 1996. **228**(2): p. 283-291.
90. Ji, J., et al., *Let-7g targets collagen type I  $\alpha$ 2 and inhibits cell migration in hepatocellular carcinoma*. Journal of Hepatology, 2010. **52**(5): p. 690-697.
91. Chang, S.S., et al., *MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma*. International Journal of Cancer, 2008. **123**(12): p. 2791-2797.
92. Kumar, M.S., et al., *Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis*. Nature Genetics, 2007. **39**(5): p. 673-677.
93. Mazzaglia, C., et al., *Deployable extrusion bioprinting of compartmental tumoroids with cancer associated fibroblasts for immune cell interactions*. Biofabrication, 2023. **15**(2).

## 8 Anhang

	Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml			Kontrolle Natriumcitrat			Kontrolle 1% FCS		
<b>24 h</b>	0,255	0,637	0,688	0,952	0,832	1,047	0,987	0,997	1,056	0,989	0,97	1,004	1	1	1
<b>48 h</b>	0,81	1,148	0,692	3,435	1,72	0,996	3,419	1,856	0,979	3,089	1,433	0,995	1	1	1

Tabelle 10: Datentabelle Auswertung Stoffwechselaktivität Fibroblasten

Vergleich der Spalten innerhalb jeder Zelle			
Anzahl der Familien	2		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	4		
Alpha	0,05		
<b>Bonferroni-Test für multiple Vergleiche</b>	<b>Mittlere Abweichung</b>	<b>95,00% Konfidenzintervall der Differenz</b>	<b>Angepasster p-Wert</b>
<b>24 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	0,4733	-1,020 - 1,967	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	0,05633	-1,437 - 1,550	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,01333	-1,507 - 1,480	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0,01233	-1,481 - 1,506	>0,9999
<b>48 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	0,1167	-1,377 - 1,610	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-1,05	-2,544 - 0,4431	0,2716
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-1,085	-2,578 - 0,4087	0,2402
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	-0,839	-2,332 - 0,6544	0,5552

Tabelle 11: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Stoffwechselaktivität Fibroblasten

	Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml			Kontrolle Natriumcitrat			Kontrolle 1% FCS		
<b>24 h</b>	0,386	0,717	0,295	0,113	0,087	0,111	0,782	0,813	0,886	0,861	0,978	0,936	1	1	1
<b>48 h</b>	0,487	0,654	0,273	0,558	0,652	0,466	0,804	0,775	0,835	0,963	1,089	0,98	1	1	1

Tabelle 12: Datentabelle Auswertung Stoffwechselaktivität SCC 25-Tumorzellen

Vergleich der Spalten innerhalb jeder Zeile			
Anzahl der Familien	2		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	4		
Alpha	0,05		
<b>Bonferroni-Test für multiple Vergleiche</b>	<b>Mittlere Abweichung</b>	<b>95,00% Konfidenzintervall der Differenz</b>	<b>Angepasster p-Wert</b>
<b>24 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	0,534	0,3027 - 0,7653	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	0,8963	0,6650 - 1,128	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	0,173	-0,05835 - 0,4043	0,2139
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0,075	-0,1563 - 0,3063	>0,9999
<b>48 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	0,5287	0,2973 - 0,7600	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	0,4413	0,2100 - 0,6727	0,0002
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	0,1953	-0,03601 - 0,4267	0,1249
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	-0,01067	-0,2420 - 0,2207	>0,9999

Tabelle 13: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Stoffwechselaktivität SCC 25-Tumorzellen

	Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml			Kontrolle Natriumcitrat			Kontrolle 10% FCS			Kontrolle 1% FCS		
<b>0 h</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>4 h</b>	1,48	1,35	1,36	1,33	0,94	0,98	1,54	1,26	1,33	1,17	0,89	1,3	1,33	0,96	1,28	1,82	0,78	1,31
<b>8 h</b>	1,39	1,35	1,67	1,9	1,13	1,2	2,02	1,61	1,6	1,37	1,23	1,17	1,28	1,39	1,22	1,97	1,07	1,5
<b>12 h</b>	0,87	1,54	2,63	1,88	1,27	1,56	1,9	1,58	2,06	2	0,8	1,67	2,13	0,93	1,56	1,67	1,11	1,86
<b>24 h</b>	2,5	1,91	3,77	3,59	1,96	2,12	3,19	2,72	2,09	2,19	1,63	2,17	2,8	1,96	1,97	2,65	1,78	2,39
<b>36 h</b>	4,09	2,86	5,9	5	2,4	3,52	3,88	3,66	4,35	4,37	1,87	2,78	2,8	3,37	3,5	4,12	1,72	2,78

Tabelle 14: Datentabelle Auswertung Proliferationsverhalten Fibroblasten

Vergleich der Spalten innerhalb jeder Zeile			
Anzahl der Familien	6		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	5		
Alpha	0,05		
<b>Bonferroni-Test für multiple Vergleiche</b>	<b>Mittlere Abweichung</b>	<b>95,00% Konfidenzintervall der Differenz</b>	<b>Angepasster p-Wert</b>
<b>0 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	0	-1,281 - 1,281	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	0	-1,281 - 1,281	>0,9999

Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	0	-1,281 - 1,281	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0	-1,281 - 1,281	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0	-1,281 - 1,281	>0,9999
<b>4 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,09333	-1,374 - 1,187	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	0,22	-1,061 - 1,501	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,07333	-1,354 - 1,207	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0,1833	-1,097 - 1,464	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,1133	-1,167 - 1,394	>0,9999
<b>8 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	0,04333	-1,237 - 1,324	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	0,1033	-1,177 - 1,384	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,23	-1,511 - 1,051	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0,2567	-1,024 - 1,537	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,2167	-1,064 - 1,497	>0,9999
<b>12 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,1333	-1,414 - 1,147	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,02333	-1,304 - 1,257	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,3	-1,581 - 0,9808	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0,05667	-1,224 - 1,337	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,006667	-1,274 - 1,287	>0,9999
<b>24 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,4533	-1,734 - 0,8274	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,2833	-1,564 - 0,9974	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,3933	-1,674 - 0,8874	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0,2767	-1,004 - 1,557	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,03	-1,251 - 1,311	>0,9999
<b>36 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-1,41	-2,691 - -0,1292	0,0238
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,7667	-2,047 - 0,5141	0,5881
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-1,09	-2,371 - 0,1908	0,1369
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	-0,1333	-1,414 - 1,147	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	-0,35	-1,631 - 0,9308	>0,9999

Tabelle 15: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Proliferationsverhalten Fibroblasten

	Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml			Kontrolle Natriumcitrat			Kontrolle 10% FCS			Kontrolle 1% FCS		
<b>0 h</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>4 h</b>	1,43	1,08	1,35	1,33	1,95	1,54	1,28	1,18	1,4	1	1,43	1,45	0,93	1,17	1,34	1,14	1,9	1,74
<b>8 h</b>	2,21	1,54	1,73	1,78	1,84	2,01	2	1,53	1,78	1,11	1,25	1,87	1,5	1,53	1,1	1,79	1,4	1,87
<b>12 h</b>	2,5	1,25	2,42	2,39	2,42	2,73	2,44	1,53	2	1,33	1,38	1,5	1,93	1,53	1,1	1,79	1,65	2,04
<b>24 h</b>	3,36	2,2	2,96	3,39	2,74	3,04	3,67	2,23	3,11	1,39	3,63	2,67	2,29	2,23	1,62	2,14	2,85	2,3
<b>36 h</b>	5,5	3,67	4,84	4,72	3,63	5,23	5,44	4,88	3,73	2,89	2,44	2,54	2,86	2,29	2,34	2,93	2,8	2,04

Tabelle 16: Datentabelle Auswertung Proliferationsverhalten SCC 25-Tumorzellen

Vergleich der Spalten innerhalb jeder Zeile			
Anzahl der Familien	6		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	5		
Alpha	0,05		
<b>Bonferroni-Test für multiple Vergleiche</b>	<b>Mittlere Abweichung</b>	<b>95,00% Konfidenzintervall der Differenz</b>	<b>Angepasster p-Wert</b>
<b>0 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	0	-0,9546 - 0,9546	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	0	-0,9546 - 0,9546	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	0	-0,9546 - 0,9546	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0	-0,9546 - 0,9546	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0	-0,9546 - 0,9546	>0,9999
<b>4 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	0,3067	-0,6480 - 1,261	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,01333	-0,9680 - 0,9413	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	0,3067	-0,6480 - 1,261	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0,3	-0,6546 - 1,255	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,4467	-0,5080 - 1,401	>0,9999
<b>8 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,14	-1,095 - 0,8146	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,19	-1,145 - 0,7646	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,08333	-1,038 - 0,8713	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0,2767	-0,6780 - 1,231	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,31	-0,6446 - 1,265	>0,9999
<b>12 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,23	-1,185 - 0,7246	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,6867	-1,641 - 0,2680	0,3051
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,1633	-1,118 - 0,7913	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0,4233	-0,5313 - 1,378	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,3067	-0,6480 - 1,261	>0,9999

<b>24 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,41	-1,365 - 0,5446	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,6267	-1,581 - 0,3280	0,4334
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,5733	-1,528 - 0,3813	0,5822
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	-0,1333	-1,088 - 0,8213	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,3833	-0,5713 - 1,338	>0,9999
<b>36 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-2,08	-3,035 - -1,125	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-1,937	-2,891 - -0,9820	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-2,093	-3,048 - -1,139	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	-0,03333	-0,9880 - 0,9213	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,09333	-0,8613 - 1,048	>0,9999

Tabelle 17: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Proliferationsverhalten SCC 25-Tumorzellen

	Kontrolle 1% FCS			Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml		
<b>Fibroblasten</b>	1	1	1	0,92	0,89	1,1	1,26	0,75	0,79	1,33	1,06	0,04
<b>Tumorzelllinie SCC 25</b>	1	1	1	1,31	0,91	1,03	1,06	1,09	1,19	1,19	0,91	1,06

Tabelle 18: Datentabelle Proliferationsverhalten Vergleich 8 h

<b>Vergleich des Mittelwerts jeder Zelle mit dem Mittelwert der anderen Zellen in dieser Spalte</b>			
Anzahl der Familien	1		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	4		
Alpha	0,05		
<b>Bonferroni-Test für multiple Vergleiche</b>	<b>Mittlere Abweichung</b>	<b>95,00% Konfidenzintervall der Differenz</b>	<b>Angepasster p-Wert</b>
<b>Fibroblasten - Tumorzelllinie SCC 25</b>			
Kontrolle 1% FCS	0	-0,6408 - 0,6408	>0,9999
Kollagen 20 µg/ml	-0,1133	-0,7541 - 0,5274	>0,9999
Kollagen 40 µg/ml	-0,18	-0,8208 - 0,4608	>0,9999
Kollagen 60 µg/ml	-0,2433	-0,8841 - 0,3974	>0,9999

Tabelle 19: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Proliferationsverhalten Vergleich 8 h

	Kontrolle 1% FCS			Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml		
<b>Fibroblasten</b>	1	1	1	0,56	1	1,7	1,22	0,82	1,01	1,23	1,02	1,33
<b>Tumorzelllinie SCC 25</b>	1	1	1	1,37	0,68	1,32	1,31	1,32	1,49	1,34	0,84	1,09

Tabelle 20: Datentabelle Proliferationsverhalten Vergleich 12 h

Vergleich des Mittelwerts jeder Zelle mit dem Mittelwert der anderen Zellen in dieser Spalte			
Anzahl der Familien	1		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	4		
Alpha	0,05		
<b>Bonferroni-Test für multiple Vergleiche</b>	<b>Mittlere Abweichung</b>	<b>95,00% Konfidenzintervall der Differenz</b>	<b>Angepasster p-Wert</b>
<b>Fibroblasten - Tumorzelllinie SCC 25</b>			
Kontrolle 1% FCS	0	-0,6375 - 0,6375	>0,9999
Kollagen 20 µg/ml	-0,03667	-0,6742 - 0,6009	>0,9999
Kollagen 40 µg/ml	-0,3567	-0,9942 - 0,2809	0,5404
Kollagen 60 µg/ml	0,1033	-0,5342 - 0,7409	>0,9999

Tabelle 21: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Proliferationsverhalten Vergleich 12 h

	Kontrolle 1% FCS			Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml		
<b>Fibroblasten</b>	1	1	1	1,1	0,84	1,66	1,58	0,86	0,93	1,4	1,2	0,92
<b>Tumorzelllinie SCC 25</b>	1	1	1	1,38	0,91	1,22	1,4	1,13	1,25	1,51	0,92	1,28

Tabelle 22: Datentabelle Proliferationsverhalten Vergleich 24h

Vergleich des Mittelwerts jeder Zelle mit dem Mittelwert der anderen Zellen in dieser Spalte			
Anzahl der Familien	1		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	4		
Alpha	0,05		
<b>Bonferroni-Test für multiple Vergleiche</b>	<b>Mittlere Abweichung</b>	<b>95,00% Konfidenzintervall der Differenz</b>	<b>Angepasster p-Wert</b>
<b>Fibroblasten - Tumorzelllinie SCC 25</b>			
Kontrolle 1% FCS	0	-0,6051 - 0,6051	>0,9999
Kollagen 20 µg/ml	0,03	-0,5751 - 0,6351	>0,9999
Kollagen 40 µg/ml	-0,1367	-0,7417 - 0,4684	>0,9999
Kollagen 60 µg/ml	-0,06333	-0,6684 - 0,5417	>0,9999

Tabelle 23: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Proliferationsverhalten Vergleich 24 h

	Kontrolle 1% FCS			Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml		
<b>Fibroblasten</b>	1	1	1	1,42	1	2,05	1,74	0,84	1,23	1,89	1,27	1,51
<b>Tumorzelllinie SCC 25</b>	1	1	1	2,12	1,42	1,87	1,82	1,4	2,02	2,1	1,88	1,44

Tabelle 24: Datentabelle Proliferationsverhalten Vergleich 36 h

Vergleich des Mittelwerts jeder Zelle mit dem Mittelwert der anderen Zellen in dieser Spalte			
Anzahl der Familien	1		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	4		
Alpha	0,05		
Bonferroni-Test für multiple Vergleiche	Mittlere Abweichung	95,00% Konfidenzintervall der Differenz	Angepasster p-Wert
<b>Fibroblasten - Tumorzelllinie SCC 25</b>			
Kontrolle 1% FCS	0	-0,7787 - 0,7787	>0,9999
Kollagen 20 µg/ml	-0,3133	-1,092 - 0,4654	>0,9999
Kollagen 40 µg/ml	-0,4767	-1,255 - 0,3021	0,4175
Kollagen 60 µg/ml	-0,25	-1,029 - 0,5287	>0,9999

Tabelle 25: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Proliferationsverhalten Vergleich 36 h

	Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml			Kontrolle Natriumcitrat			Kontrolle 10% FCS			Kontrolle 1% FCS		
<b>4 h</b>	0,113	0,087	0,111	0,251	0,106	0,102	0,172	0,189	0,11	0,051	0,042	0,044	0,082	0,005	0,02	0,103	0,024	0,024
<b>8 h</b>	0,306	0,228	0,272	0,445	0,297	0,341	0,367	0,394	0,315	0,178	0,055	0,098	0,116	0,047	0,061	0,184	0,064	0,079
<b>12 h</b>	0,605	0,395	0,391	0,673	0,453	0,523	0,661	0,558	0,571	0,316	0,178	0,188	0,311	0,092	0,096	0,293	0,211	0,157
<b>24 h</b>	0,987	0,857	0,935	1	0,907	0,975	1	1	1	0,607	0,604	0,678	0,656	0,596	0,728	0,652	0,509	0,643
<b>36 h</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,928	1	1	0,92	1	1	0,847	1

Tabelle 26: Datentabelle Auswertung Migrationsverhalten Fibroblasten

Vergleich der Spalten innerhalb jeder Zeile			
Anzahl der Familien	5		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	5		
Alpha	0,05		
Bonferroni-Test für multiple Vergleiche	Mittlere Abweichung	95,00% Konfidenzintervall der Differenz	Angepasster p-Wert
<b>4 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,05333	-0,1903 - 0,08359	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,1027	-0,2396 - 0,03426	0,2531
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,1067	-0,2436 - 0,03026	0,2126
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0,004667	-0,1323 - 0,1416	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,01467	-0,1223 - 0,1516	>0,9999

<b>8 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,1597	-0,2966 - -0,02274	0,0146
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,252	-0,3889 - -0,1151	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,2497	-0,3866 - -0,1127	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	-0,001333	-0,1383 - 0,1356	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,03433	-0,1026 - 0,1713	>0,9999
<b>12 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,2433	-0,3803 - -0,1064	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,3293	-0,4663 - -0,1924	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,3763	-0,5133 - -0,2394	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	-0,007	-0,1439 - 0,1299	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,054	-0,08292 - 0,1909	>0,9999
<b>24 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,325	-0,4619 - -0,1881	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,3593	-0,4963 - -0,2224	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,3987	-0,5356 - -0,2617	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	-0,02833	-0,1653 - 0,1086	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	-0,05867	-0,1956 - 0,07826	>0,9999
<b>36 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,051	-0,1879 - 0,08592	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,051	-0,1879 - 0,08592	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,051	-0,1879 - 0,08592	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	-0,027	-0,1639 - 0,1099	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	-0,02433	-0,1613 - 0,1126	>0,9999

Tabelle 27: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Migrationsverhalten Fibroblasten

	Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml			Kontrolle Natriumcitrat			Kontrolle 10% FCS			Kontrolle 1% FCS		
<b>4 h</b>	0,085	0,081	0,102	0,065	0,066	0,131	0,067	0,124	0,176	0,049	0,025	0,013	0,01	0,013	0,028	0,025	0,025	0,008
<b>8 h</b>	0,328	0,307	0,379	0,276	0,267	0,421	0,348	0,364	0,487	0,174	0,13	0,127	0,04	0,05	0,087	0,136	0,132	0,179
<b>12 h</b>	0,542	0,479	0,622	0,555	0,551	0,664	0,58	0,69	0,712	0,382	0,196	0,259	0,068	0,082	0,135	0,329	0,203	0,304
<b>24 h</b>	0,974	0,968	0,874	0,972	0,954	0,893	0,976	0,986	0,979	0,852	0,658	0,725	0,324	0,39	0,6	0,738	0,828	0,557
<b>36 h</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,946	0,979	0,941	0,807	0,675	0,854	0,975	1	0,91

Tabelle 28: Datentabelle Auswertung Migrationsverhalten SCC 25-Tumorzellen

Vergleich der Spalten innerhalb jeder Zeile			
Anzahl der Familien	5		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	5		
Alpha	0,05		
Bonferroni-Test für multiple Vergleiche	Mittlere Abweichung	95,00% Konfidenzintervall der Differenz	Angepasster p-Wert
<b>4 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,07	-0,2052 - 0,06517	0,8671
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,068	-0,2032 - 0,06717	0,9292
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,103	-0,2382 - 0,03217	0,2355
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	-0,009667	-0,1448 - 0,1255	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,002333	-0,1328 - 0,1375	>0,9999
<b>8 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,189	-0,3242 - -0,05383	0,0022
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,1723	-0,3075 - -0,03716	0,0062
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,2507	-0,3858 - -0,1155	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0,005333	-0,1298 - 0,1405	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,09	-0,04517 - 0,2252	0,4079
<b>12 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,269	-0,4042 - -0,1338	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,3113	-0,4465 - -0,1762	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,382	-0,5172 - -0,2468	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	-0,0003333	-0,1355 - 0,1348	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,1837	0,04850 - 0,3188	0,0031
<b>24 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,231	-0,3662 - -0,09583	0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,232	-0,3672 - -0,09683	0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,2727	-0,4078 - -0,1375	<0,0001
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	-0,03733	-0,1725 - 0,09784	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,2697	0,1345 - 0,4048	<0,0001
<b>36 h</b>			
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 20 µg/ml	-0,03833	-0,1735 - 0,09684	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 40 µg/ml	-0,03833	-0,1735 - 0,09684	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kollagen 60 µg/ml	-0,03833	-0,1735 - 0,09684	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle Natriumcitrat	0,006333	-0,1288 - 0,1415	>0,9999
Kontrolle 1% FCS vs. Kontrolle 10% FCS	0,183	0,04783 - 0,3182	0,0032

Tabelle 29: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Migrationsverhalten SCC 25-Tumorzellen

	Kontrolle 1% FCS			Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml		
<b>Fibroblasten</b>	1	1	1	2,245	1,728	2,205	4,987	2,106	2,026	3,417	3,755	2,185
<b>Tumorzelllinie SCC 25</b>	1	1	1	4,397	4,19	5,276	3,362	3,414	6,776	3,466	6,414	9,103

Tabelle 30: Datentabelle Migrationsverhalten Vergleich 4 h

Vergleich des Mittelwerts jeder Zelle mit dem Mittelwert der anderen Zellen in dieser Spalte			
Anzahl der Familien	1		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	4		
Alpha	0,05		
<b>Bonferroni-Test für multiple Vergleiche</b>	<b>Mittlere Abweichung</b>	<b>95,00% Konfidenzintervall der Differenz</b>	<b>Angepasster p-Wert</b>
<b>Fibroblasten - Tumorzelllinie SCC 25</b>			
Kontrolle 1% FCS	0	-3,220 - 3,220	>0,9999
Kollagen 20 µg/ml	-2,562	-5,781 - 0,6580	0,1591
Kollagen 40 µg/ml	-1,478	-4,697 - 1,742	0,8601
Kollagen 60 µg/ml	-3,209	-6,428 - 0,01103	0,051

Tabelle 31: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Migrationsverhalten Vergleich 4 h

	Kontrolle 1% FCS			Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml		
<b>Fibroblasten</b>	1	1	1	2,201	2,06	2,544	1,852	1,792	2,826	2,336	2,443	3,268
<b>Tumorzelllinie SCC 25</b>	1	1	1	2,807	2,092	2,495	4,083	2,725	3,128	3,367	3,615	2,89

Tabelle 32: Datentabelle Migrationsverhalten Vergleich 8 h

Vergleich des Mittelwerts jeder Zelle mit dem Mittelwert der anderen Zellen in dieser Spalte			
Anzahl der Familien	1		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	4		
Alpha	0,05		
<b>Bonferroni-Test für multiple Vergleiche</b>	<b>Mittlere Abweichung</b>	<b>95,00% Konfidenzintervall der Differenz</b>	<b>Angepasster p-Wert</b>
<b>Fibroblasten - Tumorzelllinie SCC 25</b>			
Kontrolle 1% FCS	0	-0,9642 - 0,9642	>0,9999
Kollagen 20 µg/ml	-0,1963	-1,160 - 0,7678	>0,9999
Kollagen 40 µg/ml	-1,155	-2,119 - -0,1912	0,0156
Kollagen 60 µg/ml	-0,6083	-1,572 - 0,3558	0,3798

Tabelle 33: Statistische Auswertung Migrationsverhalten Vergleich 8 h

	Kontrolle 1% FCS			Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml		
<b>Fibroblasten</b>	1	1	1	1,945	1,719	2,232	1,992	1,977	2,383	2,081	2,476	2,555
<b>Tumorzelllinie SCC 25</b>	1	1	1	2,746	1,793	1,775	3,054	2,056	2,374	3	2,533	2,592

Tabelle 34: Datentabelle Migrationsverhalten Vergleich 12 h

Vergleich des Mittelwerts jeder Zelle mit dem Mittelwert der anderen Zellen in dieser Spalte			
Anzahl der Familien	1		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	4		
Alpha	0,05		
<b>Bonferroni-Test für multiple Vergleiche</b>	<b>Mittlere Abweichung</b>	<b>95,00% Konfidenzintervall der Differenz</b>	<b>Angepasster p-Wert</b>
<b>Fibroblasten - Tumorzelllinie SCC 25</b>			
Kontrolle 1% FCS	0	-0,7339 - 0,7339	>0,9999
Kollagen 20 µg/ml	-0,1393	-0,8732 - 0,5946	>0,9999
Kollagen 40 µg/ml	-0,3773	-1,111 - 0,3566	0,6695
Kollagen 60 µg/ml	-0,3377	-1,072 - 0,3962	0,8557

Tabelle 35: Statistische Auswertung 2-Way-Anova Migrationsverhalten Vergleich 12 h

	Kontrolle 1% FCS			Kollagen 20 µg/ml			Kollagen 40 µg/ml			Kollagen 60 µg/ml		
<b>Fibroblasten</b>	1	1	1	1,376	1,368	1,235	1,374	1,348	1,262	1,379	1,393	1,383
<b>Tumorzelllinie SCC 25</b>	1	1	1	1,641	1,425	1,555	1,663	1,508	1,621	1,663	1,663	1,663

Tabelle 36: Datentabelle Migrationsverhalten Vergleich 36 h

Vergleich des Mittelwerts jeder Zelle mit dem Mittelwert der anderen Zellen in dieser Spalte			
Anzahl der Familien	1		
Anzahl der Vergleiche pro Familie	4		
Alpha	0,05		
<b>Bonferroni-Test für multiple Vergleiche</b>	<b>Mittlere Abweichung</b>	<b>95,00% Konfidenzintervall der Differenz</b>	<b>Angepasster p-Wert</b>
<b>Fibroblasten - Tumorzelllinie SCC 25</b>			
Kontrolle 1% FCS	0	-0,1359 - 0,1359	>0,9999
Kollagen 20 µg/ml	-0,214	-0,3499 - -0,07809	0,0017
Kollagen 40 µg/ml	-0,2693	-0,4052 - -0,1334	0,0002
Kollagen 60 µg/ml	-0,278	-0,4139 - -0,1421	0,0001

Tabelle 37: Statistische Auswertung Migrationsverhalten Vergleich 36 h

## **9 Danksagung**

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Universitätsmedizin Mainz bedanken, die mir bei der Umsetzung meiner Forschungsarbeit im Rahmen meiner Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonderer Dank gilt PD Dr. Dr. Daniel Thiem und Dr. Nadine Wiesmann für die umfangreiche Betreuung.

Zudem möchte ich allen, die mir nahestehen, für die unermüdliche Unterstützung danken.

## 10 Tabellarischer Lebenslauf