

# Interaktion zwischen Kopf-Hals-Tumoren und mesenchymalen Fettgewebstammzellen

David Daniel Utz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Florian Eyer

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Markus Wirth
2. Priv.-Doz. Dr. Naglaa Mansour

Die Dissertation wurde am 27.06.2022 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.04.2023 angenommen.

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1 EPIDEMIOLOGIE DER KOPF-HALS-TUMORE	6
1.2 KLASSIFIKATION NACH DEM TNM-SYSTEM UND EINTEILUNG IN UICC-STADIEN	7
1.3 RISIKOFAKTOREN	15
1.4 MOLEKULARPATHOLOGIE	17
1.5 THERAPIE	18
1.6 ZIELGERICHTETE KREBSTHERAPIE UND KREBSIMMUNOTHERAPIE	21
1.7 TUMORIMMUNOLOGIE	25
1.8 TUMORMIKROUMGEBUNG	27
1.9 MESENCHYMALE FETTGEWEBSTAMMZELLEN	30
<b>2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>36</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>37</b>
3.1 ZELLINIEN	37
3.2 REAGENZIEEN	38
3.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	39
3.4 LABORGERÄTE	46
3.5 SOFTWARE	47
<b>4 METHODEN</b>	<b>48</b>
4.1 ZELLKULTUR	48
4.1.1 AUFTAUEN DER ZELLEN	48
4.1.2 MEDIUMWECHSEL	49
4.1.3 SUBKULTIVIERUNG	49
4.1.4 EINFRIEREN DER ZELLEN	49
4.1.5 BESTIMMUNG DER ZELLKONZENTRATION	50
4.1.6 GEWINNEN VON KONDITIONIERTEM MEDIUM	50
4.1.7 3D ZELLKULTUR	50
4.1.8 PROLIFERATIONSANALYSEN	52
4.2 ETABLIERUNG VON PRIMÄRKULTUREN	53
4.2.1 ETABLIERUNG VON MESENCHYMALEN FETTGEWEBSTAMMZELL-PRIMÄRKULTUREN	53

4.2.2 ISOLATION VOM IMMUNZELLEN DES PERIPHEREN BLUTES	53
<b>4.3 MIGRATIONSEXPERIMENTE</b>	<b>54</b>
4.3.1 MIGRATIONSEXPERIMENTE MIT EINER ZELLINIE	54
4.3.2 MIGRATIONSEXPERIMENTE MIT ZWEI VERSCHIEDENEN ZELLINIEN	55
4.3.3 FLUORESCENZFÄRBUNGEN	56
<b>4.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE</b>	<b>57</b>
4.4.1 FÄRBEN DER ZELLEN	57
4.4.2 DATENAUSWERTUNG DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	61
<b>4.5 ZYTOKINANALYSE</b>	<b>61</b>
<b>4.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>62</b>
<b>5 ERGEBNISSE</b>	<b>63</b>
<hr/>	
<b>5.1 PROLIFERATIONSANALYSEN</b>	<b>63</b>
<b>5.2 WACHSTUMSMUSTER VON KOPF-HALS-PLATTENEPIHELKARZINOMZELLEN UND MESENCHYMALEN FETTGEBEBSSTAMMZELLEN IN DER MISCHKULTUR</b>	
<b>5.3 MIGRATIONSANALYSEN</b>	<b>65</b>
5.3.1 MIGRATIONSANALYSEN KOPF-HALS-PLATTENEPIHELKARZINOMZELLEN	65
5.3.2 MIGRATIONSANALYSEN MESENCHYMALER FETTGEBEBSSTAMMZELLEN	69
5.3.3 MIGRATIONSANALYSEN IN DER PARALLELKULTUR UND MISCHKULTUR	75
5.3.4 MIGRATIONSANALYSEN MIT FLUORESZIERENDEN ZELLEN	80
<b>5.4 DREIDIMENSIONALE ZELLKULTUR</b>	<b>85</b>
5.4.1 MAGNETIC LEVITATION	85
5.4.2 HANGING DROP	86
<b>5.5 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN</b>	<b>88</b>
5.5.1 GATING HIERARCHIE	88
5.5.2 ANALYSE DES EINFLUSSES VON KOPF-HALS-PLATTENEPIHELKARZINOMZELLEN UND MESENCHYMALEN FETTGEBEBSSTAMMZELLEN AUF IMMUNZELLEN	93
5.5.3 MODELL TUMORINFILTRIERENDER LYMPHOZYTEN IN DER DREIDIMENSIONALEN ZELLKULTUR	101
5.5.4 DETAILANALYSE DES EINFLUSSES VON KOPF-HALS-PLATTENEPIHELKARZINOMZELLEN UND MESENCHYMALEN FETTGEBEBSSTAMMZELLEN AUF IMMUNZELLEN	104
<b>5.6 ZYTOKINANALYSE IN KONDITIONIERTEN MEDIEN</b>	<b>116</b>
<b>6 DISKUSSION</b>	<b>129</b>
<hr/>	
<b>6.1 PRIMÄRKULTUREN</b>	<b>130</b>

<b>6.2 MIGRATIONSANALYSE</b>	<b>131</b>
6.2.1 TUMORZELLMIGRATION	131
6.2.2 MESENCHYMALE FETTGEWEBSSTAMMZELLENMIGRATION	133
6.2.3 MIGRATIONSEXPERIMENTE MIT FLUORESZIERENDEN ZELLEN	134
<b>6.3 3D KULTUR</b>	<b>135</b>
6.3.1 MIGRATION IN 3D KULTUR	135
<b>6.4 IMMUNMODULATORISCHE EFFEKTE VON MESENCHYMALEN FETTGEWEBSSTAMMZELLEN UND KOPF-HALS-PLATTENEPIHELKARZINOMZELLEN</b>	<b>136</b>
6.4.1 EINFLUSS VON KONDITIONIERTEM MEDIUM UND CO-KULTIVIERUNG AUF IMMUNZELLEN	137
6.4.2 <i>IN VITRO</i> TUMORINFILTRIERENDE LYMPHOZYTEN	138
6.4.3 DETAILANALYSE DES EINFLUSSES VON KOPF-HALS-PLATTENEPIHELKARZINOMZELLEN UND MESENCHYMALEN FETTGEWEBSSTAMMZELLEN AUF IMMUNZELLEN	140
<b>6.5 ZYTOKINANALYSE IN KONDITIONIERTEN MEDIEN</b>	<b>142</b>
<b>7 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>144</b>
<b>8 ANHANG</b>	<b>147</b>
8.1 DANKSAGUNG	147
8.2 TABELLENVERZEICHNIS	148
8.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	149
8.4 LITERATURVERZEICHNIS	152
<b>9 APPENDIX</b>	<b>176</b>
9.1 WEITERE EXPERIMENTE	176
8.1.1 METHODIK: ETABLIERUNG VON KOPF-HALS-PLATTENEPIHELKARZINOMZELL-PRIMÄRKULTUREN	176
9.1.2 ERGEBNIS: ETABLIERUNG VON KOPF-HALS-PLATTENEPIHELKARZINOMZELL-PRIMÄRKULTUREN	177
<b>9.2 VERÖFFENTLICHUNG</b>	<b>179</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>*</b>	Signifikanzwert <0,05
<b>**</b>	Signifikanzwert <0,005
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>2D</b>	zweidimensional
<b>3D</b>	dreidimensional
<b>A.</b>	Arteria
<b>AA</b>	Antibiotic – Antimycotic
<b>AG</b>	Aktiengesellschaft
<b>Ctrl.</b>	Kontrolle
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>EGF/EGFR</b>	Epidermal Growth Factor/Receptor
<b>EMT</b>	Epitheliale mesenchymale Transition
<b>FBS/FCS</b>	Fetal Bovine Serum/ Fetal Calf Serum
<b>FoxP3</b>	Forkhead-Box-Protein P3
<b>GmbH</b>	Gemeinschaft mit beschränkter Haftung
<b>HBSS</b>	Hanks' Balanced Salt Solution
<b>HNSCC</b>	Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma
<b>HPV</b>	Humanes Papillomvirus
<b>IL</b>	Interleukin
<b>LLC</b>	Limited Liability Company
<b>m</b>	Männlich
<b>M.</b>	Musculus
<b>MEM NEAA</b>	Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MSCM</b>	Serum-free Mesenchymal Stem Cell Medium enhanced
<b>N.</b>	Nervus
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen

<b>PBS</b>	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
<b>PD-1/PD-L1</b>	Programmed cell death protein 1 / zugehöriger Ligand
<b>PDGF</b>	Platelet-derived Growth Factor
<b>Rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>TAM</b>	Tumorassoziierte Makrophagen
<b>TGF-beta</b>	Transforming growth factor beta
<b>TIL</b>	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>w</b>	Weiblich

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie der Kopf-Hals-Tumore

Bösartige Neubildungen sind nach Krankheiten des Herzkreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (DESTATIS, 2015). Davon nehmen Tumore der Mundhöhle und des Rachens den sechsten Platz der häufigsten Todesursachen bei Männern und bei Frauen den 16. Platz ein (Becker & Holzmeier, 2012). Histologisch setzen sich Kopf-Hals-Tumore zu 85% aus Plattenepithelkarzinomen zusammen, während die restlichen 15% aus Sarkomen, Melanomen und Lymphomen bestehen (Kundu & Nestor, 2012).

Im Jahr 2013 sind in Deutschland 12.992 Männer und 4.532 Frauen neu erkrankt, während 5.494 Männer und 1.689 Frauen an Kopf-Hals-Tumoren gestorben sind. Die altersstandardisierte Inzidenz für Männer lag bei 24,3 pro 100.000 Einwohner und für Frauen bei 7,3 pro 100.000 Einwohner (DESTATIS, 2015). Damit liegt Deutschland im europäischen Vergleich im Mittelfeld. Im internationalen Vergleich hat Melanesien die höchste und Ost-Asien die niedrigste Inzidenz. Die regionalen Unterschiede korrelieren eng mit der Verteilung von Risikofaktoren. Auch die geschlechterspezifischen Unterschiede lassen sich größtenteils auf die unterschiedliche Exposition gegenüber Risikofaktoren, insbesondere Tabak und Alkohol, zurückführen (Simard et al., 2014; Sturgis & Cinciripini, 2007).

Das durchschnittliche relative 5-Jahres-Überleben beträgt für Männer 51% und für Frauen 61%. Somit sind Kopf-Hals-Tumore die Tumorerkrankung mit dem elft schlechtesten 5-Jahres-Überleben (Robert-Koch-Institut, 2014). Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 63,8 Jahren und für Frauen bei 66,2 Jahren. Trotz der Entwicklung neuer Therapien hat sich die Mortalität in den letzten zehn Jahren ähnlich entwickelt, wie die Zahl der Neuerkrankungen.

Hier zeigt sich bei Männern eine Abnahme der Neuerkrankungen und der Mortalität, während bei Frauen eine Zunahme zu verzeichnen ist (Robert-Koch-Institut, 2016).

Die Entwicklung der Neuerkrankungen unterscheidet sich je nach Lokalisation des Primärtumors stark. So hat die Inzidenz von Karzinomen der Mundhöhle und des Kehlkopfes für Männer konstant abgenommen, während Karzinome des

Oropharynx, des Zungengrundes und der Tonsillen für beide Geschlechter zugenommen haben (Rettig & D'Souza, 2015; Simard et al., 2014). Dieser Anstieg ist insbesondere durch jüngere Menschen (>45 Jahre) mit HPV-assoziierten Tumoren getrieben (Chaturvedi et al., 2008; Hussein et al., 2017; Mehanna et al., 2013).

## 1.2 Klassifikation nach dem TNM-System und Einteilung in UICC-Stadien

Die international verbreitete und klinisch angewandte Klassifikation von malignen Neoplasien nach dem TNM-System wird regelmäßig von der UICC (Union internationale contre le cancer) herausgegeben und ist der zentrale prognostische und prädiktive Faktor in der Onkologie. Somit spielt die Klassifikation eine zentrale Rolle in der Auswahl der Therapie.

Dabei steht *T* für Tumor und bezieht sich auf die Größe des Primärtumors, *N* für Nodus und gibt an, ob und in welchem Ausmaß ein Befall der Lymphknoten vorliegt und *M* für Metastase gibt Auskunft über das Vorliegen von Fernmetastasen. Seit der Entwicklung des Systems in den 1940er Jahren durch Pierre Denoix wurde es mehrfach erweitert. *G* beschreibt das Grading und gibt Auskunft darüber, wie stark der Tumor von dem Ursprungsgewebe entdifferenziert ist. *y* wird der Klassifikation vorangestellt, wenn ein bereits therapierter Tumor klassifiziert wird und *r* beschreibt ein Tumorrezidiv. Der Zusatz *C* beschreibt, wie zuverlässig die Einteilung in das jeweilige TNM Stadium ist. Die Zuverlässigkeit ist von der Methode abhängig, mit der die Einteilung vorgenommen wurde. Dafür gibt es Zusätze, die beschreiben wie das Staging vorgenommen wurde. Hierbei steht *c* für ein präoperatives Staging mittels klinischer und bildgebender Untersuchungen, sowie kleinen diagnostischen Eingriffen. *p* steht für eine histopathologische Klassifikation, bei der das Gewebe postoperativ beurteilt wurde. Des Weiteren kann angegeben werden, ob der Tumor in umliegendes Gewebe infiltriert. So gibt *L* Auskunft darüber, ob der Tumor in Lymphgefäße, *V* ob der Tumor in Venen eingewachsen ist und *Pn* ob eine Perineuralscheideninfiltration vorhanden ist. Das Kürzel *ECE+* bezieht sich auf befallene Lymphknoten und beschreibt ein Wachstum über die Lymphknotenkapsel hinaus (Wittekind, 2016).

Das Staging anhand der achten Auflage des TNM Systems ist im Folgenden für Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs aufgeführt. In dieser Auflage werden erstmal HPV-positive und HPV-negative Tumore aufgrund ihrer unterschiedlichen Prognose getrennt klassifiziert (Dahlstrom et al., 2013; Huang & O'Sullivan, 2017).

Tabelle 1: Definitionen der TNM Stadien

<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Nachweis eines Primärtumors
Tis	Carcinoma in situ
T1-4	Zunehmende Größe und/oder lokale Ausbreitung des Primärtumors
<b>N</b>	<b>Regionale Lymphknoten</b>
NX	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1-3	Zunehmender Befall lokaler Lymphknoten
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
<b>G</b>	<b>Histopathologisches Grading</b>
GX	Grad der Differenzierung kann nicht beurteilt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert
<b>L</b>	<b>Lymphatische Infiltration</b>
LX	Lymphatische Infiltration kann nicht beurteilt werden
L0	Keine lymphatische Infiltration
L1	Lymphatische Infiltration
<b>V</b>	<b>Venöse Infiltration</b>
VX	Venöse Infiltration kann nicht beurteilt werden
V0	Keine venöse Infiltration
V1	Mikroskopische venöse Infiltration

V2	Makroskopische venöse Infiltration
<b>R</b>	<b>Tumorresiduen</b>
RX	Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

In Tabelle 2 sind die T Stadien der Kopf-Hals-Tumoren entsprechend ihrer Ursprungslokalisation aufgelistet.

Tabelle 2: T Stadien entsprechend ihrer Lokalisation und Größe

### **Lippe und Mundhöhle (ICD-O-3 C00, C02-006)**

T1	Tumor $\leq 2$ cm und $\leq 5$ mm Invasionstiefe
T2	Tumor $\leq 2$ cm und Invasionstiefe $\geq 5$ mm aber $\leq 10$ mm oder Tumor $\geq 2$ cm aber $\leq 4$ cm und Invasionstiefe $\leq 10$ mm
T3	Tumor $\geq 4$ cm oder Invasionstiefe $\geq 10$ mm
T4a	Tumorinvasion der Kortikalis, des N. alveolaris inferior, des Mundbodens oder der Haut des Kinns oder der Nase
T4a (Mundhöhle)	Tumorinvasion der Kortikalis der Mandibel oder des Sinus maxillaris oder Infiltration der Gesichtshaut
T4b (Lippe und Mundhöhle)	Tumorinvasion der Flügelplatten, des Mastikatorraums oder die Schädelbasis oder Umbauung der A. carotis interna
<b>Oropharynx (p16 negativ oder p16 Status unbekannt)</b>	
T1	Tumor $\leq 2$ cm
T2	Tumor $\geq 2$ cm aber $\leq 4$ cm
T3	Tumor $\geq 4$ cm oder Ausdehnung an die linguale Oberfläche der Epiglottis
T4a	Tumorinvasion von Larynx, M. genioglossus, hyoglossus, palatoglossus und styloglossus, medialem Flügelbein, Hartgaumen oder Mandibel
T4b	Tumorinvasion von M. pterigoideus lateralis, Flügelplatte, lateralem Nasopharynx, Schädelbasis oder Umbauung der A. carotis

<b>Oropharynx (p16 immunhistochemisch positiv)</b>	
T1	Tumor $\leq$ 2 cm
T2	Tumor $\geq$ 2 cm aber $\leq$ 4 cm
T3	Tumor $\geq$ 4 cm oder Ausdehnung an die linguale Oberfläche der Epiglottis
T4	Tumorinvasion von Larynx, M. genioglossus, hyoglossus, palatoglossus und styloglossus, medialem Flügelbein, M. pterigoideus lateralis, lateralem Nasopharynx, Schädelbasis, Hartgaumen, Mandibel, Schädelbasis oder Umbauung der A. carotis
<b>Hypopharynx</b>	
T1	Tumor auf einen Teilbereich des Hypopharynx beschränkt und/oder Tumor $\leq$ 2 cm
T2	Tumorausdehnung in mehr als einem Teilbereich des Hypopharynx oder Tumor $\geq$ 2 cm aber $\leq$ 4 cm ohne Fixation des Hemilarynx
T3	Tumor $\geq$ 4 cm oder mit Fixation des Hemilarynx oder Ausdehnung bis an den Ösophagus
T4a	Tumorinvasion von Schild/Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus oder des zentralen Weichteilkompartiments
T4b	Tumorinvasion der prävertebralen Faszie oder mediastinaler Strukturen oder Umbauung der A. carotis
<b>Nasopharynx</b>	
T1	Tumor beschränkt auf Nasopharynx oder Ausdehnung zum Oropharynx und/oder Nasenhöhle ohne parapharyngeale Beteiligung
T2	Tumorausdehnung bis in den Parapharyngealraum und/oder Infiltration des medialen oder lateralen Flügelbeins und/oder der prävertebralen Muskulatur
T3	Tumorinvasion der knöchernen Strukturen der Schädelbasis, des Flügelbeins und/oder der Nasenebenhöhlen
T4	Tumor mit intrakranieller Ausdehnung und/oder Beteiligung der Hirnnerven, des Hypopharynx, der Orbitae, der Parotis

	und/oder Infiltration jenseits der lateralen Oberfläche des M. pterigoideus lateralis
--	---

### **Larynx (ICD-O-3 C32.0-3, C10.1)**

#### **Supraglottis**

T1	Tumor begrenzt auf einen Teilbereich des Supraglottis mit normaler Beweglichkeit der Stimmlippen
T2	Tumorinvasion der Schleimhaut von mehr als einem benachbarten Teilbereich der Supraglottis oder Glottis oder einer Region außerhalb der Supraglottis (Schleimhaut der Zungenbasis, Vallecula epiglottica, mediale Wand des Sinus piriformis) ohne Fixation des Larynx
T3	Tumor auf Larynx begrenzt mit Fixation der Stimmlippe und/oder Infiltration von Postkrikoidbereich, Präepiglottischem Raum, paraglottischem Raum und/oder des inneren Kortex des Schildknorpels
T4a	Tumorinvasion durch den Schildknorpel und/oder Invasion des Gewebes jenseits des Larynx z.B. Weichteile des Halses inklusive tiefer/äußerer Muskeln der Zunge, der infrahyoidalen Muskulatur der Schilddrüse oder des Ösophagus
T4b	Tumorinvasion des prävertebralen Raums, mediastinaler Strukturen oder Umbauung der A. carotis

#### **Glottis**

T1a	Tumor begrenzt auf eine Stimmlippe bei normaler Beweglichkeit
T1b	Tumor begrenzt auf Stimmlippe bei normaler Beweglichkeit mit Beteiligung beider Stimmlippen
T2	Tumorausdehnung bis zur Supraglottis und/oder Subglottis und/oder mit eingeschränkter Stimmlippenbeweglichkeit
T3	Tumor auf Larynx beschränkt mit Fixierung der Stimmlippen und/oder Infiltration des paraglottischen Raums und/oder des inneren Kortex des Schildknorpels
T4a	Tumorinfiltration des äußeren Kortex des Schildknorpels und/oder Infiltration von Gewebe außerhalb des Larynx z.B. Trachea, Weichteile des Halses inklusive tiefer/äußerer

	Muskeln der Zunge, der infrahyoidalen Muskulatur der Schilddrüse oder des Ösophagus
T4b	Tumorinfiltration des prävertebralen Raums, mediastinaler Strukturen oder Umbauung der A. carotis
<b>Subglottis</b>	
T1	Tumor begrenzt auf die Subglottis
T2	Tumorausdehnung zu den Stimmlippen mit eingeschränkter oder normaler Beweglichkeit
T3	Tumor auf Larynx begrenzt mit Stimmlippenfixierung
T4a	Tumorinfiltration des äußeren Kortex des Schildknorpels und/oder Infiltration von Gewebe außerhalb des Larynx z.B. Trachea, Weichteile des Halses inklusive tiefer/äußerer Muskeln der Zunge, der infrahyoidalen Muskulatur der Schilddrüse oder des Ösophagus
T4b	Tumorinfiltration des prävertebralen Raums, mediastinaler Strukturen oder Umbauung der A. carotis

In Tabelle 3 findet sich der Nodalstatus in Abhängigkeit der anatomischen Ursprungsregion.

Tabelle 3: Nodalstatus

**Regionäre Lymphknoten bei Hypopharynx- und p16 negativen Oropharynxtumoren**

N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem einzelnen ipsilateralen Lymphknoten: $\leq 3$ cm, ohne extranodale Ausbreitung
N2a	Metastase in einem einzelnen ipsilateralen Lymphknoten: $> 3$ cm aber $\leq 6$ cm, ohne extranodale Ausbreitung
N2b	Metastasen in mehreren ipsilateralen Lymphknoten: $\leq 6$ cm, ohne extranodale Ausbreitung
N2c	Metastasen in bilateral oder kontralateralen Lymphknoten: $\leq 6$ cm, ohne extranodale Ausbreitung

N3a	Metastase in einem Lymphknoten > 6 cm, ohne extranodale Ausbreitung
N3b	Metastase in einem einzelnen oder mehreren Lymphknoten mit extranodaler Ausbreitung

### **P16 positive Oropharynxtumore**

N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in einem oder mehreren unilateralen Lymphknoten, alle ≤ 6 cm
N2	Metastasen in kontralateralen oder bilateralen Lymphknoten, alle ≤ 6 cm
N3	Lymphknotenmetastase > 6 cm

### **Nasopharynx**

N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Zervikale Lymphknotenmetastasen und/oder unilaterale oder bilaterale retropharyngeale Lymphknotenmetastasen ≤ 6cm oberhalb der kaudalen Grenze des Schildknorpels
N2	Bilaterale zervikale Lymphknotenmetastasen ≤ 6 cm oberhalb der kaudalen Grenze des Schildknorpels
N3	Zervikale Lymphknotenmetastasen > 6 cm und/oder Ausdehnung unterhalb der kaudalen Grenze des Schildknorpels

In Tabelle 4 findet sich die Einteilung in die UICC Stadien in Abhängigkeit des TNM Status.

Tabelle 4: UICC Stadien

### **Hypopharynx- und p16 negative Oropharynxtumore**

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IV A	T1, T2, T3	N2	M0

	T4a	N0, N1, N2	M0
Stadium IV B	T4b	Jeder N	M0
	Jeder T	N3	M0
Stadium IV C	Jeder T	Jeder N	M1

#### **P16 positive Oropharynxtumore (klinische Einteilung)**

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0, N1	M0
Stadium II	T1, T2,	N2	M0
	T3	N0, N1, N2	M0
Stadium III	T1, T2, T3	N3	M0
	T4	Jeder N	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

#### **P16 positive Oropharynxtumore (pathologische Einteilung)**

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0, N1	M0
Stadium II	T1, T2,	N2	M0
	T3	N0, N1, N2	M0
Stadium III	T3, T4	N3	M0
<b>Stadium IV</b>	Jedes T	Jedes N	M1

#### **Nasopharynxtumore**

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T1	N1	M0
	T2	N0, N1	M0
Stadium III	T1, T2	N2	M0
	T3	N0, N1, N2	M0
Stadium IV A	T4	N0, N1, N2	M0
	Jeder T	N3	M0
Stadium IV B	Jedes T	Jedes N	M1

### 1.3 Risikofaktoren

Zu den Hauptrisikofaktoren für Kopf-Hals-Tumore wird aufgrund der Erkenntnisse der letzten Jahre, zusätzlich zu Tabakkonsum und Alkohol, eine Infektion des oberen Aerodigestivtrakts mit humanen Papillomviren gezählt. Relevant für eine virale Onkogenese sind dabei die als Hochrisikotypen eingestuften Varianten (Shaw & Beasley, 2016).

Die größte prospektive Studie zu Kopf-Hals-Tumoren ist die 2014 publizierte Kohortenstudie von Maasland et al. aus den Niederlanden, bei welcher ein Kollektiv von 120.852 Probanden über einen Zeitraum von 17,3 Jahren beobachtet wurde. In diesem Zeitraum wurde bei 395 Probanden ein Kopf-Hals-Tumor diagnostiziert. Davon waren 110 Karzinome der Mundhöhle, 83 Karzinome des Oro- und Hypopharynx und 199 Larynxkarzinome. Dabei stellte sich fortgesetzter Nikotinabusus als der bedeutendste Risikofaktor heraus. So lag das relative Risiko für Raucher einen Kopf-Hals-Tumor beliebiger Lokalisation zu entwickeln bei  $RR = 4,49$  (95% CI 3,11-6,48) mit dem höchsten relativen Risiko für Karzinome des Oro- und Hypopharynx ( $RR = 8,53$ ) und für Larynxkarzinome ( $RR = 8,07$ ). Alkohol erhöhte ebenfalls das Karzinomrisiko. Für Menschen mit einem Alkoholkonsum von mehr als 30 Gramm pro Tag lag das relative Risiko einen Kopf-Hals-Tumor beliebiger Lokalisation zu entwickeln bei  $RR = 2,74$  (95% CI 1,85-4,06), mit der größten Risikoerhöhung für Karzinome der Mundhöhle mit  $RR = 6,39$  (95% CI 3,13-13,03).

Sowohl für Alkoholkonsum als auch für Zigarettenrauchen zeigte sich bei Einteilung in Subgruppen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung.

Die häufig vorliegende Kombination aus den Noxen Alkohol- und Tabakkonsum hat einen multiplikativen Effekt auf das Karzinomrisiko (Hashibe et al., 2009). Bei Probanden, die sowohl mehr als 15 Gramm Alkohol, als auch mehr als 20 Zigaretten täglich konsumierten lag das relative Risiko bei 16,12 ( $RR = 16,12$ , 95% CI 4,31-60,27) für das Auftreten von Karzinomen des Oro- und Hypopharynx (Maasland et al., 2014).

Dieser multiplikative Effekt wird in mehreren Studien beschrieben und wird dabei teilweise noch stärker eingeschätzt. So berichteten Blot et al. von einem 35-fach erhöhtem Risiko (Blot et al., 1988).

Die onkogenen Hochrisikotypen der humanen Papillomviren spielen eine wesentliche Rolle für Kopf-Hals-Tumore. Dabei unterscheiden sich HPV-assoziierte Tumore in ihrer Tumorbilologie deutlich von HPV-negativen Tumoren. HPV-assoziierte Kopf-Hals-Karzinome treten bei jüngeren Patienten auf, sind häufig am Zungengrund und im Bereich der Tonsillen lokalisiert und sprechen besser auf konservative Therapie an (Ang et al., 2010; Dayyani et al., 2010). Charakteristisch für HPV-positive Tumore ist ein initial kleiner Primarius mit ausgeprägter, früh auftretender Lymphknotenmetastasierung und einer geringeren Inzidenz von Fernmetastasen (Huang et al., 2012). Zur Wahrung einer kurativen Chance bei diesem jungen Patientenkollektiv empfiehlt sich eine intensivierete Nachsorge zur frühzeitigen Diagnose von Lymphknotenrezidiven. Eine orale Infektion mit HPV Serotyp 16 ist, unabhängig von Alkohol- und Tabakkonsum, mit einem massiv erhöhten Risiko (RR = 33,4, 95% CI 13,3-84,8) für Oropharynxkarzinome assoziiert (D'Souza et al., 2007). Eine virale Onkogenese gilt als gesichert. Dabei kommt es unter anderem zur Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine p53 und pRb durch die viralen Proteine E6 sowie E7 (Leemans et al., 2011; Thomas et al., 1999; von Knebel Doeberitz et al., 1994).

In einer Metaanalyse wurde bei 21,95% der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome HPV DNA nachgewiesen, dabei war es in 86,69% dieser Fälle der HPV Serotyp 16 (Dayyani et al., 2010). Jedoch sind auch andere HPV Hochrisikotypen (18, 31, 33, 35, 39, 45, 52) mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen assoziiert (Kreimer et al., 2005). Mittlerweile werden die HPV-positiven Karzinome bei jungen Patienten als eigene Tumorentität angesehen, was sich auch in der neuen TNM Klassifikation wiederfindet (Gillison, 2004).

Immundefizienz ist ein weiterer Risikofaktor, welcher insbesondere in Bezug auf HIV-positive, sowie aufgrund einer Organtransplantation iatrogen immunsupprimierte Patienten relevant ist. Eine Metastudie kommt zu dem Ergebnis, dass HIV-positive Patienten ein um das 2,32-fache (95% CI: 1,65-3,25) erhöhtes Risiko haben ein Karzinom der Mundhöhle oder des Pharynx zu entwickeln. Für Patienten nach Organtransplantation liegt der Wert bei dem 3,23-fachen (95% CI: 2,40-4,35) (Grulich et al., 2007). Roithmaier et al. kommen in einer 2007 veröffentlichten Single-Center-Studie mit einem relativen Risiko von

21,0 für die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren bei Transplantationspatienten auf deutlich höhere Werte (Roithmaier et al., 2007).

## 1.4 Molekularpathologie

Zur Entstehung eines malignen Tumors sind eine Reihe von Abweichungen von einer gesunden Zelle notwendig. Weinberg und Hanahan teilen diese Veränderungen in „Hallmarks of Cancer: The Next Generation“ in zwei Kategorien auf. Zum einen die schon länger bekannten und anerkannten „six Hallmarks of Cancer“, zum anderen stellen sie vier weitere „Emerging Hallmarks“ vor.

Die Vermeidung des Zelltods, die Aufrechterhaltung von Wachstumssignalen, die Vermeidung von Wachstumsinhibitoren, die Induktion von Angiogenese und die Fähigkeit zur unbegrenzten Zellteilung sowie Invasion und Metastasierung wurden bereits im Jahr 2000 von Weinberg und Hanahan beschrieben.

Diese Veränderungen gelten ebenfalls als Grundvoraussetzung für die Entstehung von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen. Während sich die ursprünglich beschriebenen Kriterien allein auf die Tumorzellen beziehen, spielt bei den „Emerging Hallmarks“ die Interaktion mit den umliegenden Geweben eine wichtige Rolle. Die „Emerging Hallmarks“ sind: das Ausweichen der Kontrolle durch das Immunsystem, die genetische Instabilität, die Deregulation des Zellstoffwechsels und die Induktion einer tumorfördernden Entzündung (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

Durch welche Veränderungen der zellulären Signalwege diese „Hallmarks of Cancer“ bei Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen erfüllt werden, wurde in den letzten Jahren zunehmend bekannt. Diese Veränderungen erfolgen in mehreren Schritten, auch „multi-step progression“ genannt, welche den Verlust von Tumorsuppressorgenen und die Überexpression von Onkogenen beinhaltet (Califano et al., 1996). Das histologische Korrelat dieser Tumorentstehung sind Tumorstadien wie Leukoplakien, intraepitheliale Neoplasien und das Carcinoma in situ.

Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome sind häufig von präkanzerös veränderter Schleimhaut umgeben. Diese Feldkanzerisierung wurde bereits 1953 erstmals von Slaughter et al. beschrieben. Sie begünstigt eine hohe Rate an Lokalrezidiven und kann zur Entstehung von voneinander unabhängigen Karzinomen innerhalb eines Schleimhautbereichs führen (Slaughter et al., 1953). Diese Feldkanzerisierung beruht laut van Houten et al. auf der Veränderung einer mukosalen Stammzelle, welche unter anderem durch die Mutation des Tumorsuppressorgens p53 proliferiert und dadurch ein Areal veränderter Zellen innerhalb der gesunden Schleimhaut bildet. Innerhalb dieses Areals erwerben die veränderten Zellen weitere Mutationen, bis schließlich eine dieser Zellen alle zur Entstehung eines malignen Tumors nötigen Eigenschaften erworben hat (van Houten et al., 2002). Für HPV-positive Tumore haben Leemans et al. ein Modell der molekularen Pathogenese veröffentlicht (Leemans et al., 2011).

Wichtige Treibermutationen sind die Veränderung des p53 und des Retinoblastom-Protein-Signalwegs zum Erwerb der Fähigkeit der unbegrenzten Zellteilung, die Veränderung des EGFR und des TGF- $\beta$  Signalwegs zur Aufrechterhaltung von Wachstumssignalen, die Veränderung des VEGFR Signalwegs zur Induktion der Angiogenese und die Veränderung des PI3K–PTEN–AKT Signalweges zur Vermeidung des Zelltods. Zum Erwerb der Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung spielt die epithelial-mesenchymale Transition eine wichtige Rolle (Leemans et al., 2011).

Durch welche molekularen Mechanismen dieses Ausweichen der Kontrolle des Immunsystems und die Induktion einer tumorfördernden Entzündung ermöglicht werden und von welcher Relevanz dabei das den Tumor umgebende Gewebe ist, ist derzeit nicht ausreichend bekannt und wird intensiv erforscht.

## 1.5 Therapie

Die Therapie von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen erfolgt durch eine, oder eine Kombination, der folgenden Optionen: chirurgische Therapie, Strahlentherapie, Chemotherapie, Antikörpertherapie sowie begleitende Supportivtherapie. Die Auswahl der Therapie richtet sich hierbei insbesondere nach dem Ergebnis des Stagings und damit der Stadieneinteilung. Des Weiteren

entscheidend sind Alter, Allgemeinzustand, Komorbiditäten und die individuellen Bedürfnisse des Patienten.

Im UICC Stadium I und II sind die chirurgische Therapie und die Radiotherapie hinsichtlich des onkologischen Behandlungsergebnisses weitgehend gleichwertig (Mendenhall et al., 2006). Bei Patienten, deren Allgemeinzustand eine chirurgische Intervention zulässt, wird in der Regel eine Operation in kurativer Intention angestrebt (Network, 2017). Von großer Relevanz ist dabei das Erreichen einer onkologischen Resektion mit mikroskopisch tumorfreien Rändern im OP-Resektat (R0).

Zusätzlich zur Entfernung des Primärtumors wird, je nach Ausdehnung des Primarius und Bildung der Halslymphknoten eine Neck-Dissection durchgeführt, bei welcher Lymphknoten entfernt werden. Sind klinisch bereits Lymphknotenmetastasen bekannt, so spricht man hierbei von einer kurativen Neck-Dissection. Ohne bekannte Lymphknotenmetastasen dient die elektive Neck-Dissection dem Staging des Tumorleidens.

Die Entscheidung über das Ausmaß der Resektion stellt dabei stets eine Abwägung zwischen onkologischem und funktionellem Ergebnis dar. Dabei wird zwischen einer radikalen, einer funktionellen und einer selektiven Neck-Dissection unterschieden.

Die radikale Neck-Dissection schließt neben der Entfernung aller Lymphgefäße die Resektion von Muskeln (u.a. M. Sternocleidomastoideus) Nerven (u.a. N. Accessorius) und Blutgefäßen (u.a. V. Jugularis interna) mit ein. Da dies mit einer wesentlichen Morbidität verbunden ist, wird diese OP-Technik nur angewandt, wenn mehrere Lymphknoten größer als drei Zentimeter oder Lymphknoten mit Fixation oder Infiltration einer der oben genannten Strukturen vorliegen (J. Beck-Mannagetta, 2011).

Bei der funktionellen Neck-Dissection werden Muskeln, der N. Accessorius und die V. Jugularis interna geschont. Eine selektive Neck-Dissection beschreibt die Ausräumung einzelner Lymphknotenlevel im Rahmen einer elektiven Neck-Dissection. Da die Hierarchie des Lymphabflusses in Abhängigkeit von der Lage des Primarius bekannt ist, wird auf die Entfernung der nachfolgenden Lymphknoten verzichtet, unter der Voraussetzung, dass die entfernten Lymphknoten tumorfrei sind. So kann ein funktionell besseres Ergebnis erzielt werden.

Bei nicht operablen Patienten wird in frühen Stadien (T1-2, N0-1) eine normofraktionierte intensitätsmodulierte Radiotherapie bis zu einer Dosis von 66-70Gy, falls möglich mit paralleler Chemotherapie, durchgeführt (Stromberger, 2019).

Patienten im lokal fortgeschrittenen Stadium profitieren von einem multimodalen Vorgehen. Bei operablen Patienten sollte eine OP mit adjuvanter Radiotherapie erfolgen (Cooper et al., 2012; Mishra et al., 1996). Bei erhöhtem Risiko für ein Lokalrezidiv wird eine adjuvante Radiochemotherapie bevorzugt (Bernier et al., 2004; Seiwert & Cohen, 2005).

Die postoperative Radio- und Radiochemotherapie kann mikroskopische Metastasen und Tumorresiduen abtöten und reduziert somit das große Risiko für Lokalrezidive, welches jene Patienten haben. Die adjuvante Therapie sollte innerhalb von sechs Wochen nach OP erfolgen. Das Therapieschema beinhaltet üblicherweise eine Dosis von 54-66 Gy in Einzeldosen von zwei Gy, welche mittels intensitätsmodulierter Radiotherapie (IMRT) appliziert wird (Awwad et al., 2002; Blanchard et al., 2016). Bei Patienten mit Risikofaktoren, wie knappen Resektionsrändern (R1) oder kapselüberschreitendem Wachstum der Lymphknotenmetastasen (ECE +) wird im Rahmen der adjuvanten Radiochemotherapie eine Kombination aus 5-Fluorouracil und Cisplatin angewandt (Fietkau et al., 2006; Jacobs et al., 1992).

Als Alternative für nicht operable Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumoren erreicht eine definitive Radio- oder Radiochemotherapie ähnliche Kontroll- und Überlebensraten (Mendenhall et al., 2006). Sind keine Kontraindikationen gegen eine parallele Chemotherapie vorhanden, erfolgt in der Regel eine bimodale Therapie. Die Abwägung zwischen alleiniger Radiotherapie und Radiochemotherapie erfolgt individuell. Bei der definitiven Radiochemotherapie kommen entweder platinbasierte Chemotherapeutika oder, bei Kontraindikationen für diese, Cetuximab als Radioimmuntherapie zum Einsatz (Bonner et al., 2010; Mehanna et al., 2019). Die Therapie erfolgt in der Regel mit einer Dosis von 70 Gy in zwei Gray Einzeldosen, kombiniert mit einer Dosis von 100 mg/m<sup>2</sup> Cisplatin alle drei Wochen (Tag 1, 22 und 43). Alternativ kann

wöchentlich 40 mg/m<sup>2</sup> Cisplatin verabreicht werden (Chan et al., 2005). Die wöchentliche Gabe geht mit weniger Nebenwirkungen einher als die Bolusgabe (Szturz et al., 2017). Eine alleinige Radiotherapie erfolgt in der Regel ebenfalls normofraktioniert mit einer Dosierung von 66 – 70 Gy (Bourhis et al., 2012; Stromberger, 2019).

Liegen bei Erstdiagnose bereits Fernmetastasen vor, erfolgt eine palliative Systemtherapie. Auch bei Metastasierung nach initialer Therapie sowie bei inkurablen Lokalrezidiven ist die palliative Systemtherapie indiziert.

Diese erfolgt mittels eines einzelnen Medikaments oder einer Kombination der folgenden Medikamentengruppen: konventioneller zytotoxischer Chemotherapie, PD-L1 Immuncheckpoint-Inhibitoren und zielgerichteten Antikörpern, insbesondere EGFR-Inhibitoren.

Konventionelle zytotoxische Chemotherapie, insbesondere die platinbasierten Chemotherapeutika Cisplatin und Carboplatin, waren über viele Jahre die Erstlinientherapie bei primär metastasierten oder rezidivierenden Kopf-Hals-Tumorerkrankungen (Petrelli et al., 2014). Seit der Einführung von EGFR-Inhibitoren wird häufig eine Kombination aus EGFR-Inhibitor und platinbasiertem Chemotherapeutikum angewendet. So hat die Kombination von Cisplatin mit Cetuximab bei Patienten im metastasierten Stadium einen Vorteil im progressionsfreien Überleben (Burtneß et al., 2005; Vermorken et al., 2008).

Als weitere Option in der palliativen Therapie stehen Immuncheckpoint-Inhibitoren zur Verfügung. So kann Pembrolizumab bei positivem PD-L1 Status und Nivolumab bei Progress oder Rezidiv nach platinbasierter Chemotherapie unabhängig vom PD-L1 Status eingesetzt werden.

## 1.6 Zielgerichtete Krebstherapie und Krebsimmuntherapie

Der Erkenntnisgewinn durch die Erforschung der molekularen Mechanismen der Tumorentstehung und Metastasierung führt zu zahlreichen neuen Angriffspunkten für Tumorthapeutika. Da diese Medikamente spezifisch an jenen Stellen der zellulären Signalkaskade angreifen, an denen sich Tumorzellen von normalen Zellen unterscheiden, werden sie als zielgerichtete Krebstherapie

bezeichnet. Die Bezeichnung leitet sich aus dem englischen Begriff „targeted therapies“ ab.

Diese Medikamente lassen sich folgendermaßen unterteilen. Erstens: Antikörper, welche Rezeptoren an der Zelloberfläche erkennen. Diese enden auf -mab, was für „Monoclonal Antibody“ steht.

Zweitens: kleine Moleküle, welche darauf abzielen eine spezifische zelluläre Signalkaskade zu inhibieren. Sie werden in der Regel als „Small Molecules“ bezeichnet und enden auf -mib oder -nib.

Die Fortschritte in der Erforschung der Immunonkologie haben zu einer Vielzahl an neuen Therapieoptionen geführt. Hierbei gibt es folgende Ansätze: Krebsimpfstoffe, zelluläre Immuntherapie, onkolytische Viren, Zytokintherapien und insbesondere Immuncheckpoint-Inhibitoren.

Im Jahr 2006 wurde der EGRF Antikörper Cetuximab erstmals zur Behandlung im fernmetastasierten Stadium zugelassen. 2008 wurde er in Kombination mit Cisplatin oder Carboplatin und 5-Fluorouracil als Erstlinientherapie etabliert. Dadurch konnte ein signifikanter Überlebensvorteil erreicht werden (Bonner et al., 2006; Vermorken et al., 2008). Der Wirkmechanismus basiert darauf, dass der EGRF Rezeptor bei über 90% der Tumore überexprimiert ist und dem Tumor durch die Blockade dieses Signalweges ein wichtiges Wachstumssignal entzogen wird.

Jedoch kann sich die EGFR Signalkaskade durch Mutationen so verändern, dass sich die Aktivierung nicht durch eine Blockade des EGF-Rezeptors verhindern lässt. So können sich Resistenzen gegen Cetuximab bilden und es muss auf einen anderen Angriffspunkt ausgewichen werden (Rebucci et al., 2011).

Bei Krebsimpfstoffen gibt es zum einen prophylaktische Impfungen gegen onkogene Viren. In Bezug auf Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome ist hierbei die Impfung gegen HP-Viren sehr vielversprechend (Berkhof, 2018). Zum anderen gibt es den Ansatz einer therapeutischen Impfung, bei welcher dendritische Zellen so modifiziert werden, dass sie tumorspezifische Antigene präsentieren. Diese stimulieren *in vivo* die Bildung und Expansion von antitumorösen CD8 positiven T-Zellen (Palucka & Banchereau, 2013).

Bei zellulären Immuntherapien werden dem Patienten antitumoröse T-Zellen verabreicht. Die T-Zellen können entweder *ex vivo* verändert und spezifisch auf Tumorantigene abgerichtet werden, diese werden als Chimeric Antigen Receptor T-Cells (CAR-T-Zellen) bezeichnet. Oder es werden patienteneigene T-Zellen aus dem Tumor isoliert, die sogenannten tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs), *ex vivo* expandiert und dann wieder dem Patienten zugeführt (Busch et al., 2016).

Onkolytische Viren sind modifizierte Viren, welche durch vorrangige Infektion von Tumorzellen, durch Immunstimulation oder durch das Einschleusen von spezifischen Genen ihre antitumoröse Wirkung entfalten. Im Jahr 2005 wurde das erste onkolytische Virus Oncorine in China zugelassen. Durch das Einschleusen von Wildtyp p53 DNA zielt es darauf ab in den Tumorzellen Apoptose auszulösen, welche bis dahin durch eine Mutation des zelleigenen p53 verhindert wurde. Die Zulassung erfolgte für Karzinome des Nasopharynx (Liang, 2018).

In einer Phase III Studie konnte die Kombination aus Cisplatin-basierter Chemotherapie und dem onkolytischen Virus ein höheres Ansprechen im Vergleich zur Standardchemotherapie erzielen (78,8% vs. 39,6%,  $p < 0,001$ ). Während derzeit mehrere Phase III Studien mit verschiedenen onkolytischen Viren laufen, findet dieses Verfahren keine Anwendung im klinischen Alltag (Bach et al., 2013; Liang, 2018; Russell et al., 2012; Xia et al., 2004).

Zytokintherapien stimulieren unspezifisch das Immunsystem und rufen so eine, ebenfalls unspezifische, Immunantwort hervor. Diese Immunantwort kann dazu führen, dass der Tumor, welcher bis dahin dem Immunsystem ausweichen konnte, angegriffen wird. Angewandt wird beispielsweise das Zytokin IL-2, welches die T-Zell Population zugunsten von zytotoxischen und zum Nachteil von regulatorischen T-Zellen stimuliert. Das Wirkprinzip ist ähnlich der Bacille Calmette-Guérin (BCG) Instillation bei Blasenkarzinomen (Atkins, 2006; McDermott & Atkins, 2004).

Insbesondere die Entwicklung und klinische Anwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren haben in den letzten Jahren eine Vielzahl an neuen Therapieoptionen eröffnet.

Immuncheckpoint-Inhibitoren haben aktuell von allen Krebsimmuntherapien das breiteste Anwendungsgebiet. Als Immuncheckpoint werden bestimmte Rezeptoren auf der Oberfläche von Lymphozyten bezeichnet, deren Aktivierung eine Suppression der Immunantwort bewirken kann. Diese sind notwendig, um körpereigene Zellen vor dem Immunsystem zu schützen und so Autoimmunreaktionen zu verhindern. Durch die Expression entsprechender Liganden der Immuncheckpoints machen sich Tumorzellen diesen Mechanismus zu Nutze, um sich der Immunantwort zu entziehen. Werden diese Immuncheckpoints durch monoklonale Antikörper inhibiert, so kann eine zuvor unterdrückte Immunantwort hervorgerufen werden. Da diese Immunantwort jedoch nicht nur auf den Tumor begrenzt ist, gehören Autoimmunreaktionen, wie eine Enterocolitis, Hepatitis oder Pneumonitis zu häufigen Nebenwirkungen dieser Therapien.

Seit der Zulassung von PD-L1 und PD-1 Checkpoint Inhibitoren für die Behandlung des metastasierten Melanoms wurden sie für viele weitere Anwendungsgebiete erprobt und konnten dabei positive Ergebnisse vorweisen. So wurde der PD-1 Antikörper Nivolumab und später der PD-1 Antikörper Pembrolizumab in das Repertoire der Standardtherapeutika von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen aufgenommen. Nivolumab verbesserte das Gesamtüberleben von Patienten, welche einen Progress oder ein Rezidiv hatten, nachdem sie eine platinbasierte Chemotherapie erhalten haben, im Vergleich zur bisherigen Standardtherapie von 5,1 (95% CI 4.0 - 6.0) Monaten auf 7,5 (95% CI 5.5 - 9.1) Monate (Ferris et al., 2016).

Kurz darauf folgte die Zulassung von Pembrolizumab. Laut der KEYNOTE-048 Studie bietet die zusätzliche Gabe von Pembrolizumab einen Vorteil gegenüber der bisherigen Standardtherapie mit Cetuximab, Cisplatin und 5- Fluorouracil, wenn die Auswertung einer Biopsie einen PD-L1 CPS > 1 ergibt (Burtness et al., 2019). Der PD-L1 combined positive score ist ein Maß für die Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen, Makrophagen und Lymphozyten sowie weiterer Zellen der Tumormikroumgebung in einer Probebiopsie. Er kann als prädiktiver Biomarker eine Rolle in der Auswahl individualisierter Therapien für den einzelnen Patienten spielen.

Jedoch gibt es auch bei diesen PD-1 Immuncheckpoint-Inhibitoren eine gewisse Rate an Resistenzen, sodass weitere Immuncheckpoint-Inhibitoren in klinischen Studien erprobt werden. So laufen aktuell Studien zu Ipilimumab und

Tremelimumab (CTLA-4 Antikörper), sowie zu Durvalumab (PD-L1 Antikörper) (Antonia et al., 2017; Jenkins et al., 2018; Marin-Acevedo et al., 2018; Moskovitz et al., 2018). Außerdem ist weitere Forschung notwendig, um die Mechanismen der Resistenzbildung besser zu verstehen.

## 1.7 Tumorimmunologie

Das Immunsystem spielt eine zentrale Rolle in der Verhinderung und Bekämpfung von Tumoren. Es hat die Fähigkeit veränderte Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Dabei werden nicht nur Zellen erkannt, welche sich aus aufgrund einer infektiösen Ursache verändert haben und beispielsweise ein virales Protein exprimieren, sondern auch Zellen, die aufgrund von Schäden in ihrem Erbgut verändert sind. So gibt es mit dem Immunsystem, zusätzlich zur zellinternen Kontrolle des Zellzyklus durch Tumorsuppressorgene, eine weitere Kontrollinstanz, welche die Entstehung von malignen Zellen verhindern kann. Diese Funktion des Immunsystems und ihre Mechanismen wurden bereits durch den Immunologen und Nobelpreisträger Sir F. M. Burnet Mitte des letzten Jahrhunderts erforscht (Burnet, 1957).

Wie Tumore dieser Kontrolle ausweichen, ist seither eine zentrale Frage der Tumorimmunologie (Gorer, 1956). Für die Entdeckung der Rezeptoren CTLA-4 und PD-1, ihrer Rolle bei der Tumor-Immunevasion und für die Beschreibung der Möglichkeit sich die Hemmung dieser Rezeptoren therapeutisch zu Nutze zu machen, erhielten 2018 James P. Allison und Tasuku Honjo den Nobelpreis für Medizin und Physiologie (Iwai et al., 2002; Leach et al., 1996).

Tumorzellen können vom Immunsystem auf zwei Arten erkannt werden. Erstens durch tumorassoziierte Antigene. Das sind Moleküle an der Zelloberfläche, welche sowohl auf Tumorzellen als auch auf gesunden Zellen vorkommen. Auf Tumorzellen kommt es zu einer starken Überexpression dieser Antigene (Graziano & Finn, 2005).

Zweitens durch tumorspezifische Antigene, also durch Moleküle, welche ausschließlich auf Tumorzellen und nicht auf normalen Zellen zu finden sind (Vigneron, 2015).

Eine Subgruppe der Tumorantigene, die besonders für Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome relevant ist, beinhaltet die Proteine onkogener Viren. Die antiapoptotischen Genprodukte von E6 und E7 des humanen Papillomavirus sind prominente Vertreter viraler Tumorantigene (Zumbach et al., 2000).

Das Prinzip der kontinuierlichen Überwachung der Körperzellen wird im englischen als „Immunosurveillance“ bezeichnet. Wird eine aberrante Zelle erkannt, gibt es folgende Möglichkeiten:

- Tumorelimination: Die Zerstörung der Zelle, hierdurch ist die Gefahr der Bildung eines Tumors ausgeräumt.
- Tumorkontrolle: Die Kontrolle der aberranten Zellen durch das Immunsystem, so kann sich ein okkultes Karzinom bilden, welches zunächst keine gesundheitliche Relevanz hat, sich jedoch durch Veränderung des Tumors oder des Immunsystems zu einem manifesten malignen Tumor transformieren kann (Koebel et al., 2007).
- Tumorevasion: Der Tumor ist so verändert, dass er nicht mehr durch das Immunsystem kontrolliert werden kann und damit ungehindert proliferieren kann (Dunn et al., 2004). Hierbei gibt es sowohl Mechanismen, bei denen sich die Tumorzellen selbst verändern, um dem Immunsystem auszuweichen, als auch Mechanismen, bei welchen das Immunsystem durch den Tumor supprimiert wird.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen der Tumorevasion. Dazu zählt unter anderem eine Verringerung der Expression von MHC-Proteinen oder eine vermehrte Expression von Immuncheckpoint-Rezeptorliganden. Außerdem modifizieren Tumore das Immunsystem und führen so zu einer lokalen, bei einigen Tumoren auch zu einer systemischen Immunsuppression (Rabinovich et al., 2007). Dies wird als Immunoediting bezeichnet (Dunn et al., 2002). Eine Art des Immunoeditings ist die Ausschüttung von Zytokinen durch Tumorzellen und durch Zellen der Tumormikroumgebung. Auf diese wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

## 1.8 Tumormikroumgebung

In einem Tumor und im unmittelbaren Umfeld finden sich neben Tumorzellen auch eine Reihe von nicht-malignen Zellen, welche ein spezielles Milieu schaffen. Dieses Milieu ermöglicht die Tumorentstehung und fördert das Tumorwachstum und die Metastasierung (Lorusso & Rüegg, 2008). Charakteristisch für dieses Milieu ist eine chronische Entzündung, Hypoxie und ein niedriger extrazellulärer pH-Wert (Estrella et al., 2013).

Wichtige nicht-maligne Zelltypen der Tumormikroumgebung sind adaptive Immunzellen, wie dendritische Zellen, T-Zellen und B-Zellen, welche als tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) bezeichnet werden, Und nicht-adaptive Immunzellen, wie Makrophagen und NK-Zellen (Whiteside, 2008a). Vom Tumor umprogrammierte Makrophagen werden Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) genannt. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie Lymphozyten-inhibierende Faktoren wie IL-10, Prostaglandine und reaktive Sauerstoffspezies sezernieren (Martinez et al., 2008). Myeloide Suppressorzellen sind Zellen der myeloischen Zelllinie, welche aus dem Knochenmark in den Tumor einwandern und dort insbesondere die Funktion der CD8+ T-Zellen einschränken (Kusmartsev et al., 2004).

Im Rahmen des oben beschriebenen Immunoeditings können sich in der Tumormikroumgebung die Gewichtungen bestimmter Immunzellphänotypen und deren Expressionsmuster verschieben. Hierbei kann es zu einer Verschiebung von pro-inflammatorischen, antitumorösen Subklassen hin zu regulatorischen und toleranzinduzierenden Expressionsmustern und Phänotypen kommen (Gajewski et al., 2013; Whiteside, 2014).

Zur Beurteilung der Immunlandschaft der Tumormikroumgebung sind bestimmte Immunzellsubklassen von NK-, T-, B-Zellen und deren exprimierten Proteine von besonderem Interesse. Diese lassen sich in eine regulatorische, toleranzinduzierende und somit tumorbegünstigende und in eine pro-inflammatorische und antitumoröse Gruppe unterteilen.

Regulatorisch oder toleranzinduzierend können folgende Subklassen wirken:

- CD25: CD25+ T-Zellen können unter anderem natürliche Killerzellen inhibieren (Ghiringhelli et al., 2005). Eine Blockade von CD25+ führt zu einer antitumorösen Immunaktivierung (Rech & Vonderheide, 2009).
- FoxP3: Der Expressionsfaktor FoxP3 definiert regulatorische T-Zellen (Kryczek et al., 2009). Sie stellen den wohl am besten erforschten toleranzinduzierenden Immunzelltyp dar (Beyer & Schultze, 2006; Curiel, 2008; Shevach, 2000).
- CTLA-4: Der Oberflächenrezeptor CTLA-4, beziehungsweise CD152 fungiert als Immuncheckpoint und kann so eine antitumoröse Immunantwort bremsen (Chambers et al., 1996). Antikörper gegen CTLA-4 finden bereits klinische Anwendung.
- CD38: Auch CD38+ T-Helferzellen wird ein immunsupprimierender Effekt bei malignen Erkrankungen zugeschrieben (Hu et al., 2017; Ye et al., 2011).
- CD103: Während die Expression von CD103 auf CD8+ TILs ein prognostisch günstiges Zeichen ist (Komdeur et al., 2017), haben CD103+ regulatorische T-Zellen eine inhibierende Wirkung auf T-Effektorzellen. Laut Anz et al. wird die Expression von CD103 auf regulatorischen Tumorzellen durch TGF-beta gefördert (Anz et al., 2011).
- HELIOS: Über den Transkriptionsfaktor HELIOS können induzierte regulatorische T-Zellen, also regulatorische T-Zellen, welche in der Peripherie zu regulatorischen T-Zellen transformiert wurden, von regulatorischen T-Zellen unterschieden werden, welche dem Thymus entstammen. Nur diese exprimieren diesen HELIOS (Thornton & Shevach, 2016).
- CD24, CD38: Für CD24+, CD38+ B-Zellen gibt es Hinweise, dass diese Zellen, ähnlich wie regulatorische T-Zellen, sowohl direkt als auch indirekt an der lokalen Immunsuppression der Tumormikroumgebung beteiligt sind (Flores-Borja et al., 2013; Gheybi et al., 2017).
- CD27: CD27 ist ein Rezeptor der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie. Der Rezeptor und der zugehörige Ligand (CD70) werden auf B- und auf T-Zellen exprimiert (Prasad et al., 1997). CD27 kommt gehäuft

auf B-Gedächtniszellen vor und kann CD8+ Zellen aktivieren (Agematsu et al., 2000; Borst et al., 2005).

- PD-1: Während das Vorkommen und die Funktion von PD-1 auf T-Zellen gut erforscht ist, gibt es weniger Erkenntnis zu der Funktion von PD-1 auf B-Zellen. Laut einigen Untersuchungen tragen B-Zellen mit erhöhter PD-1 Expression zu tumorfördernden Lokalbedingungen bei (Ren et al., 2016; Sun et al., 2019). Dies geschieht unter anderem durch die Produktion von immunregulatorischen Zytokinen wie IL-10 (Shalapour et al., 2015).

Dem gegenüber stehen pro-inflammatorische, antitumoröse Subklassen und Proteine:

- CD16: Die CD3-, CD16+ NK-Zellen definieren eine Subgruppe der NK-Zellen, welche sich durch ihr hohes zytotoxisches Potential auszeichnen. Dies geschieht sowohl direkt als auch antikörpervermittelt (Mandelboim et al., 1999; Yeap et al., 2016).
- CD161: CD161+ NK-Zellen definieren eine pro-inflammatorische Untergruppe der NK-Zellen (Kurioka et al., 2018). Eine Reduktion dieses Zellphänotyps kann zu einer Einschränkung der Zytotoxizität der NK-Zellen führen (Konjević et al., 2007). Es gibt Hinweise darauf, dass dieser Phänotyp von Tumoren supprimiert werden kann (Adithan et al., 2020).
- HOBIT: ZNF683/HOBIT ist ein Transkriptionsfaktor, der im Reifungsprozess von NK-Zellen hochreguliert ist (Post et al., 2017).
- HSP70: Das Hitzeschockprotein 70 wird vermehrt bei zellulärem Stress exprimiert (Mayer & Bukau, 2005). Es hat eine antiapoptotische Funktion und ist ein aktivierendes Signal für die Immunantwort, insbesondere bei Expression auf der Zelloberfläche (Ravagnan et al., 2001; Vega et al., 2008).
- Granulysin und Perforin: In der direkten Zytotoxizität von NK-Zellen spielen Perforin und Granulysin eine zentrale Rolle (Clayberger & Krensky, 2003). Dies trifft auch auf das Abtöten von Tumorzellen durch NK-Zellen zu (Brodbeck et al., 2014).
- Granzym B: Die Protease Granzym B ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil in der direkten Zytotoxizität von NK-Zellen. Jedoch gibt es

Hinweise darauf, dass Granzym B die Tumorevasion fördert, wenn es von T-Helferzellen exprimiert wird (Cao et al., 2007).

Neben den Immunzellen gibt es Karzinom-assoziierte Fibroblasten, diese haben sich aufgrund von Signalen des Tumors so verändert, dass sie das Tumorstadium durch die Sekretion von wachstums- und angiogenesefördernden Faktoren wie VEGF und PDGF begünstigen. Außerdem sezernieren sie „Transforming Growth Faktor beta“ (TGF- $\beta$ ), welcher eine Rolle bei der Induktion von regulatorischen T-Zellen spielt, die Proliferation von B-Zellen hemmt und aktivierte Makrophagen inaktivieren kann. So trägt das Zytokin wesentlich zur lokalen Immunsuppression zu Gunsten des Tumors bei (Blobe et al., 2000; Li & Flavell, 2008). Des Weiteren fördert TGF- $\beta$  die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) und trägt somit zur Metastasierung, Resistenzbildung gegenüber Chemotherapeutika und zur Begünstigung von Rezidiven bei (Thiery et al., 2009).

Ein weiterer nicht-maligner Zelltyp der Tumormikroumgebung sind mesenchymale Stammzellen, welche physiologisch insbesondere im Knochenmark und im Fettgewebe vorkommen, jedoch vermehrt in Tumoren gefunden werden. Diese Zellen haben das Potential durch ihre Interaktion mit dem Tumor, das Wachstum, die immunologische Tumorevasion und die Metastasierung zu fördern (Kansy et al., 2014; Ridge et al., 2017).

## 1.9 Mesenchymale Fettgewebstammzellen

Als mesenchymale Stammzellen werden jene adulten Stammzellen bezeichnet, die aus embryonalem Bindegewebe, dem Mesenchym, stammen (Murphy et al., 2013). Die International Society of Cellular Therapy hat eine Reihe von Kriterien definiert, welche Zellen erfüllen müssen, um als mesenchymale Stammzellen zu gelten.

Die Kriterien nach Domici et al. sind folgende:

- Plastikadhärentes Wachstum unter normalen Zellkulturbedingungen
- Expression der Oberflächenrezeptoren CD73, CD90, CD105

- Keine Expression der Oberflächenrezeptoren CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 $\alpha$  und HLA-DR
- Differenzierungspotential in Adipozyten, Osteoblasten und Chondroblasten

(Dominici et al., 2006)

Während man davon ausgeht, dass mesenchymale Stammzellen in sämtlichem durchblutetem Gewebe existieren, wurden sie bisher bei Erwachsenen aus Knochenmark (Friedenstein et al., 1976), dem peripheren Blut (Cao et al., 2005), der Lunge (Griffiths et al., 2005), dem Herz (Beltrami et al., 2003), der Zahnpulpa (Ma et al., 2014), der Synovialmembran (De Bari et al., 2001) und aus Fettgewebe isoliert (Fraser et al., 2006).

Bei Neugeborenen gibt es weitere Quellen von mesenchymalen Stammzellen: Nabelschnurblut (Kern et al., 2006) und Plazenta (Zhang et al., 2004).

Eine besonders reichhaltige Quelle von mesenchymalen Stammzellen bei Erwachsenen stellt die perivaskuläre Fraktion des Fettgewebes dar (Wong et al., 2015). Diese werden im Englischen als adipose-derived stem cells (ASC) bezeichnet. Im Deutschen ist die Nomenklatur uneinheitlich und die Begriffe adipogene Stammzelle, adipöse mesenchymale Stammzelle, mesenchymale Fettgewebstammzelle oder mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe bezeichnen die gleiche Art von Zellen. In dieser Arbeit wird der Begriff mesenchymale Fettgewebstammzelle oder die Abkürzung ASC verwendet.

Aus dieser Quelle lassen sich leicht große Mengen von Stammzellen gewinnen, da das Fettgewebe ein leicht zugängliches Gewebe darstellt und ohne relevante Morbidität Gewebe entnommen werden kann. Auch das Anlegen von Primärkulturen ist mit einfachen Mitteln zuverlässig möglich (Zuk et al., 2001). Aufgrund dessen, sowie aufgrund ihres hohen Proliferations- und Differenzierungspotentials, werden sie gegenüber anderen adulten Stammzellen vorrangig erforscht, insbesondere für die Verwendung in der regenerativen Medizin (Satish et al., 2015; Strioga et al., 2012).

In der Orthopädie wird die Verwendung mesenchymaler Stammzellen zur Verbesserung der Knochenheilung bei Frakturen oder Osteonekrosen erforscht. Bereits angewandt werden sie für den Wiederaufbau von Knorpel (Murphy et al.,

2013). Auch die *in vitro* Herstellung von Knochentransplantaten wird erprobt, bisher jedoch ohne Erfolg in der klinischen Routineanwendung (Feisst et al., 2015).

Mesenchymale Stammzellen kommen in Bereichen von verletztem Gewebe vermehrt vor und unterstützen unter anderem die Wundheilung durch Förderung der Angiogenese (Wong et al., 2015). Es gibt verschiedenen Ansätze, welche darauf abzielen diese Eigenschaft der mesenchymalen Fettgewebstammzellen zu nutzen.

Zum einen geht man davon aus, dass ein großer Teil des Nutzens von Eigenfetttransplantationen bei der Behandlung von OP- und bestrahlungsbedingten Defekten auf die darin enthaltenen Stammzellen zurückzuführen ist (Phulpin et al., 2009). Zum anderen gibt es den Ansatz, Eigenfettgewebe zu verwenden, welches mit mesenchymalen Fettgewebstammzellen angereichert wurde (Bielli et al., 2015), oder es werden gezielt Stammzellen isoliert und verwendet (Pennick, 2017).

Des Weiteren haben ASCs anti-inflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften, welche in der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen von Nutzen sein könnten (Feisst et al., 2015). Diese Eigenschaften werden durch die Sekretion folgender Zytokine vermittelt:

Tabelle 5: Von ASCs sekretierte Zytokine und deren Effekte

Zytokin	Zielzellen	Effekt
IL-6	Dendritische Zellen, Makrophagen, Neutrophile Zellen, T-Zellen	
IL-8	Dendritische Zellen, Neutrophile Zellen, Endothelzellen	Angiogenese↑, Sauerstoff Radikale↑, IL-10↑
IL-10	T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, dendritische Zellen, NK-Zellen	Tregs↑, TNFα ↓, NK-Aktivität↓, B-Zell-Aktivität↑,
VEGF	Unspezifisch	Angiogenese

SDF-1	Dendritische Zellen, Tumorzellen, B-Zellen	IL10↑, Metastasierung↑, B- Zell-Aktivität↑
HGF	Epithelzellen, Endothelzellen, NK-Zellen	Wundheilung↑, Zellproliferation↑, NK- Zell-Aktivität↓
FGF-2	Fibroblasten	Wundheilung↑, Proliferation↑
PDGF-β	Mesenchymale Stammzellen, Endothelzellen	Migration↑, Invasion↑, Angiogenese↑, Proliferation↑
TGF- β	T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Tumorzellen	Tregs↑, B-Zell- Aktivität↓, NK- Zellaktivität ↓, Tumor- EMT↑

(Akdis et al., 2000; Brat et al., 2005; Gehmert et al., 2010; Ghiringhelli et al., 2005; Li et al., 2003; Murphy et al., 2013; Rajarathnam et al., 1994; TAMURA et al., 1998)

Welchen Einfluss diese immunmodulatorischen Eigenschaften innerhalb der Tumormikroumgebung auf Tumorzellen haben, ist zum einen deswegen eine relevante Fragestellung, da mesenchymale Stammzellen vermehrt in der Tumormikroumgebung vorkommen und sie zum anderen in der Rekonstruktion von Defekten nach Tumorresektion Anwendung finden (Liotta et al., 2015).

Bezüglich der Frage, ob ASCs einen tumorfördernden oder einen tumorinhibierenden Einfluss innerhalb der Tumormikroumgebung haben, gibt es einige Untersuchungen, die jedoch häufig zu widersprüchlichen Ergebnissen kommen. Einen tumorfördernden Effekt wird der Eigenschaft dieser Zellen zugeschrieben die Angiogenese zu fördern. Auch gibt es eine Reihe von Publikationen, welche eine direkte Förderung des Tumorwachstums durch ASCs *in vivo* zeigen.

Eine Förderung des Wachstums von Brustkrebs durch Zytokine zeigten Antoine et al. (Antoine et al., 2007), sowie Mühlberg et al. (Muehlberg et al., 2009).

Eine auf pro-angiogenetischen Effekten basierende Wachstumsförderung von Prostatatumoren legen Prantl et al. in ihrem Paper dar (Prantl et al., 2010).

Einen ähnlichen Mechanismus der Tumorförderung schlagen Yu et al. für Lungentumore und Gliome vor (Yu et al., 2008). Eine antiapoptotische Wirkung der ASCs auf Kolonkarzinomzellen berichten Shinagawa et al. (Shinagawa et al., 2010).

Ein Großteil dieser Experimente wurde im Maus-Modell mittels Co-Injektion von Tumorzellen und mesenchymalen Fettgewebstammzellen durchgeführt. Des Weiteren gibt es Untersuchungen, welche zu dem Urteil kommen, dass mesenchymale Stammzellen das Tumorwachstum *in vitro* fördern. Am besten untersucht ist dies für Brustkrebs (Trivanović et al., 2014; Zimmerlin et al., 2010).

Eine lokal immunsuppressive Wirkung von ASCs als tumorfördernder Effekt beschreiben Razmkhah et al. für Brustkrebs und Djouad et al. für Melanome (Djouad et al., 2003; Razmkhah et al., 2011). Bei Co-Kultivierung mit mesenchymalen Stammzellen haben eine Reihe von Autoren ein verstärktes Migrations- und Invasionsverhalten der Tumorzellen nachweisen können (Dirat et al., 2011; Orecchioni et al., 2013; Zhao et al., 2012).

In einigen Publikationen wurde der Einfluss von mesenchymalen Stammzellen auf Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome untersucht. So beschreiben Danan et al. eine Tumorzell-wachstumsfördernde Wirkung *in vitro* (Danan et al., 2018). Neben der Sekretion von wachstumsfördernden Zytokinen wird eine, durch Exosomen vermittelte, tumorfördernde Wirkung für nasopharyngeale Karzinome beschrieben (Shi et al., 2016).

Die Untersuchungen von Liotta et al. mit mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks legen eine immunsuppressive Wirkung durch eine Inhibierung der T-Zellproliferation nahe. Darüber hinaus gibt es Forschungsergebnisse, die Hinweise darauf geben, dass mesenchymale Fettgewebstammzellen die Invasion und Migration und somit das Risiko für Metastasierung und Lokalrezidive erhöhen. Rowan et al. konnten eine erhöhte Rate an Mikrometastasen im Hirn von Mäusen nachweisen, wenn zusätzlich zu der

HNSCC Zelllinie CAL-27 mesenchymale Stammzellen injiziert wurden (Rowan et al., 2016).

Dem gegenüber steht Literatur, welche zu dem Urteil kommt, dass mesenchymale Fettgewebstammzellen antitumoröse Wirkung haben. So beschreiben Sun et al. eine geringere Tumorgröße und eine Reduktion der Metastasierung bei Co-Injektion von ASCs mit Brustkrebszellen im Mausmodell (Sun et al., 2009). Dies steht im Gegensatz zu den eben beschriebenen Publikationen.

Entgegen den meisten Quellen beschreiben Otsu et al. einen Angiogeneese hemmenden Effekt, wenn mesenchymale Stammzellen, in diesem Fall aus Knochenmark isoliert, in höheren Konzentrationen zusammen mit Melanomzellen co-kultiviert wurden. Sie stützen zwar die gut untersuchte These, dass mesenchymale Stammzellen Wachstumsfaktoren und pro-angiogenetische Faktoren ausschütten, beschreiben jedoch, dass mesenchymale Stammzellen Apoptose bei Endothelzellen induzieren können (Otsu et al., 2009). Eine direkten pro-apoptischen Effekt von mesenchymalen Fettgewebstammzellen auf Pankreastumorzellen *in vitro* und *in vivo* zeigten Cousin et al. (Cousin et al., 2009). Eine lokale Stimulation des Immunsystems, beziehungsweise eine Erhöhung der Zahl von tumorinfiltrierenden Immunzellen, welche zu eine Reduktion der Tumorgöße führt, beschreiben Khakhoo et al.. Sie co-injizierten mesenchymale Stammzellen mit Karposisarkomzellen in Mäuse (Khakhoo et al., 2006).

Kurze RNA-Abschnitte, sogenannte microRNA, dienen der Zell-Zell Interaktion. Lee et al. beschreiben, dass mesenchymale Stammzellen spezielle microRNAs synthetisieren, welche das Wachstum und die Migration von Gliomzellen inhibieren (Lee et al., 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Untersuchungsergebnisse über die Effekte und Mechanismen der Interaktion zwischen Tumorzellen und mesenchymalen Stammzellen sehr heterogen und nicht abschließend geklärt sind.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Das Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom ist weiterhin eine Erkrankung mit einer sehr eingeschränkten Prognose und hohen Rezidivraten. Um auch in Zukunft weiterhin die Therapiemöglichkeiten verbessern zu können, ist es nötig die biologischen Grundlagen dieser Erkrankung besser zu verstehen. In den letzten Jahren rückte immer weiter in den Vordergrund, dass das nötige Verständnis der Tumorbiologie nicht auf die Tumorzellen beschränkt ist, sondern eine Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen betrachtet werden muss, welche die Tumormikroumgebung formen. Einer dieser Zelltypen sind mesenchymale Stammzellen.

Aufgrund ihrer großen Zahl, ihrer therapeutischen Anwendung und der engen räumlichen Beziehung zu den meisten Tumoren, sowie dem gehäuften Vorkommen innerhalb von Tumoren kommt der Erforschung von mesenchymalen Fettgewebstammzellen hierbei eine herausragende Rolle zu (Kidd et al., 2012; Liotta et al., 2015). Nach heutigem Stand scheinen tumorfördernde Effekte von mesenchymalen Stammzellen zu überwiegen, wenn man Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome betrachtet.

Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob mesenchymale Fettgewebstammzellen die Migration *in vitro* fördern und somit die Metastasierung und das Auftreten von Lokalrezidiven begünstigen.

Des Weiteren soll die Frage geklärt werden, ob Tumore die Migration von mesenchymalen Fettgewebstammzellen fördern und sich dadurch vermehrt ASCs in der Tumormikroumgebung anreichern könnten.

Eine zentrale Rolle innerhalb der Tumormikroumgebung kommt außerdem den Immunzellen zu. Diese verfügen, je nach Differenzierung, zum einen über hochpotente Mechanismen, um Tumorzellen abzutöten, zum anderen können sie durch Immunmodulation innerhalb der Tumormikroumgebung die Tumorprogression fördern.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, eine Antwort darauf zu finden ob Tumorzellen, mesenchymale Fettgewebstammzellen oder Tumorzellen gemeinsam mit mesenchymalen Fettgewebstammzellen Immunzellen zugunsten einer tumor-fördernder Differenzierung beeinflussen. Sollte dies der Fall sein gilt es zu klären über welche Zytokine dies geschieht.

### 3 Material

#### 3.1 Zelllinien

Es wurden zwei etablierte menschliche HNSCC Zelllinien verwendet. CAL-27 wurde über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH des Leibniz-Instituts in Braunschweig bezogen. UD-SCC-2 ist eine primär etablierte Zelllinie aus dem Universitätsklinikum Düsseldorf und wurde von Professor Henning Bier der Arbeitsgruppe überlassen.

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien

<b>Name</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>HPV Status</b>
<b>CAL-27</b>	Zunge, gering differenziert	56	m	negativ
<b>UD-SCC-2</b>	Hypopharynx, gering differenziert	58	m	positiv

Es wurden folgende Primärkulturen von mesenchymalen Fettgewebstammzellen angelegt:

Tabelle 7: ASC Primärkulturen

<b>Name</b>	<b>Alter</b>	<b>Tumor</b>	<b>BMI</b>	<b>Geschlecht</b>
<b>MTU-ASC-T10</b>	59	Hypopharynxkarzinom	18,3	m
<b>MTU-ASC-N10</b>	61	Benigne Raumforderung	28,2	m

### 3.2 Reagenzien

Es wurden folgende Reagenzien für die Zellkultur verwendet:

Tabelle 8: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
DMEM (1x) + GlutaMax™	gibeco® by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
RPMI	gibeco® by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Serum-free Mesenchymal Stem Cell Medium enhanced	PELOBIOTECH GmbH, Planegg/Martinsried, Deutschland
Supplements for Serum-free Mesenchymal Stem Cell Medium enhanced	PELOBIOTECH GmbH, Planegg/Martinsried, Deutschland
Penicillin 10.000 U/ml / Streptomycin 10.000 µg/ml	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Anti-Anti	
TrypLE™ Express (1X) Stable Trypsin Replacement Enzyme (+) Phenol Red	gibeco® by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
L-Glutamin 200mM	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
DPBS (1x) (-)CaCl <sub>2</sub> (-)MgCl <sub>2</sub>	gibeco® by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Fetal Bovine Serum	
Minimum Essential Medium Non-Essential-Aminoacids (100X)	gibeco® by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
HBSS (1X)	gibeco® by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
DMSO Dimethylsulfoxid ≥99,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamine® 2000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
eGFP-Plasmid Stock 2 µg / ml	Invitrogen AG

	Karlsbad, Kalifornien, USA
Gibco Opti-MEM®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
SYTO™ 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
SYTO™ 59 Red Fluorescent Nucleic Acid Stain	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

Es wurden folgende Verbrauchsmaterialien in der Zellkultur verwendet:

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
CELLSTAR® Serologische Pipetten, steril, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschale CELLSTAR® 10 cm	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschale CELLSTAR® 6-well, 12-well, 24-well	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cell Strainer, 100 µm	Corning Inc, Corning, New York, USA
50ml Reaktionsgefäß	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
15 ml Reaktionsgefäß CELLSTAR® TUBES	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipetten Filterspitzen mit Aerosolbarriere 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Injekt® Solo 20 ml Spritze	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Spritzen-Filter 0,22 µm	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

Mikro-Schraubröhrchen 2ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 2ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Cellometer™ Zählkammer SD100	Nexcelom Bioscience LLC, Massachusetts, USA
Glas Pasteur Pipetten	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Culture-Inserts 2 Well für Migrationsversuche	ibidi GmbH, Planegg/Martinsried, Deutschland
Falcon™ Cell Strainers 40µm	Corning Inc, Corning, New York, USA
BD Horizon™ Fixable Viability Stain 510	Becton, Dickinson and Company, San Jose, Kalifornien, USA
Alexa Fluor® 647 anti-human FOXP3 Antikörper, Lot #: B205584	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Alexa Fluor® 647 Mouse IgG1, Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B241547	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Alexa Fluor® 700 anti-human CD4 Antikörper, Lot #: B226779	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Alexa Fluor® 700 anti-human IgM Antikörper, Lot #: B221598	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
APC anti-mouse/human Helios Antikörper, Lot #: B222386	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
APC IgG Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B222386	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
APC/Cy7 anti-human CD3 Antikörper, Lot #: B248854	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
APC/Cy7 Mouse IgG2a Isotyp- Kontrollantikörper, Lot #: B248854	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 421 anti-human CD25 Antikörper, Lot #: B249792	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA

Brilliant Violet™ 605 anti-human CD127 Antikörper, Lot #: B236295	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 650 anti-human CD38 Antikörper, Lot #: B251935	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 650 Mouse IgG2b Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B242660	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 711 anti-human CD103 Antikörper, Lot #: B232507	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 711 anti-human CD20 Antikörper, Lot #: B217800	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 711 Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B254001	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
FITC anti-human CD39 Antikörper, Lot #: B222084	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
FITC Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B206036	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE anti-human IL-10 Antikörper, Lot #: B244023	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE Rat IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B237564	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE/Cy7 anti-human CD152 (CTLA-4) Antikörper, Lot #: B211491	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE/Cy7 anti-human IgD Antikörper, Lot #: B248261	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE/Cy7 Mouse IgG2a Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B245995	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE/Dazzle anti-human CD24 Antikörper, Lot #: B225400	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE/Dazzle anti-human IL-10 Antikörper, Lot #: B224146	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE/Dazzle Mouse IgG2a Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B248544	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA

PE/Dazzle Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B243509	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PerCP anti-human CD27 Antikörper, Lot #: B203776	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PerCP anti-human CD3 Antikörper, Lot #: B239295	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PerCP Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B226117	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Alexa Fluor® 488 anti-Hsp70 Antikörper, Lot #: B203498	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Alexa Fluor® 488 Mouse IgG2a Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B222204	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Alexa Fluor® 700 anti-human CD90 Antikörper, Lot #: B249723	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Alexa Fluor® 700 Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B243479	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
APC anti-human CD73 Antikörper, Lot #: B218129	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
APC Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B243042	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
APC/Cy7 anti-human CD45 Antikörper, Lot #: B252248	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
APC/Cy7 Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B248431	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 421 anti-human CD4 Antikörper, Lot #: B244366	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 421 Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B243838	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 510 anti-human HLA-DR Antikörper, Lot #: B243447	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA

Brilliant Violet™ 510 Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B233387	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 510 Mouse IgG2a Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B227376	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 605 anti-human CD279 (PD-1) Antikörper, Lot #: B231873	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 605 Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B245195	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 650 anti-human CD56 Antikörper, Lot #: B233637	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 650 Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B233637	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 711 anti-human Perforin Antikörper, Lot #: B251360	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 711 Mouse IgG2b Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B251360	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
FITC anti-human CD19 Antikörper, Lot #: B209254	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
FITC Mouse IgG1 Isotyp- Kontrollantikörper, Lot #: B199152	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Pacific Blue™ anti-human/mouse Granzyme B Antikörper, Lot #: B236892	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Pacific Blue™ Mouse IgG1 Isotyp- Kontrollantikörper, Lot #: B229538	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE anti-human CD105 Antikörper, Lot #: B234473	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE anti-human Granulysin Antikörper, Lot #: B242699	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA

PE Mouse IgG1 FC Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B244595	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE Mouse IgG1 ICFC Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B244868	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE/Cy7 anti-human CD161 Antikörper, Lot #: B240551	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE/Cy7 Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B243398	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD335 Antikörper, Lot #: B202900	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PE/Dazzle™ 594 Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B248942	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PerCP anti-human CD3 Antikörper, Lot #: B239295	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PerCP Mouse IgG2a Isotyp-Kontrollantikörper, Lot #: B227488	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PerCP/Cy5.5 anti-human CD8 Antikörper, Lot #: B238359	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
PerCP/Cy5.5 Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper Lot #: B245786	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ 605 anti-human CD8 Antikörper, Lot #: B242755	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Brilliant Violet™ anti-human CD8 Antikörper, Lot #: B242755	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
eBioscience™ PE anti-human FoxP3 Antikörper Lot #: PCH101	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set Lot #: 1972691	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Alexa Fluor® 647 anti-human HOBIT/ZNF683 Antikörper Lot #: 566250	Becton, Dickinson and Company, San Jose, Kalifornien, USA

Human TruStain FcX™ FC-Rezeptorblock	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
LEGENDplex™ Custom Human 11-plex Panel Kit Lot #: B292449	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Human IL-6 Capture Beads A5, 13X	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Human INF-γ Capture Beads A6, 13X	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Human CCL2 (MCP-1) Capture Beads A8, 13X	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Human IL-8 Capture Beads B2, 13X	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Human IL-22 Capture Beads B9, 13X	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Human EGF Capture Beads A7, 13X	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Human PD-1 Capture Beads B5, 13X	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Human VEGF Capture Beads B6, 13X	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Human CCL20 (Mip-3a) Capture Beads A4, 13X	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Human SDF-1 Capture Beads B4, 13X	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Human Free active TGF- β Capture Beads A3, 13X	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA

### 3.4 Laborgeräte

Es wurden folgende Laborgeräte verwendet:

Tabelle 10: Laborgeräte

<b>Laborgerät</b>	<b>Hersteller</b>
Eppendorf Research plus Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Sterilbank HeraSafe KS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Brutschrank HeraCell 150i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Zellzähler	
Zentrifuge, Rotina 380R	Hettich LAB Technology, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad TW8	JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland
Wasserbad Typ 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Vortex Genie 2™	Auer Bittmann Soulié AG, Dietikon, Schweiz
Stickstoff Freezer LS4800	Taylor-Wharton International LLC
Kleinzentrifuge PerfectSpin Mini	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Zellzähler Cellometer™ Auto T4	Nexcelom Bioscience LLC, Massachusetts, USA
Mikroskop Leica DMI6000 B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskopkamera Leica DFC425 C	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lionheart™ FX Automatisiertes Mikroskop	BioTek Germany, Bad Friedrichshall, Deutschland

Nalgene® Mr. Frosty™ 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
LSR Fortessa Cell Analyzer	Becton, Dickinson and Company, San Jose, California, USA
Bestrahlungsgerät Gulmay Medical LTD RS225 X-Ray Box	Gulmay Medical LTD, Camberley, Surrey, England

### 3.5 Software

Es wurde folgende Software verwendet:

Tabelle 11: Software

<b>Software</b>	<b>Firma</b>
BD FACSDiva	Becton, Dickinson and Company, San Jose, California, USA
BioTek Gen4 data analysis software	BioTek Germany, Bad Friedrichshall, Deutschland
EndNote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
Flow-Jo Version 10	Becton, Dickinson and Company, San Jose, California, USA
GIMP Version 2.9 (GNU Image Manipulation Program)	Free Software Foundation, Inc., Boston, Massachusetts, USA
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, LLC, San Diego, California, USA
LEGENDplex Data Analysis Software Suite	BioLegend, Inc. San Diego, Kalifornien, USA
Leica Application Suite	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microsoft 365	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Software Cellometer Auto T4	VWR International, LLC, Radnor, Pennsylvania, USA

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultur

Die Zellkulturen wurden im Brutschrank unter Standardbedingungen bei 37°C und bei 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zellkulturarbeiten wurden unter einer HeraSafe Sterilbank durchgeführt. Diese wurde vor Beginn und nach Ende der Arbeit mit 70% Ethanol wischdesinfiziert. Nach Ende der Arbeit wurde die Sterilbank zusätzlich jeweils 30 Minuten mit UV-Strahlung desinfiziert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage mit dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt.

Tabelle 12: Kulturbedingungen

Zelllinie	Medium	Zusätze
<b>CAL-27</b>	DMEM	10% FBS, 1% Penicillin / Streptomycin, 1% L-Glutamin
<b>UD-SCC-2</b>	RPMI	10% FBS, 1% Penicillin / Streptomycin, 1% L-Glutamin
<b>MTU-ASC</b>	Serum-free Mesenchymal Stem Cell Medium enhanced	1% AA
<b>MTU-SCC 1-10</b>	RPMI	10% FBS, 1% Penicillin / Streptomycin, 1% L-Glutamin, 1% Non-Essential-Aminoacids

#### 4.1.1 Auftauen der Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Reagenzröhrchen mit tiefgefrorenen Zellen wurden im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 4,5 ml vorgewärmtem Medium gegeben und mit einer Pipette durchmischt. Pro 10 cm Zellkulturschale wurden 7 ml Medium vorgelegt und dazu 3 ml der Zellsuspension gegeben. Es wurde auf eine homogene Verteilung der Zellen geachtet. Die Zellen wurden inkubiert und am nächsten Tag unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt und das Medium gewechselt.

#### 4.1.2 Mediumwechsel

Falls der Zellrasen in den Kulturschalen nach drei Tagen noch keine mindestens 80%ige Konfluenz erreicht hatte, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gespült und dann das neue Medium hinzugegeben.

#### 4.1.3 Subkultivierung

Wenn die Zellen eine 80%ige Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gespült. Dann wurde die Zellkulturschale nach Zugabe von ca. 1,5 ml TrypLE™ für fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Zum Ablösen der Zellen wurde 4,5 ml neues Medium hinzugegeben und die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden vereinzelt und in gewünschter Menge für Versuche verwendet, beziehungsweise weiter kultiviert. Dabei wurde immer so viel Medium in die neuen Zellkulturschalen vorgelegt, dass das Gesamtvolumen 10 ml beträgt.

Um für Versuche die Zellkonzentration der Suspension zu erhöhen, wurde bei den ASC Zelllinien zum Ablösen 0,5 ml TrypLE™ und 2,5 ml Medium verwendet.

#### 4.1.4 Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden wie für die Subkultivierung abgelöst, dann in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und bei 15.000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1,5 ml – 4,5 ml Einfriermedium (FBS mit 5% DMSO) vereinzelt und in 1,5 ml Reagenzröhrchen gefüllt. Diese wurden in einen Mr. Frosty™ Gefrierbehälter gegeben und unverzüglich in den - 80°C Gefrierschrank gestellt und über Nacht eingefroren. Zur Aufbewahrung wurden die Reagenzröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

#### 4.1.5 Bestimmung der Zellkonzentration

Um die Zellkonzentration in der Suspension zu bestimmen, wurden die Zellen durch mehrfaches, vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und 20 µl in die Cellometer™ Zählkammer SD100 gegeben. Diese wurden mithilfe des Cellometers™ Auto T4 ausgewertet. Jede Zellkonzentration wurde zweifach bestimmt und der Durchschnittswert verwendet.

#### 4.1.6 Gewinnen von konditioniertem Medium

Um konditioniertes Medium zu gewinnen, wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellkulturschale mit 5 ml PBS gespült und 10 ml neues Medium hinzugegeben. Hier wurde DMEM ohne weitere Zusätze für CAL-27 und RPMI ohne weitere Zusätze für UD-SCC-2 verwendet. Bei der Gewinnung von konditioniertem Medium von ASC wurde kein Mesenchymal Stem Cell Medium verwendet, da dies in Vorversuchen durch seine starken migrationsfördernden Eigenschaften aufgefallen war. Da diese durch unbekannte Inhaltsstoffe verursacht sind, ist das Medium für nachfolgende Versuche ungeeignet. Stattdessen wurde das Medium entsprechend der Zellen gewählt, auf die das konditionierte Medium später gegeben wurde, das heißt DMEM ohne weitere Zusätze für Versuche mit CAL-27 und RPMI ohne weitere Zusätze für UD-SCC-2.

Nach 48 Stunden wurde das Medium abpipettiert und mit einer 20 ml Spritze durch einen Spritzen-Filter (0,22 µm) gedrückt.

Das so gewonnene konditionierte Medium wurde entweder gleich verwendet oder in 2 ml Reaktionsgefäßen im -20°C Kühlschrank eingefroren.

Um konditioniertes Medium von bestrahlten Zellen zu gewinnen, wurde unmittelbar nach der Bestrahlung das alte Medium abgesaugt und dann, wie bei den unbestrahlten Zellen verfahren.

#### 4.1.7 3D Zellkultur

Um die räumliche Organisation realitätsnäher zu repräsentieren als in der Monolayer-Zellkultur, wurden Sphäroide von CAL-27 Monokulturen sowie von

ASC - CAL-27 Co-Kulturen hergestellt. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Zum einen das Magnetic Levitation Kit von n3D Biosciences. Diese Methode hat den Vorteil, dass sich größere Sphäroide herstellen lassen, jedoch ist die mikroskopische Beurteilung im Phasenkontrastmikroskop durch die metallischen Nanopartikel eingeschränkt und es ist keine Bestrahlung möglich, da bei der Bestrahlung durch die metallischen Partikel Sekundärelektronen entstehen. Dies führt zu lokalen Überdosierungen, sodass die Vergleichbarkeit der Bestrahlungsdosen nicht mehr gegeben wäre.

Zum anderen wurde das GravityPLUS™ und GravityTRAP™ Kit von InSphero verwendet. Die so erzeugten Sphäroide sind kleiner und fragiler als jene, die mit dem Magnetic Levitation Kit hergestellt wurde, jedoch frei von störenden Zusätzen.

Die Herstellung der Sphäroide mit dem Magnetic Levitation Kit erfolgte nach dem von William et al. publizierten Protokoll (William et al., 2013). Dazu wurden in das Medium der ausgewählten Zellen 400 µl NanoShuttle pro Zellkulturschale gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen, an welchen nun die Nanopartikel gebunden waren, mit 1,5 ml TrypLE abgelöst und die Zellkonzentration bestimmt. Dann wurden  $3,50 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in eine 96-Well Platte gegeben und auf die magnetische Bodenplatte, auf welcher sich 96 Neodym-Eisen-Bor Magnete befinden, gestellt.

Nach ungefähr 16 Stunden Inkubationszeit formten sich die gewünschten 3D Kulturen. Diese ließen sich ca. eine Woche kultivieren, bevor die Zellen die Nanopartikel abgaben und die 3D Kulturen zerfielen. Der Mediumwechsel erfolgte durch vorsichtiges Absaugen des alten Mediums aus der leicht gekippten 96-Well Platte bei angelegter magnetischer Bodenplatte. Dann wurde vorsichtig neues Medium hinzugegeben und darauf geachtet, dass die 3D Kultur nicht beschädigt wird.

Die Herstellung der Sphäroide mit dem GravityPLUS™ Kit erfolgte gemäß den Herstellerangaben von InSphero. Vorbereitend wurde ein Befeuchtungspad in PBS eingelegt und in die Bodenplatte gelegt. Dann wurden die Zellen mit 1,5 ml TrypLE abgelöst und die Zellkonzentration bestimmt. Die Zellsuspension wurde

so verdünnt, dass sich in 40  $\mu\text{l}$   $2,40 \times 10^4$  Zellen befanden ( $6 \times 10^5$  Zellen/ml). Die optimale Zellzahl wurde in einer Vorversuchsreihe ermittelt. Nun wurde mit einer Multikanalpipette jeweils 40  $\mu\text{l}$  in das GravityPLUS™ Kit gegeben, welche dabei einen Tropfen formten. Nun wurden das GravityPLUS™ Kit für drei Tage inkubiert und dabei regelmäßig kontrolliert, ob sich genügend Flüssigkeit in der Bodenplatte befindet und gegebenenfalls nachgefüllt. Dann wurden die Sphäroide durch langsames Hinzugeben von jeweils 70  $\mu\text{l}$  pro Well mit der Multikanalpipette in das GravityTRAP Kit gespült. Nun wurden die Sphäroide entweder weiter in dem GravityTRAP Kit gemäß den Herstellerangaben kultiviert oder mithilfe einer 1000  $\mu\text{l}$  Pipette in ein anderes Zellkulturgefäß überführt. Um sicherzustellen, dass sich die Sphäroide nicht am Rand der 24-Well Platten absetzen, wurden die Sphäroide in die für die Migrationsexperimente verwendeten 2-Well Culture-Inserts von Ibidi gesetzt. Diese wurden entfernt, sobald das Sphäroid adhärent wurde.

#### 4.1.8 Proliferationsanalysen

Um das Proliferationsverhalten der ASC und HNSCC Zelllinien zu untersuchen, wurden eine definierte Zellzahl pro Vertiefung in eine 6-Well Platte gegeben. Für jeden Auswertungszeitpunkt wurde eine Platte verwendet. Pro Auswertungszeitpunkt wurden zwei Vertiefungen mit der gleichen Zelllinie angesetzt. Zu den jeweiligen Auswertungszeitpunkten wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 ml 4%iger Formaldehydlösung zehn Minuten lang fixiert und dann mit 2 ml DPBS/0,1% Triton X-100 Lösung gespült. Die fixierten Zellen wurden mit 2 ml 0,004% Kristallviolett-Lösung 20 Minuten lang eingefärbt. Nach dreimaligem Spülen mit Aqua dest. wurden die Zellen mit 1% SDS-Lösung lysiert und auf dem Rüttler für eine Stunde durchgemischt. Pro Vertiefung der 6-Well Platte wurden drei Vertiefungen einer 96-Well Platte mit 100  $\mu\text{l}$  befüllt und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA).

## 4.2 Etablierung von Primärkulturen

### 4.2.1 Etablierung von mesenchymalen Fettgewebstammzell-Primärkulturen

Die Gewinnung der verwendeten Gewebe- und Patientenproben erfolgte nach Zustimmung der Ethikkommission der Technischen Universität München (Ethiknummern 5623/12 und 1420/05).

Die Kultivierung von ACSs erfolgte nach Protokollen von Zuk et al. und Church et al. (Church et al., 2014; Zuk et al., 2001). Die Biopsien von zervikalem Fettgewebe wurden unter sterilen Bedingungen mithilfe einer Pinzette, einer Schere und eines Skalpells in ca. 1-2 mm große Stücke zerkleinert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben. Pro Gramm Gewebe wurde 1 ml Verdauungslösung bestehend aus Kollagenase mit 1% FBS hinzugegeben und für eine Stunde im 37° C Wasserbad inkubiert. Dann wurde 5 ml DMEM mit 5% FCS hinzugegeben und das Reaktionsgefäß bei 2000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Serum-free Mesenchymal Stem Cell Medium resuspendiert und durch einen 40 µm Cell Strainer pipettiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in eine Zellkulturschale gegeben. Die daraus resultierenden ASCs entsprechen der Passage 0. Die Namensgebung MTU-ASC-T/N setzt sich zusammen aus: München Technische Universität, Adipose-derived Stem Cell und T für Zellen, die aus dem Fettgewebe eines Tumorpatienten stammen, sowie N für Zellen von nicht-Tumorpatienten. Um sicher zu gehen, dass es sich bei den gewonnenen Zellen um ASCs handelt, wurden bestimmte Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie analysiert und ihr Differenzierungspotential durch osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierung gezeigt.

### 4.2.2 Isolation von Immunzellen des peripheren Blutes

Durch Punktion einer peripheren Vene wurden CPT Röhren befüllt und nach spätestens 30 Minuten bei 3000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Innerhalb der nächsten 24 Stunden wurde der Überstand der CPT Röhren in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für zehn Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nun

wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und mit PBS auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Das Reaktionsgefäß wurde erneut für zehn Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml PBS resuspendiert und die Zellkonzentration mithilfe des Cellometers™ Auto T4 bestimmt. Die Zellen wurden je nach Experiment weiterverwendet.

## 4.3 Migrationsexperimente

### 4.3.1 Migrationsexperimente mit einer Zelllinie

Für alle Migrationsexperimente wurden die 2-Well Culture-Inserts für Migrationsversuche von Ibidi verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Mithilfe einer Pipette wurde jeweils ein Insert mittig in eine Vertiefung einer 24-Well Platte gesetzt und mit einer umgedrehten Pipettenspitze angedrückt. Um sicherzugehen, dass das Silikoninsert lückenlosen Kontakt mit dem Boden der 24-Well Platte hat, wurde die Platte umgedreht und die Kontaktfläche sorgsam inspiziert. Als Orientierungslinien für die späteren mikroskopischen Aufnahmen mit 10-facher Vergrößerung wurden zwei Linien pro Insert von unten auf den Boden der 24-Well Platte gezeichnet.

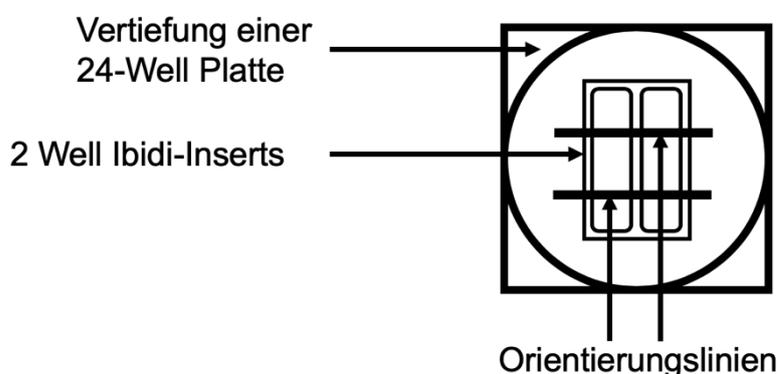


Abbildung 1: Versuchsaufbau Migrationsassays

Jeder Ansatz wurde doppelt durchgeführt und pro Insert wurden drei Aufnahmen gemacht, sodass man jeweils sechs Werte für die Migration erhielt.

Nun wurden die Zellen in die Vertiefungen der Inserts ausgesät. Die optimale Zellzahl für vollständige Konfluenz wurde in Vorversuchen für jede Zelllinie bestimmt.

Es ergaben sich folgende Zellzahlen:

Tabelle 13: Zellzahlen

Zelllinie	CAL-27	UD-SCC-2	ASC-T10	ASC-N10
Zellzahl	$4,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$

Es wurde jeweils auf ein Volumen von 70  $\mu$ l pro Vertiefung mit entsprechendem Medium aufgefüllt. Die Platte wurde für 24 Stunden inkubiert, dann wurden die Inserts mit einer Pinzette entfernt. Bei den HNSCC Zelllinien wurde jedes Well zweimal mit PBS gespült, um nicht adhärente Zellen zu entfernen. Bei den ASC-Zelllinien musste man auf diesen Schritt verzichten, da sich die Zellen beim Spülen ablösten. Als Nächstes wurde 500  $\mu$ l konditioniertes Medium hinzugegeben. Für die Kontrollen wurde Serum-freies Medium verwendet. Unmittelbar danach wurden Fotoaufnahmen mit dem Leica Mikroskop in zehnfacher Vergrößerung gemacht (Zeitpunkt 0h), welche nach 8h, 16h und 24h wiederholt wurden.

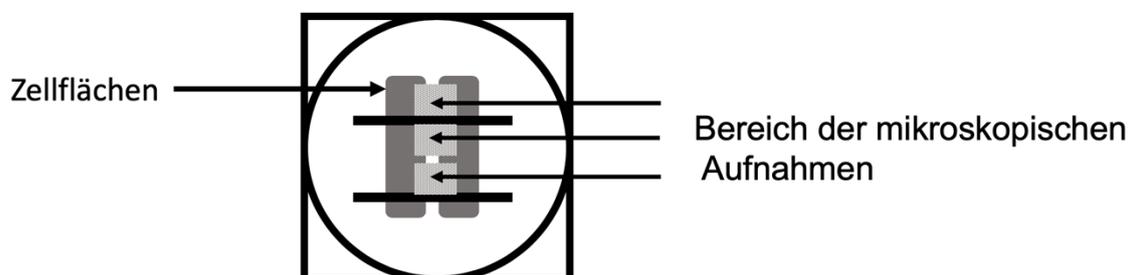


Abbildung 2: Fotoaufnahmen der Migrationsassays

#### 4.3.2 Migrationsexperimente mit zwei verschiedenen Zelllinien

Um die Interaktion zweier Zelllinien in Bezug auf die Migration zu untersuchen, wurden die zu untersuchenden Zelllinien in je eine Vertiefung der Inserts gesät,

sodass sich nach dem Entfernen der Inserts die beiden Zelllinien aufeinander zu bewegen. Dabei wurde Serum-freies Medium hinzugegeben.

Außerdem wurden Migrationsversuche mit Mischkulturen durchgeführt. Dazu wurden die beiden Zelllinien in definiertem Verhältnis gemischt, bevor sie in die Inserts pipettiert wurden.

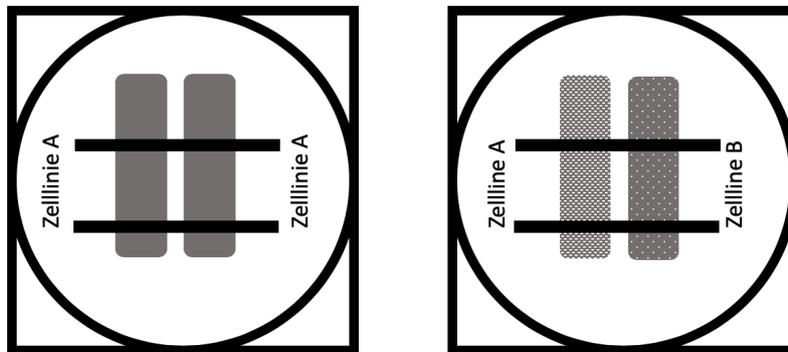


Abbildung 3: Migrationsassays in der Einzel- und Co-Kultur

Für die Auswertung der Migrationsexperimente wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten die zellfreie Fläche in GIMP Version 2.9 (GNU Image Manipulation Program) mit dem Tool freie Auswahl markiert und die Pixelanzahl im Histogramm bestimmt. So erhielt man für den jeweiligen Zeitraum eine Pixelanzahl ( $P_{0h}$ ,  $P_{8h}$ ,  $P_{16h}$ ,  $P_{24h}$ ) und die Pixelanzahl des gesamten Bildes ( $PB$ ). Damit wurde die Änderung der zellfreien Fläche in Prozent der Gesamtfläche berechnet:

$$A(\%) = \frac{(P_{xh} - P_{0h})}{PB} \times 100\%$$

#### 4.3.3 Fluoreszenzfärbungen

Um eine Unterscheidung der beiden Zelltypen zu vereinfachen, erfolgte eine Färbung der beiden Zelltypen mit unterschiedlichen Lebendfarbstoffen.

Zur Färbung der Zellen wurden die Nukleinsäuren-Farbstoffe SYTO 9 grün und SYTO 59 rot verwendet.

Die Farbstoffe wurden auf eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  in dem jeweiligen Standardmedium verdünnt und für 30 Minuten bei 37°C mit den Zellen im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gespült und für die weiteren Experimente verwendet.

Zur Optimierung erfolgten eine Reduktion der Farbstoffkonzentration auf bis zu 10 nM und eine Verlängerung der Inkubationszeit auf bis zu zwei Stunden.

Die Färbungen erfolgten in den Ibdi Silikoninserts.

Um eine über mehrere Passagen hinweg stabile Fluoreszenz zu erhalten, wurde die Zelllinie CAL-27 mit einem eGFP-Plasmid transfiziert. Die Transfektion erfolgte gemäß Protokoll mit dem invitrogen™ Lipofectamine® Kit.

Dabei wurden 70  $\mu\text{g}$  der eGFP Plasmid DNA mit 700  $\mu\text{l}$  Opti-MEM® verdünnt und anschließend zu dem Lipofectamine®-Mix hinzugegeben. Dieser bestand aus 100  $\mu\text{l}$  Lipofectamine® und 700  $\mu\text{l}$  Opti-MEM®. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wurde 5600  $\mu\text{l}$  Opti-MEM® hinzugegeben und schließlich 1 ml des Transfektionsgemischs pro Zellkulturschale verwendet und 24 h im Brutschrank inkubiert. Es folgte eine Antibiotikaselektion mit G418 Geneticin 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in DMEM. Zur Erhöhung des Anteils an fluoreszierenden Zellen erfolgte eine durchflusszytometrische Selektion von GFP positiven Zellen.

## 4.4 Durchflusszytometrie

### 4.4.1 Färben der Zellen

Es wurden folgende Reagenzien angesetzt:

- FC-Rezeptor Block Human TruStain FcX™ 1:20 verdünnt in PBS
- Fixable Viability Stain 1:1000 verdünnt in PBS
- Fixation/Permeabilization Konzentrat: 1:4 Verdünnung mit Fixation/Permeabilization Diluent
- FACS Puffer: PBS mit 10% FBS und 0,02% Natriumazid
- Permeabilization Buffer 1:9 Verdünnung mit Milipore H<sub>2</sub>O
- Oberflächenantikörper Färbungen 1:200 verdünnt in FACS-Puffer

- Intrazelluläre Antikörper Färbungen für Zytokine 1:100 in Permeabilization Buffer
- Intrazelluläre Antikörper Färbungen für Transkriptionsfaktoren 1:50 in Permeabilization Buffer

Die Konzentration der Zellsuspension wurde so eingestellt, dass sich in 100 µl die gewünschte Zellzahl für die Durchflusszytometrieanalyse befindet. Abhängig von den verfügbaren Zellen und der gewünschten Analyse waren das zwischen  $5,0 \times 10^4$  und  $1,0 \times 10^6$  Zellen.

Es wurden je 100 µl Zellsuspension in die Vertiefungen einer 96-Well Platte gegeben und die Platte bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde die Platte mit je 50 µl FC-Rezeptor Block 15 Minuten bei 4°C inkubiert und dann nach Zugabe von 200 µl PBS für fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Nun wurden alle Färbungen in je 50 µl der Fixable Viability Stain Lösung und die ungefärbten Proben in 50 µl PBS resuspendiert und bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 200 µl PBS und Zentrifugation für fünf Minuten bei 1200 rpm wurde der Überstand abermals verworfen. Danach wurden die zu färbenden Zellen in 50 µl Lösung der Oberflächenantikörper Färbungen resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Durch Zugeben von 200 µl PBS, Zentrifugation für fünf Minuten bei 1200 rpm und Verwerfen des Überstandes wurden die überschüssigen Antikörper ausgewaschen.

Um die Zellen für die intrazellulären Antikörper zu fixieren und zu permeabilisieren wurden die Zellen in 100 µl Fixation/Permeabilization resuspendiert und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugeben von 100 µl Permeabilization Buffer wurde die Platte bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die Platte nach Hinzugeben von 100 µl Permeabilization Buffer über Nacht lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wurde die Platte erneut für fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die intrazellulären Färbungen wurden die Zellen in je 50 µl der Antikörperlösung resuspendiert, bei den anderen Proben in 50 µl PBS und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach

wurde je 100 µl Permeabilization Buffer hinzugegeben und die Platte bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Schließlich wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und die durchflusszytometrischen Analysen durchgeführt.

Es wurden die folgenden drei Panels analysiert:

Tabelle 14: NK-Zell-Panel

<b>Art der Färbung</b>	<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>
<b>Oberfläche</b>	CD3	PerCP
	CD16/32	BV605
	CD45	APC-Cy7
	CD56	BV650
	CD161	PE
	CD335/NKp46	PE-Dazzle
	HSP-70	AF488
<b>Intrazellulär</b>	Granulysin	PE
	Granzyme B	Pacific Blue
	Perforin	BV711
<b>Transkriptionsfaktor</b>	HOBIT/ZNF683	AF647

Tabelle 15: B-Zell-Panel

<b>Art der Färbung</b>	<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>
<b>Oberfläche</b>	CD19	FITC
	CD20	BV711
	CD24	PE-Dazzle
	CD27	PerCP
	CD38	BV650
	CD45	APC-Cy7
	CD279/PD-1	BV605
	IgD	PE-Cy7

	IgM	AF700
<b>Intrazellulär</b>	IL-10	PE
	Granzyme B	Pacific Blue
<b>Transkriptionsfaktor</b>	FoxP3	AF647

Tabelle 16: T-Zell Panel

<b>Art der Färbung</b>	<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>
<b>Oberfläche</b>	CD3	APC-Cy7
	CD4	AF700
	CD8	PerCP-Cy5.5
	CD25	BV421
	CD39	FITC
	CD103	BV711
	CD127	BV605
	CD45RA	BV650
	CTLA-4	PE-Cy7
<b>Intrazellulär</b>	IL-10	PE
<b>Transkriptionsfaktor</b>	FoxP3	PE
	HELIOS	APC

Tabelle 17: ASC/PBMC-Panel

<b>Art der Färbung</b>	<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>
<b>Oberfläche</b>	CD3	PerCP
	CD4	BV421
	CD8	BV605

	CD19	FITC
	CD45	APC-Cy7
	CD56	BV650
	CD73	APC
	CD90	AF700
	CD105	PE
	HLA-DR	PE-Cy7

#### 4.4.2 Datenauswertung der Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Daten wurden mithilfe von Flow-Jo Version 10 (Becton, Dickinson and Company, San Jose, Kalifornien, USA) für MacOS ausgewertet. Die Platzierung der Gates erfolgte über „full stain minus one“ (FMO). Hierbei wurden die Zellen mit allen Markern, bis auf jenen, für welchen das Gate platziert werden sollte, eingefärbt. Das Gate wurde so platziert, dass in diesem Ansatz nahezu keine Events in dieses Gate fielen. Um eine Übertragung der so platzierten Gates auf alle Ansätze zu ermöglichen, wurde dieselbe Einstellung in FACS Diva für alle Experimente verwendet.

#### 4.5 Zytokinanalyse

Die Analyse der Zytokine der konditionierten Medien der Zellkultur erfolgte mittels dem Bead-based Multiplex-Immunoassay LegendPlex. Damit können bis zu dreizehn verschiedene Analyten in einer Probe nachgewiesen werden.

Als Proben wurden die Überstände aus der Zellkultur, das konditionierte Medium, wie oben beschrieben, vorbereitet. Der Assay wurde einmal mit unverdünntem Medium und mit 1:4 durch Assay-Puffer verdünntem Medium, jeweils in Doublets durchgeführt. Als erster Schritt wurden alle Materialien auf Raumtemperatur gebracht. Da es sich bei dem LegendPlex um ein individuell zusammengestelltes Panel handelte, wurden zunächst gemäß Herstelleranweisung die einzelnen

Analyse-Beads zu einem Mastermix vermischt und mit Assay-Puffer verdünnt. Der Wasch-Puffer wurde 1:19 mit demineralisiertem Wasser verdünnt. Zur Vorbereitung der Standards wurden die beiden Teile A und B des Standardmix mit jeweils 125 µl Assay-Puffer aufgelöst und miteinander vermischt. Diese unverdünnte Lösung diente als C7 Standard. Für die Standards C6 bis C1 wurde jeweils 25 µl des höheren Standards mit 75 µl Assay-Puffer vermischt, um die nächstniedrigere Standardkonzentration zu erhalten. Als C0 Standard wurde Assay-Puffer verwendet.

Dann wurden jeweils 25 µl Assay-Puffer in eine V-Bodenplatte gegeben. Des Weiteren wurden je 25 µl in Doublets für die Standards und die Proben in die Vertiefungen gegeben. Nach Zugabe von jeweils 25 µl des Mastermix wurde die Platte versiegelt und mittels Alufolie vor Licht geschützt für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Danach wurde die Platte bei 1050 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden dann mit 200 µl Waschpuffer für eine Minuten auf dem Schüttler gewaschen, danach erneut bei 1050 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde je 25 µl des Detektions-Antikörpers hinzugegeben und die Platte bei Raumtemperatur lichtgeschützt auf dem Schüttler inkubiert. Nach einer Stunde wurde je 25 µl des PE Streptavidins hinzugegeben und die Inkubation für weitere 30 Minuten fortgesetzt. Wie eben beschrieben wurden die Proben zentrifugiert, gewaschen und schließlich 150 µl Waschpuffer hinzugegeben. Danach waren die Proben bereit für die Analyse am Durchflusszytometer.

#### 4.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mithilfe von GraphPad Prism 9 durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde 5% ( $p < 0,05$ ) festgelegt. Als statistischer Test zum Vergleich zweier Mittelwerte wurde, unter Annahme einer Normalverteilung, der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. So erfolgte die Testung auf signifikante Unterschiede in dem Anteil bestimmter PBMC-Phänotypen in den FACS Experimenten. Beim Vorliegen von unterschiedlichen Varianzen innerhalb der einzelnen Stichproben wurde der Welch-Test verwendet. Dies erfolgte für die Migrationsexperimente und für den Vergleich der Zytokinkonzentrationen.

Der Einstichproben t-Test wurde verwendet, um zu prüfen, ob eine statistisch signifikante relative Veränderung ( $\neq 1$ ) des Anteils bestimmter PMBC-Phänotypen vorliegt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Proliferationsanalysen

Das Proliferationsverhalten einer Zelllinie ist ein wichtiges Grundcharakteristikum. Es bestimmt unter anderem über welchen Zeitraum man einen Scratch-Assay als Migrationsassay beobachten kann, bevor die Proliferation zu einer relevanten Störgröße in der Abnahme des zellfreien Spalts wird.

Die Analyse des Wachstumsverhalten der Tumorzelllinien CAL-27 und UD-SCC-2 ergab, dass die Zellen sich ca. 48 Stunden in einer „Lag-Phase“ befinden, bevor sie in die Phase des exponentiellen Wachstums kommen. CAL-27 Zellen sind größer und zeigen dementsprechend bei gleichen Zellzahlen deutlich früher ein konfluierendes Wachstum.

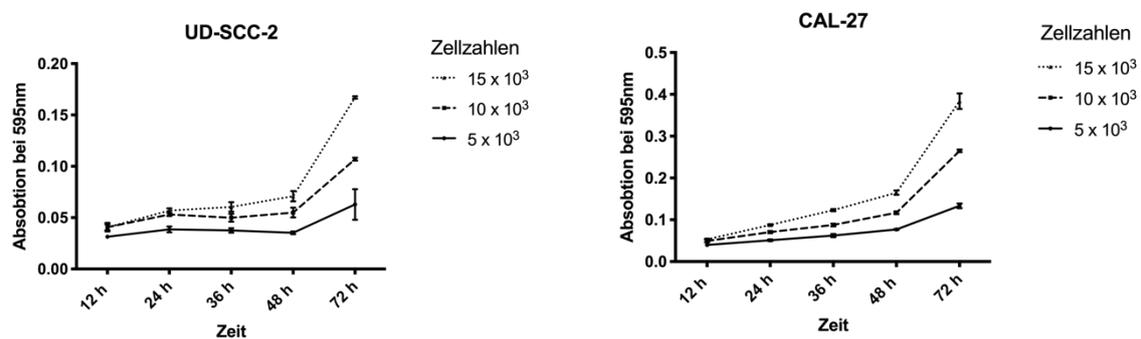


Abbildung 4: Proliferationsanalyse von UD-SCC2 und CAL-27 über 72 h

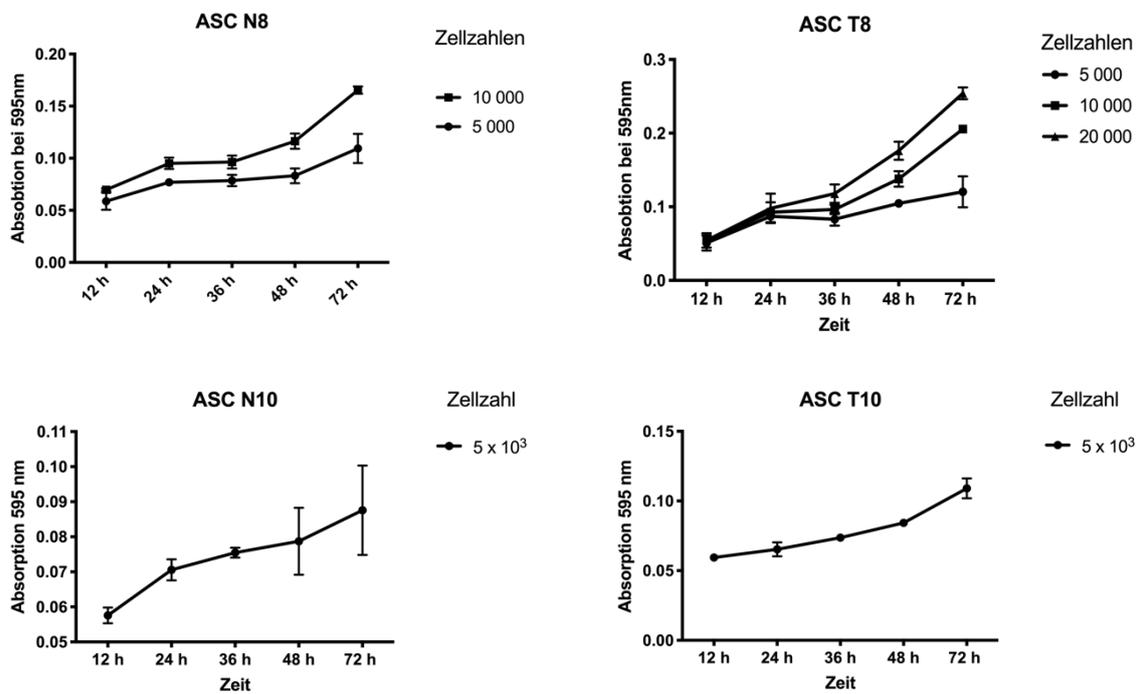


Abbildung 5: Proliferationsanalysen der ASCs über 72 h

Bei der Analyse des Proliferationsverhalten der mesenchymalen Fettgewebstammzellen fällt auf, dass das Zellvolumen von 12 auf 24 Stunden bereits deutlich zunimmt. Bei mikroskopischer Beobachtung zeigt sich, dass die ASCs zunächst adhären, dann Ausläufer bilden und an Zellgröße zulegen. Am ehesten ist diese Zunahme nicht auf eine Zunahme der Zellzahl zurückzuführen, sondern auf eine Zunahme der Größe der einzelnen Zellkörper. Bis ca. 48 Stunden werden Zell-Zellkontakte ausgebildet, danach beginnt die Proliferationsphase. Eine Inkubationszeit von 24 Stunden ist somit ausreichend, um von komplett adhären Zellen auszugehen. Eine Beobachtung im Migrationsassay bis 48 Stunden nach Aussaat der Zellen fällt noch nicht in die exponentielle Proliferationsphase, sodass bei einer Abnahme der zellfreien Fläche von Migrationseffekten und nicht Proliferationsseffekten ausgegangen werden kann.

## 5.2 Wachstumsmuster von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen und mesenchymalen Fettgewebstammzellen in der Mischkultur

In der Mischkultur von Tumorzellen und ASCs war für die möglichen Kombinationen aus ASC-T10, ASC-N10, UD-SCC-2 und CAL-27 stets ein sehr ähnliches Wachstumsmuster zu beobachten. Dabei bildeten sich Gruppierungen von Tumorzellen, welche von den langgestreckten Zellkörpern der ASCs umgeben waren.

Bei Kultivierung bis zu einer fast kompletten Konfluenz der Kulturschalenoberfläche bildeten sich teilweise dreidimensionale Zellaggregationen, wie in Abbildung 6, A2 am linken oberen Bildrand zu sehen ist. Bei einer Mischkultur über wenige Tage zeigten sich beide Zelllinien vital, sowohl bei Verwendung der Tumorzellmedien (DMEM für CAL-27 und RPMI für UD-SCC-2), als auch bei der Verwendung von mesenchymalem Stammzellmedium.

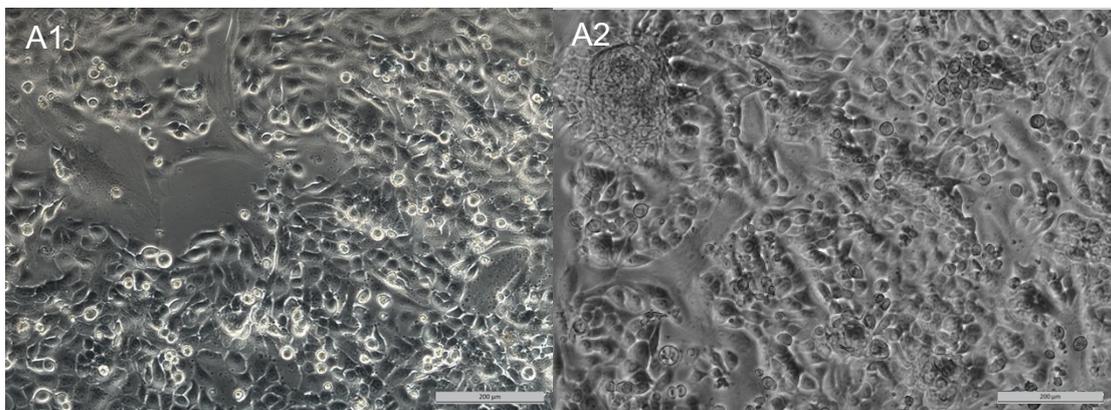


Abbildung 6: Wachstumsmuster Mischkultur

A1: CAL-27 in der Co-Kultur mit ASC-T10 bei ca. 80% Konfluenz

A2: UD-SCC-2 in der Co-Kultur mit ASC-N10 bei subtotaler Konfluenz, im oberen linken Bildbereich erkennt man eine kugelige Tumorzellaggregation

## 5.3 Migrationsanalysen

### 5.3.1 Migrationsanalysen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen

Um zu evaluieren, ob mesenchymale Fettgewebstammzellen die Migration von HNSCC Tumorzellen *in vitro* durch lösliche Faktoren beeinflussen, wurde der

Überstand der Kulturen von mesenchymalen Fettgewebstammzellen auf Tumorzellen gegeben und das Migrationsverhalten unter diesen Bedingungen mit dem Standardmedium verglichen.

Des Weiteren wurde getestet, inwiefern eine Bestrahlung (einmalig zwei Gray) der ASCs vor Gewinnung des konditionierten Mediums das Migrationsverhalten der Tumorzellen beeinflusst.

In der Vorbereitung der Experimente musste man zunächst ein geeignetes Standardmedium definieren, da die verschiedenen Zelllinien unter Normalbedingungen in unterschiedlichen Kulturmedien wachsen.

Zunächst wurde getestet, ob sich das Tumorzellmedium (DMEM für CAL-27 oder RPMI für UD-SCC-2) von dem Stammzellmedium (Serum-free Mesenchymal Stem Cell Medium enhanced, abgekürzt MSCM) unterscheidet.

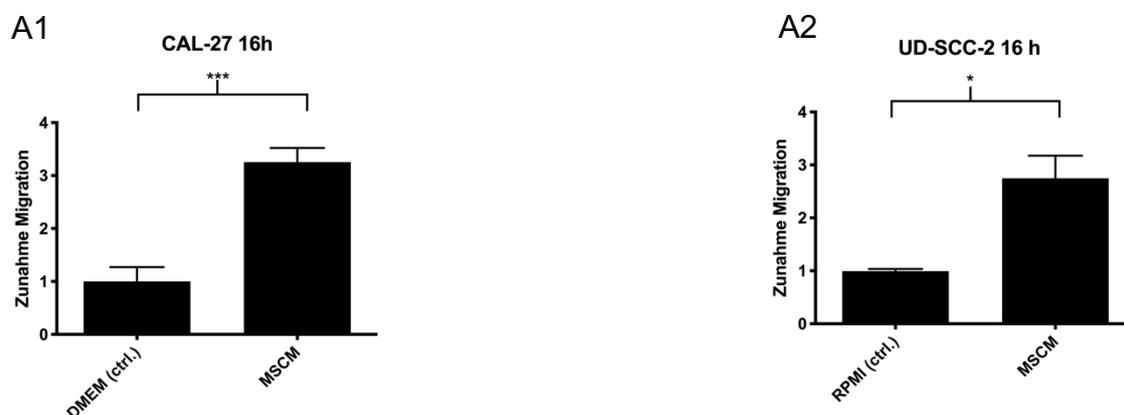


Abbildung 7: Migration unter MSCM

A1: CAL-27 im Insert und Zugaben von DMEM (FCS frei) bzw. MSCM, Aufnahmen nach 16 Stunden

A2: UD-SCC-2 im Insert, Zugabe von RPMI (FCS frei) bzw. MSCM, Aufnahmen nach 16 Stunden

Es zeigt sich, dass das Zellkulturmedium der mesenchymalen Fettgewebstammzellen (MSCM) die Migration in statistisch signifikantem Maße um etwa das dreifache gegenüber den Tumorzellmedien fördert. Daher ist das MSCM für die Gewinnung von konditioniertem Medium zum Einsatz in Migrationsexperimenten ungeeignet. Da der Hersteller keine detaillierte Auskunft

über die Zusammensetzung des Mediums gibt, kann nicht evaluiert werden, wodurch genau die Migration gefördert wird.

Um herauszufinden in welchem Maße FCS die Migration beeinflusst, und ob für die Folgeexperimente DMEM und RPMI mit 5% FCS verwendet werden kann oder auf FCS verzichtet werden muss, wurde eine FCS-Verdünnungsreihe durchgeführt. Im selben Experiment wurde versucht einen Teil der Ergebnisse zur bestrahlungsinduzierten Migration von Pickhard et al. im Insert, statt im Migrationsassay mit Pipetten-Scratch, zu reproduzieren (Pickhard et al., 2011).

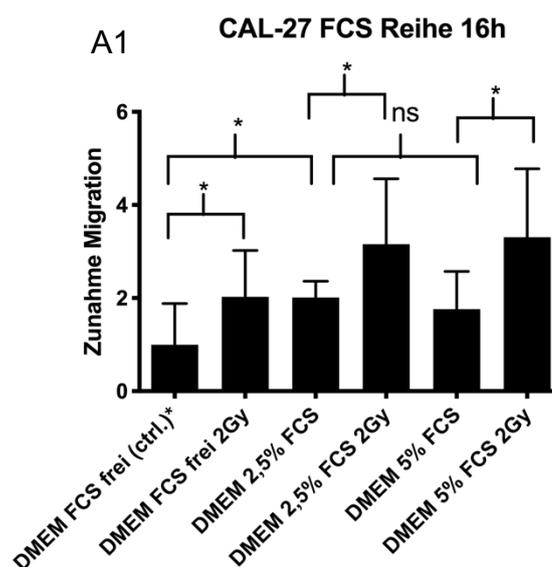


Abbildung 8: Migration CAL-27

A1: CAL-27 im Insert und Zugabe von DMEM mit FCS in unterschiedlichen Konzentrationen. Jeweils unbestrahlt und mit einer 2 Gy Bestrahlung vor Entfernung des Inserts. Aufnahmen nach 16 Stunden

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Migration bei Bestrahlung mit zwei Gray im Vergleich zu den unbestrahlten Ansätzen für alle drei FCS-Konzentrationen.

In Bezug auf die bestrahlungsinduzierte Migration entspricht dies dem in der Literatur vorbeschriebenem Ergebnis (Monchamont et al., 2014; Pickhard et al., 2011; Su et al., 2012). Da sich im FCS eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren befinden und die Zellen im FCS freien Ansatz signifikant weniger migrieren als mit FCS, wurde das FCS freie Tumorzellmedium bei den

folgenden Experimenten als Kontrolle und für die Gewinnung von konditionierten Medien genutzt, um eine mögliche Beeinflussung auszuschließen.

Im Folgenden sind die Migrationsanalysen der Tumorzelllinien mit den konditionierten Medien der mesenchymalen Fettgewebstammzellen dargestellt:

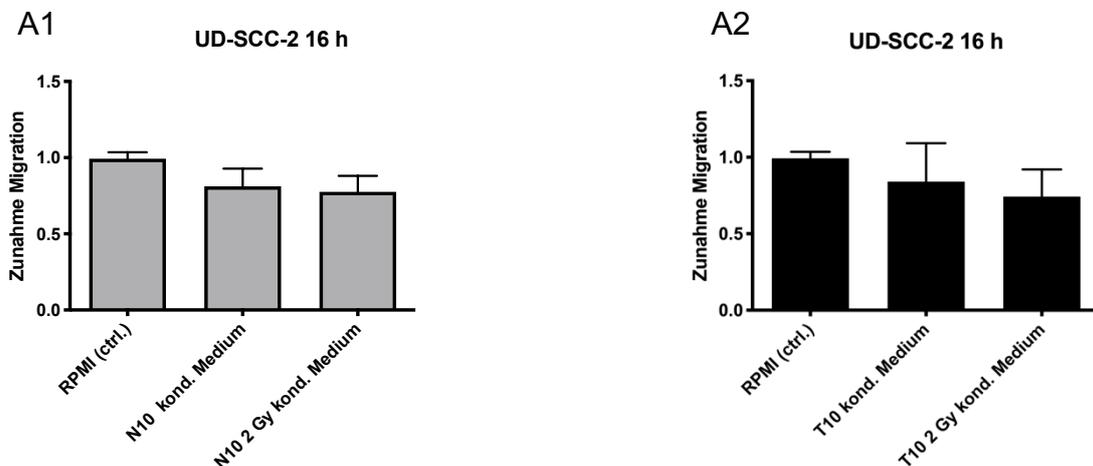


Abbildung 9: Migration UD-SCC-2

A1: UD-SCC-2 im Insert, und Zugabe von mit ASC-N10 präkonditioniertem Medium, Aufnahmen nach 16 Stunden

A2: UD-SCC-2 im Insert, und Zugabe von mit ASC-T10 präkonditioniertem Medium, Aufnahmen nach 16 Stunden

Zu beobachten war eine nicht signifikante Abnahme der Migration der HPV-positiven Tumorzelllinie UD-SCC-2 bei Zugabe von ASC präkonditioniertem Medium im Vergleich zu dem korrespondierenden Standardmedium. Es konnte kein Unterschied zwischen den präkonditionierten ASC-Medien erkannt werden, weder hinsichtlich des Ursprungs und Tumorassoziation der ASCs, noch bezüglich einer Bestrahlung mit zwei Gy.

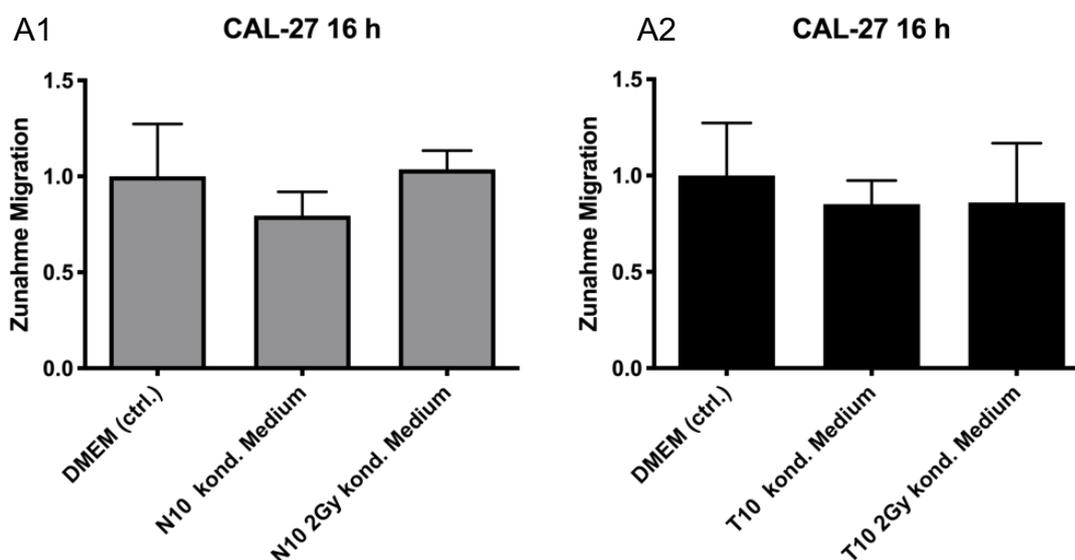


Abbildung 10: Migration CAL-27

A1: CAL-27 im Insert, und Zugabe von mit ASC-N10 präkonditioniertem Medium, Aufnahmen nach 16 Stunden

A2: CAL-27 im Insert, und Zugabe von mit ASC-T10 präkonditioniertem Medium, Aufnahmen nach 16 Stunden

Zu beobachten war eine nicht signifikante Abnahme der Migration der HPV-negativen Tumorzelllinie CAL-27 bei Zugabe von ASC präkonditioniertem Medium im Vergleich zu dem korrespondierendem Standardmedium. Es konnte kein Unterschied zwischen den präkonditionierten ASC-Medien erkannt werden, weder hinsichtlich des Ursprungs der ASCs (peritumoralen vs. nicht peritumoralen) noch bezüglich einer Bestrahlung mit zwei Gray. Diese Ergebnisse sind analog zu den Ergebnissen der HPV-positiven Zelllinie.

Somit lässt sich die Frage, ob mesenchymale Stammzellen über lösliche Faktoren die Migration von Tumorzellen erhöhen mit nein beantworten.

### 5.3.2 Migrationsanalysen mesenchymaler Fettgewebstammzellen

Nachdem die oben aufgeführten Versuche gezeigt haben, dass die Migration von Tumorzellen nicht durch mesenchymale Fettgewebstammzellen erhöht wurde, untersuchten die folgenden Experimente, ob Tumorzellen die Migration von mesenchymalen Fettgewebstammzellen erhöhen.

Dazu wurde über 48h konditioniertes serumfreies Medium von Tumorzellen gewonnen, welches nach Entfernen der Ibidi Inserts auf ASCs gegeben wurde. Zunächst wurden die Effekte der HPV-negativen Tumorzelllinie auf die ASCs von einem Tumorpatienten untersucht.

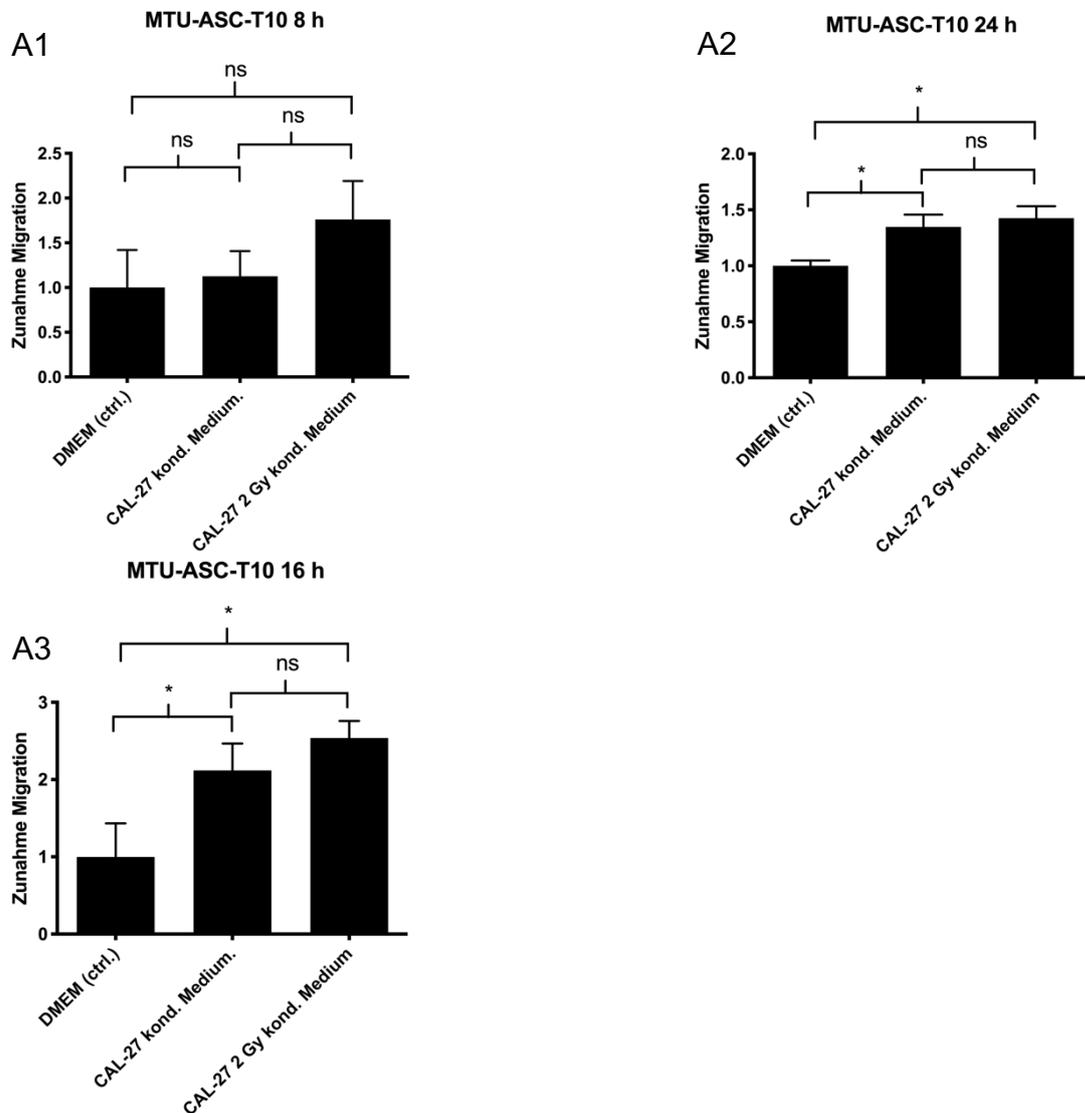


Abbildung 11: Migration ASC-T10 unter CAL-27

A1: ASC-T10 im Insert, und Zugabe von mit CAL-27 präkonditioniertem Medium, Aufnahmen nach 8 Stunden

A2: Wie A1, Aufnahmen nach 16 Stunden

A3: Wie A1, Aufnahmen nach 24 Stunden

Es zeigte sich ein Anstieg der Migration der mesenchymalen Fettgewebstammzellen ASC-T10 durch lösliche Faktoren der Tumorzelllinie CAL-27. Dieser Effekt wird durch Bestrahlung mit zwei Gray nicht signifikant verstärkt.

Nach acht Stunden ist die relative Veränderung des zellfreien Spalts nur gering verändert und die Standardabweichung entsprechend groß. Beim Wert acht Stunden nach Entfernung des Inserts sind keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Nach 24 Stunden wiederum war der zellfreie Spalt an wenigen Stellen komplett verschwunden, sodass sich die Zellfronten berührten. Dies erschwert die Bestimmung der zellfreien Fläche. Nach 16 Stunden zeigt sich eine bereits deutliche Verkleinerung der zellfreien Fläche, ohne dass es zu Kontakt der Zellfronten kam.

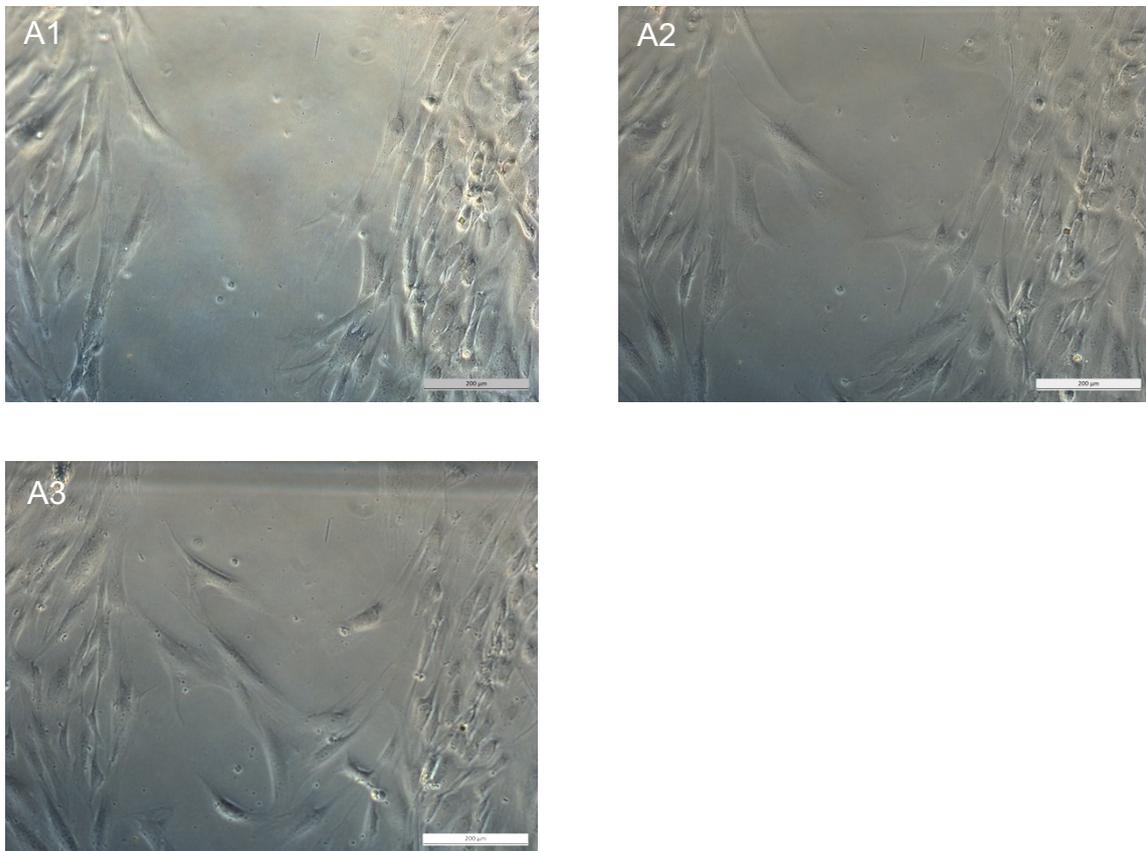


Abbildung 12: Aufnahmen ASC-T10

A1: ASC-T10 und Zugabe von mit CAL-27 präkonditioniertem Medium, Aufnahmen nach 8 Stunden

A2: Wie A1, Aufnahmen nach 16 Stunden

A3: Wie A1, Aufnahmen nach 24 Stunden

Die Migrationsassays von ASC-T10 mit präkonditioniertem Medium der HPV-positiven Zelllinie UD-SCC-2 ergab ein vergleichbares Ergebnis.

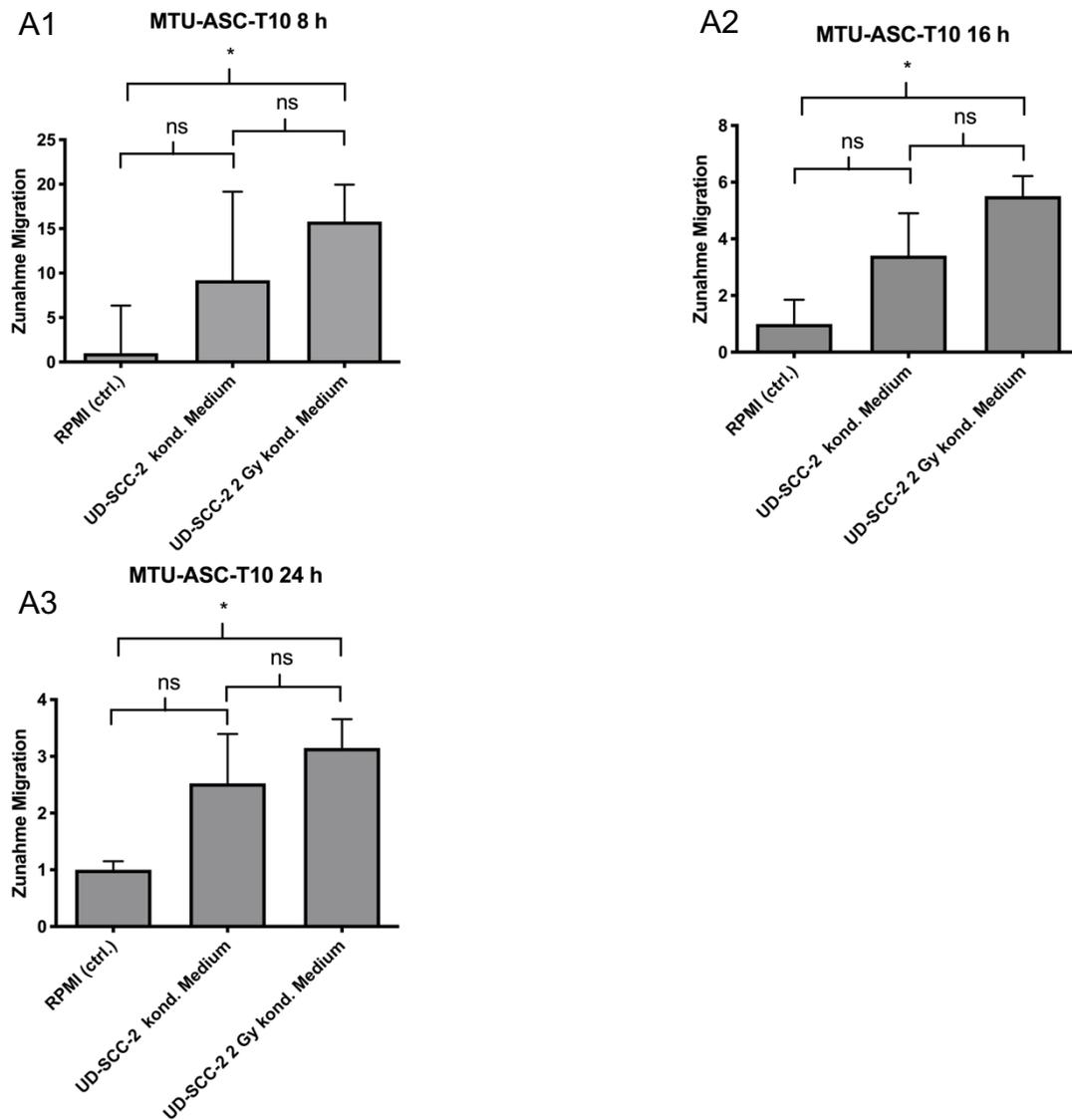


Abbildung 13: Migration ASC-T10 unter UD-SCC-2

A1: ASC-T10 im Insert, und Zugabe von mit UD-SCC-2 präkonditioniertem Medium, Aufnahmen nach 8 Stunden

A2: Analog A1, Aufnahmen nach 16 Stunden

A3: Analog A1, Aufnahmen nach 24 Stunden

Die relative Erhöhung der Migration ist für UD-SCC-2 höher als für CAL-27. Eine Erhöhung der Migration bei präkonditioniertem Medium von bestrahlten Tumorzellen im Vergleich zu unbestrahlten Tumorzellen zeichnete sich ab. Diese

Erhöhung bestand unabhängig vom Zeitpunkt, war jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.

Die Analyse der Migration der mesenchymalen Fettgewebstammzellen eines Patienten ohne Tumorerkrankung (ACS-N10) zeigte ein ähnliches Muster, wie die oben aufgeführten Experimente.

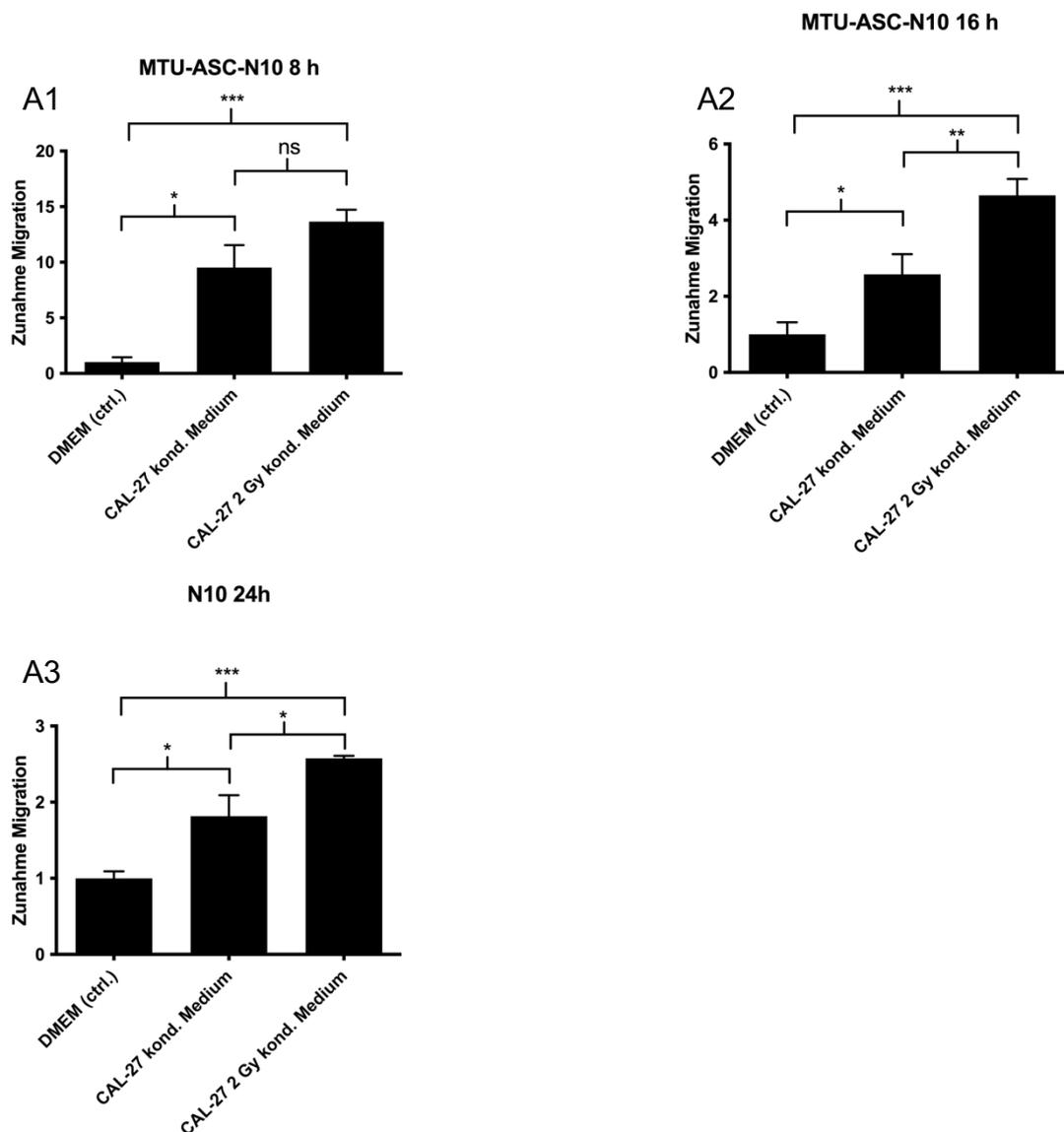


Abbildung 14: Migration ASC-N10 unter CAL-27

A1: ASC-N10 und Zugabe von mit CAL-27 präkonditioniertem Medium, Aufnahmen nach 8 Stunden

A2: Analog A1, Aufnahmen nach 16 Stunden

A3: Analog A1, Aufnahmen nach 24 Stunden

Bei geringer absoluter Migration nach acht Stunden stellten sich große relative Unterschiede dar. Die Bestrahlung mit zwei Gray verstärkte, wie in den Experimenten mit ASC-T10 die Migration. Aufgrund einer hohen Standardabweichung war dieser Effekt jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.

Analog ist das Verhalten bei UD-SCC-2 und ASC-N10:

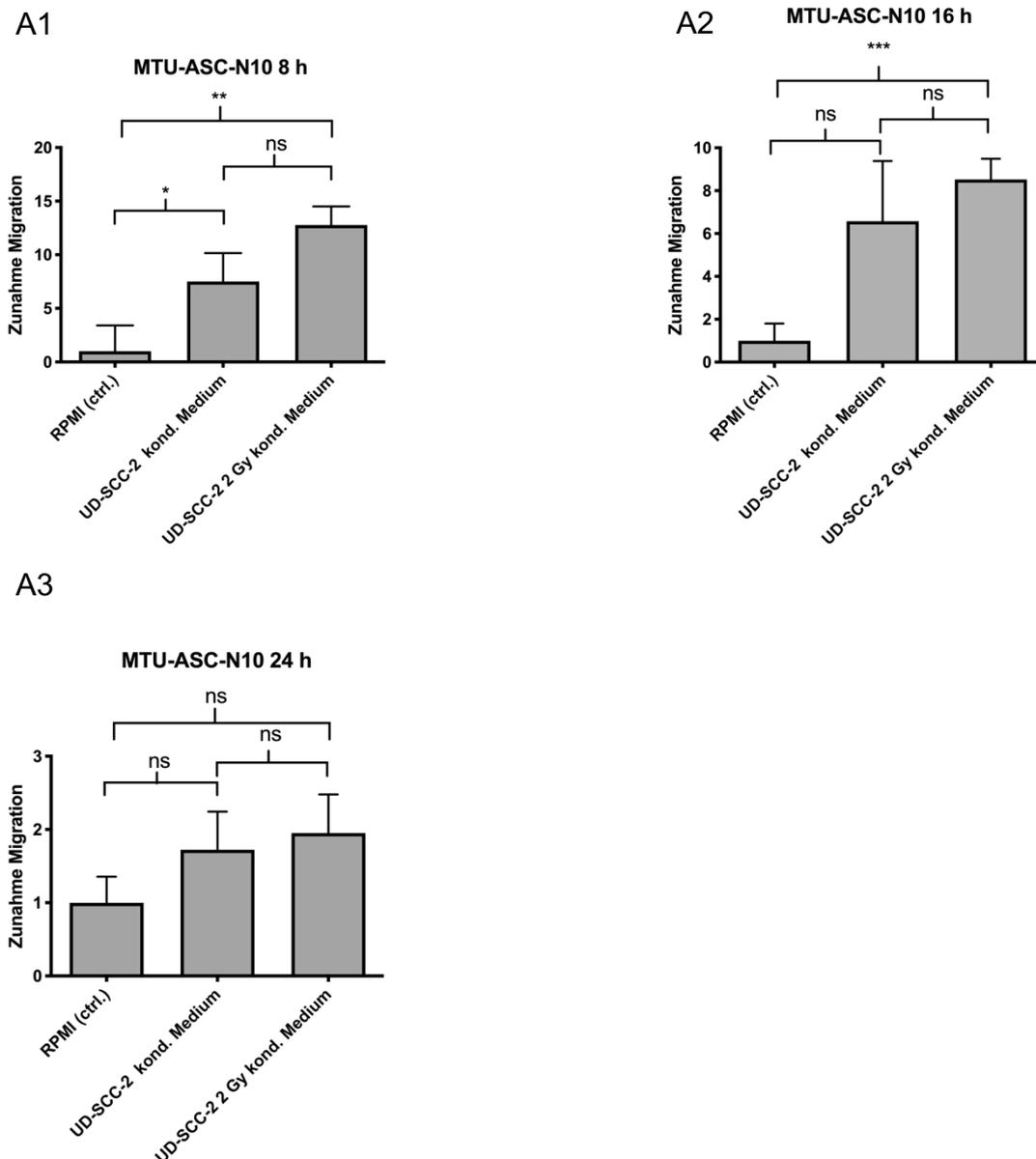


Abbildung 15: Migration ASC-N10 unter UD-SCC-2

A1: ASC-N10 und Zugabe von mit UD-SCC-2 präkonditioniertem Medium, Aufnahmen nach 8 Stunden

A2: Analog A1, Aufnahmen nach 16 Stunden

A3: Analog A1, Aufnahmen nach 24 Stunden

Bei den Migrationsassays von ASC-N10 mit präkonditioniertem Medium von UD-SCC-2 zeigt sich nach 24 Stunden keine signifikante Erhöhung der Migration durch präkonditioniertes Medium. Zu diesem Zeitpunkt haben die Zellfronten an einigen Stellen Kontakt, somit kann die Migration nicht mehr klar beurteilt werden.

Zusammenfassend lässt sich die Migration von mesenchymalen Stammzellen signifikant durch tumorzellkonditioniertes Medium beeinflussen. Erklärbar wäre dies durch lösliche Faktoren, welche es noch zu identifizieren gilt. Dieses Erkenntnis unterstützt die Hypothese, dass Tumore mesenchymale Stammzellen als Bestandteil der Tumormikroumgebung rekrutieren. Der Effekt wird durch Bestrahlung der Tumorzellen mit zwei Gray 48h vor Gewinnung des präkonditionierten Mediums verstärkt. Die Effekte bestehen für sowohl für HPV-positive als auch für HPV-negative Tumorzellen und mesenchymale Fettgewebstammzellen von einem Kopf-Hals-Tumorpatienten unabhängig ihrer Tumorassoziation.

### 5.3.3 Migrationsanalysen in der Parallelkultur und Mischkultur

Um die gegenseitige Beeinflussung der Migration genauer zu untersuchen und die Effekte einer möglichen wechselseitigen Interaktion zu beobachten, wurden in der linken Kammer der Inserts Tumorzellen ausgesät und in der rechten Kammer mesenchymale Stammzellen. Dieser Versuchsaufbau wird als Parallelkultur bezeichnet. Als Kontrolle wurden in beide Kammern des Inserts ASCs ausgesät, da diese im Vergleich zu Tumorzellen bei gleichen Bedingungen stärker migrieren. So wird eine Zunahme der Migration in der Parallelkultur nicht überschätzt, sondern eher unterschätzt. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

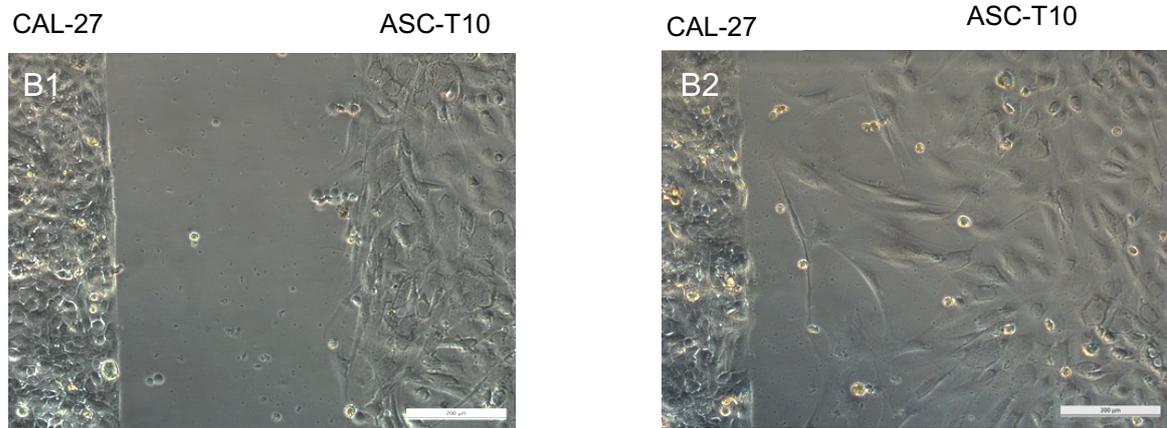
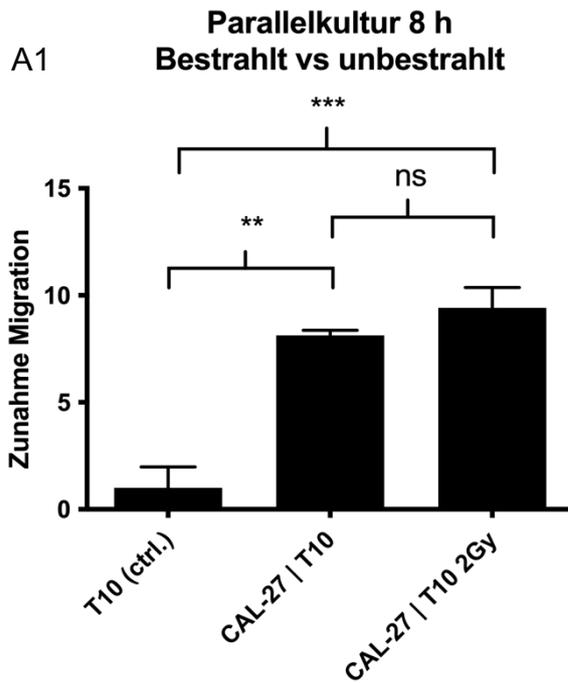


Abbildung 16: Migration Parallelkultur

A1: ASC-T10 in beiden Kammern des Inserts als Kontrolle im Vergleich zu CAL-27 auf der linken und ASC-T10 auf der rechten Seite, bestrahlt und unbestrahlt. Aufnahmen nach 8 Stunden. Kultivierung in Serum-freiem DMEM.

B1: Parallelkultur unmittelbar nach Entfernen des Inserts

B2: Parallelkultur nach 8 Stunden

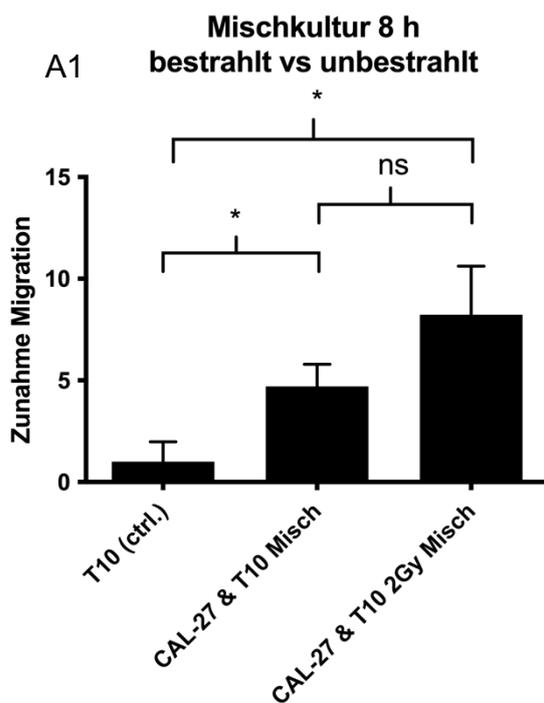
Zu beobachten war ein deutlicher, statistisch signifikanter Anstieg der Migration bei Parallelkultivierung von ASC-T10 und CAL-27. Dieser Effekt ist stärker ausgeprägt als bei Hinzugabe von konditioniertem Medium. Bei Betrachtung der Bilder zeigt sich, dass die Zunahme der Migration im Wesentlichen auf die Migration der ASCs zurückzuführen ist.

Eine Markierung der Zellfronten und eine Messung des Abstands der Zellfront der ASCs zum Zeitpunkt 0h und zum Zeitpunkt 8h war in dem verwendeten Versuchsaufbau nicht möglich, daher lässt sich diese Aussage nicht metrisch objektivieren.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Migrationsexperimente mit konditioniertem Medium ist davon auszugehen, dass die Zunahme der Migration in der Parallelkultur auf eine Zunahme der Migration der ASCs und nicht der Tumorzellen begründet ist.

Eine Bestrahlung der Parallelkultur mit zwei Gray führte zu einer statistisch nicht signifikanten Zunahme der Migration im Vergleich zum unbestrahlten Ansatz.

Um zu untersuchen, wie sich die Migration verhält, wenn bereits zum Zeitpunkt 0h direkt Zell-Zell-Kontakte zwischen CAL-27 und ASC-T10 bestehen, wurden in beiden Kammern der Inserts eine 1:10 Mischung von ASC-T10 und CAL-27 ausgesät. Dieser Versuchsaufbau wird als Mischkultur bezeichnet.



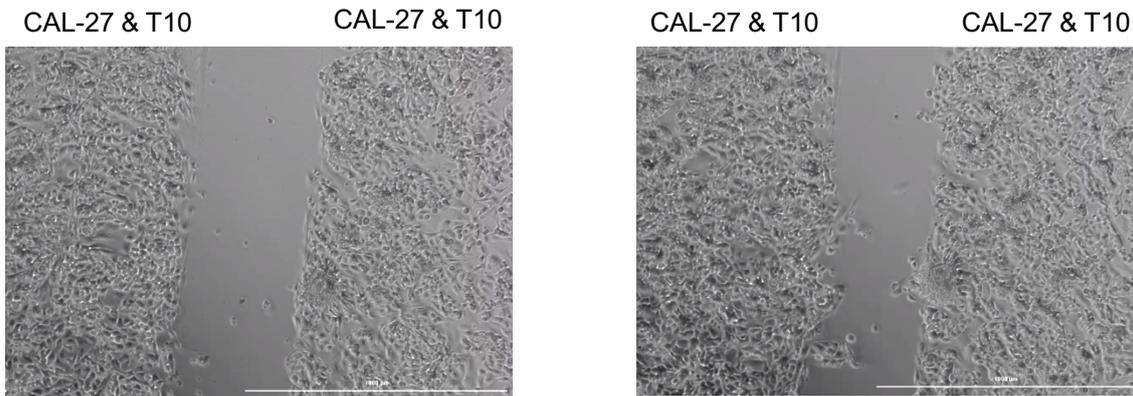


Abbildung 17: Migration Mischkultur 8h

A1: ASC-T10 in beiden Kammern des Inserts als Kontrolle im Vergleich zu 1:10 Mischung aus ASC-T10 und CAL-27 in DMEM, bestrahlt und unbestrahlt.

B1: Mischkultur unmittelbar nach Entfernen des Inserts

B2: Mischkultur nach 8 Stunden

Analog zu den Versuchen in der Parallelkultur zeigt sich eine erhöhte Migration bei einer Anwesenheit von ASCs und Tumorzellen. Der Effekt ist geringer als in der Parallelkultur und größer als in den Versuchen mit präkonditioniertem Medium. Auch hier ist die Erhöhung der Migration durch die Bestrahlung mit zwei Gray nicht statistisch signifikant.

In der Mischkultur erfolgte ein erneuter Vergleich zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Tumorzellen und ASCs von einem Kopf-Hals-Tumorpatient und einem Patienten ohne Tumorerkrankung. Hier ist nicht die relative Erhöhung der Migration dargestellt, da es keine gemeinsame Kontrollgruppe gibt, auf die normalisiert werden kann. Es ist die Zunahme der Zellfläche als prozentualer Anteil der Gesamtfläche des Bildes nach 16 Stunden dargestellt.

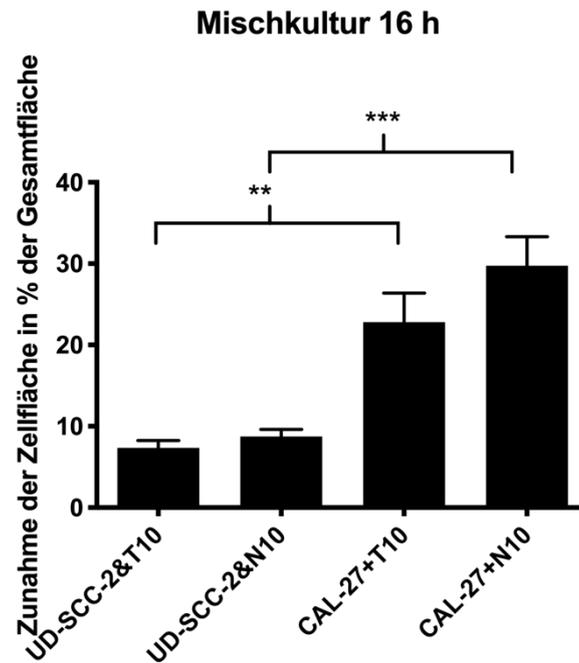


Abbildung 18: Migration Mischkultur 16h

Es war kein signifikanter Unterschied in der Migration bei der Verwendung von mesenchymalen Fettgewebstammzellen eines Tumorpatienten im Vergleich zu einem tumorfreien Patienten zu beobachten. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen CAL-27 und UD-SCC-2. Dieser besteht auch in der Abwesenheit von mesenchymalen Stammzellen. Die relative Veränderung der Migration, unterscheidet sich nicht signifikant. Bei den verwendeten Zelllinien zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Änderung des Migrationsverhalten von UD-SCC-2 und CAL-27 durch mesenchymale Fettgewebstammzellen.

Eine direkte Gegenüberstellung der Parallel- und Mischkultur ergab folgendes Ergebnis:

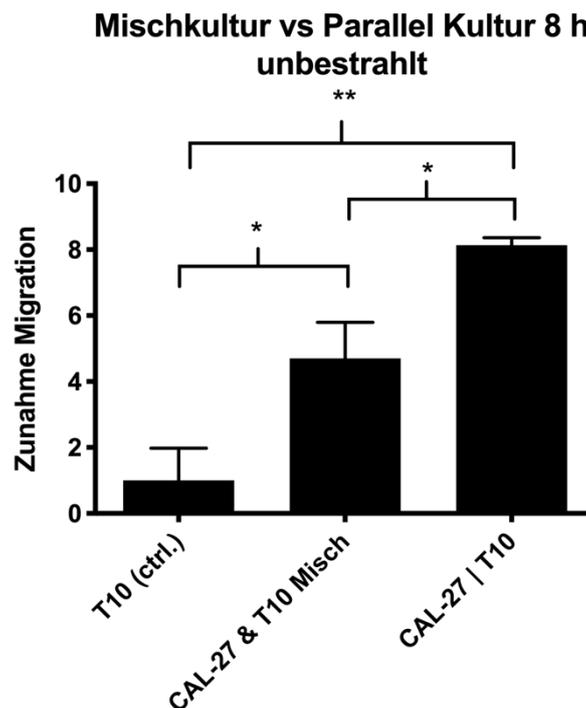


Abbildung 19: Migration Mischkultur gegen Parallelkultur

ASC-T10 in beiden Kammern des Inserts als Kontrolle im Vergleich zur 1:10 Mischkultur (CAL-27 & T10 Misch) und zur Parallelkultur (CAL-27 | T10)

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Effekten zeichnete sich in dieser Gegenüberstellung ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Misch- und der Parallelkultur, mit verstärkter Migration in der Parallelkultur ab.

#### 5.3.4 Migrationsanalysen mit fluoreszierenden Zellen

Nachdem in den oben aufgeführten Experimenten gezeigt werden konnte, dass Tumorzellen die Migration von mesenchymalen Fettgewebstammzellen anregen und die ASCs in Richtung der Tumorzellen migrieren, sollte ein Folgeexperiment untersuchen, ob die ASCs in den Tumorzellrasen infiltrieren.

Um die Unterscheidbarkeit zwischen Tumorzellen und mesenchymalen Fettgewebstammzellen sicherzustellen, wurden die Zellen zunächst mit unterschiedlichen Lebendfarbstoffen innerhalb der Insert-Kammern gefärbt, um dann die Experimente analog zu den Parallelkulturexperimenten durchzuführen.

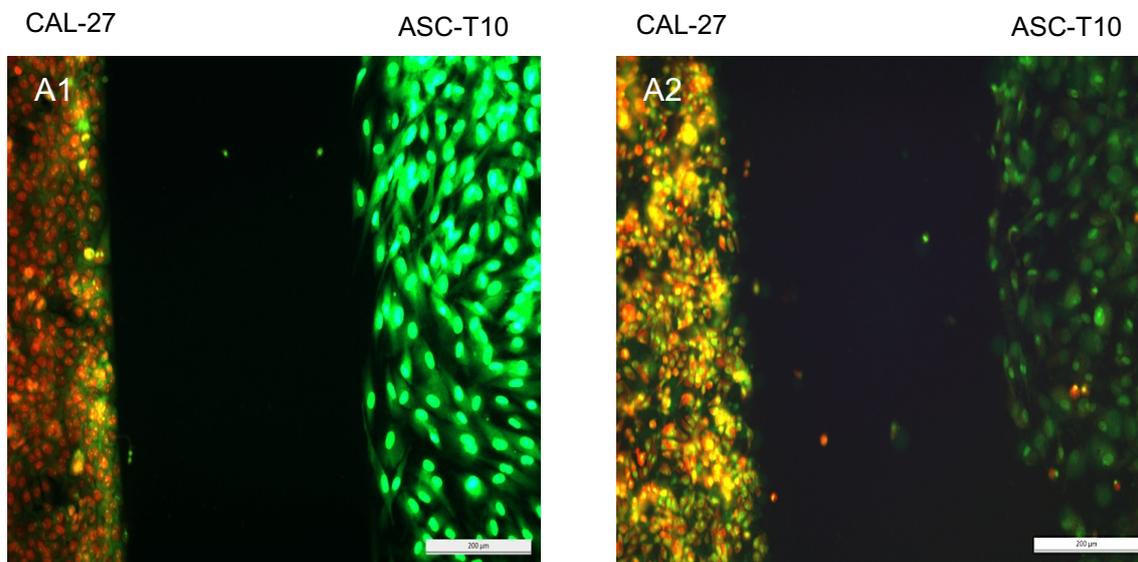


Abbildung 20: Migration Parallelkultur mit Fluoreszenzfarbstoff

A1: nach Entfernen des Inserts

A2: nach 16 Stunden

Nach 16 Stunden wurde zum einen ein Austausch der Fluoreszenzfarbstoffe beobachtet, was gegebenenfalls eine Unterscheidung von ASCs und Tumorzellen bei Einwachsen der mesenchymalen Stammzellen in die Tumorzellen erschwert. Zum andern kommt durch Zugabe des Farbstoffes die Migration zum Erliegen. Dieser Effekt besteht auch bei deutlich geringeren Farbstoffkonzentrationen als hier abgebildet und vom Hersteller empfohlen, bei welchen die Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie nicht mehr gut erkennbar sind. Daher war eine Untersuchung des Verhaltens der ASCs nach Kontakt der Zellfronten im Migrationsassay in diesem Versuchsaufbau nicht möglich.

Daraufhin wurde CAL-27 mit einem GFP-Plasmid transfiziert und mittels eines Antibiotikums selektiert. Dies sollte eine Unterscheidung zwischen Tumorzellen und ASCs nach Konfluenz der zellfreien Fläche im Migrationsassay möglich machen.

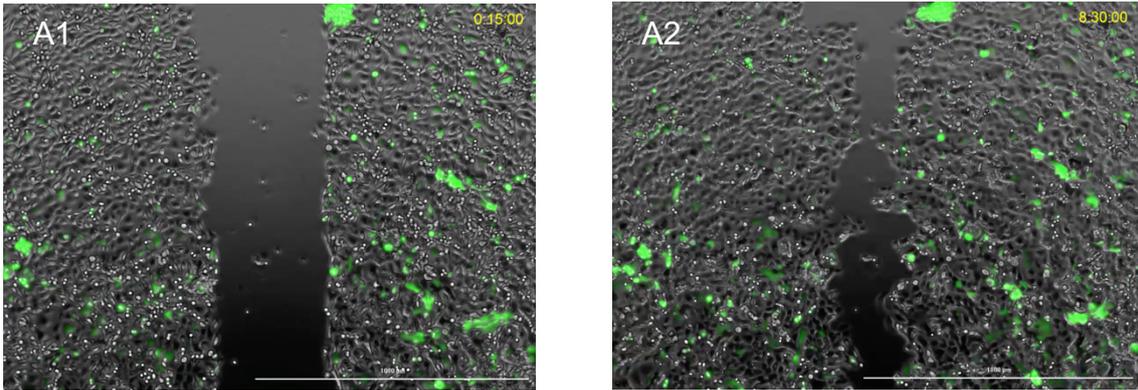


Abbildung 21: Migration Parallelkultur mit GFP

A1: nach Entfernen des Inserts

A2: nach 8 Stunden

Die Transfektion von CAL-27 mit einem GFP-Plasmid führt nur zu einem unzureichenden Anteil von fluoreszierenden Zellen. Dadurch ist eine zuverlässige Unterscheidung zwischen fluoreszierenden Tumorzellen und nicht fluoreszierenden mesenchymalen Fettgewebstammzellen nicht möglich. Auch durch eine durchflusszytometrische Sortierung und deutlich höhere Antibiotikakonzentrationen als vom Hersteller empfohlen, konnte kein hinreichender Anteil an fluoreszierenden CAL-27 Zellen erreicht werden. Somit war auch die Transfektion mit GFP-Plasmid zur Untersuchung des Verhaltens von ASCs nach Herstellung von Zell-Zell-Kontakten im Migrationsassay nicht geeignet. Außerdem scheinen die GFP-transfizierten CAL-27 Zellen mobiler zu sein, als reguläre CAL-27. Mithilfe der Analysesoftware des Lionheart™ FX wurde dies untersucht.

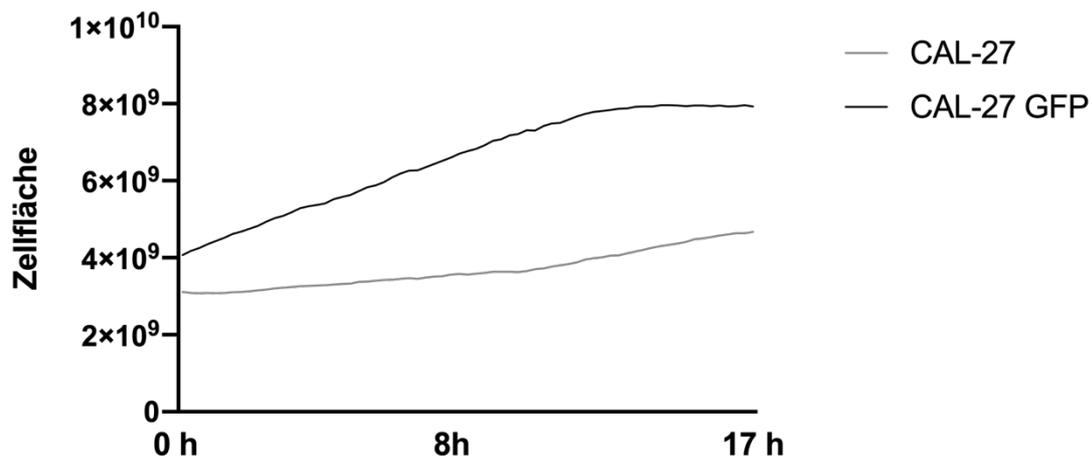


Abbildung 22: Migration CAL-27 GFP, Lionheart FX

Abbildung 22 zeigt die Zunahme der mit Zellen bewachsenen Fläche von CAL-27 GFP im Vergleich zu CAL-27 in serumfreiem DMEM über 17 Stunden, in der automatischen Auswertung des Lionheart™ FX. Bei CAL-27 GFP ist der zellfreie Spalt nach 14 Stunden verschlossen.

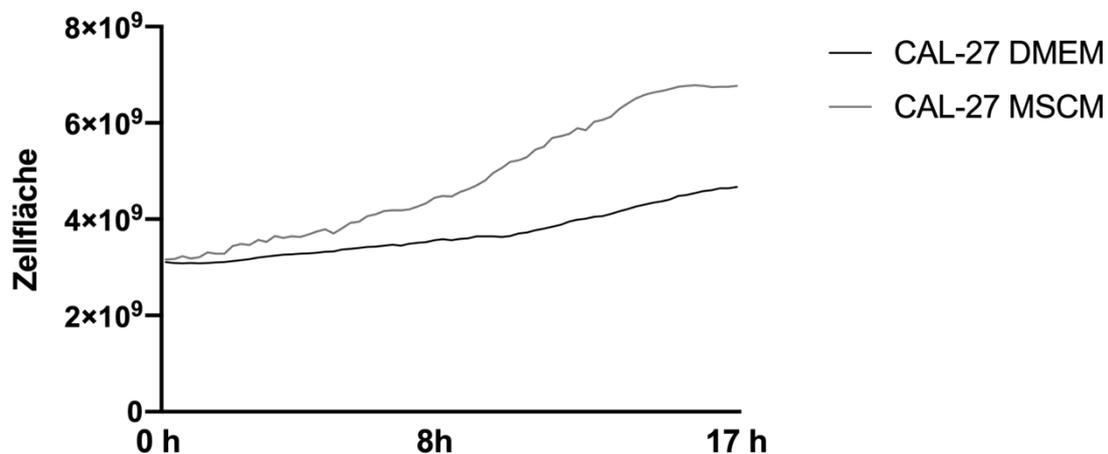


Abbildung 23: Migration CAL-27 mit MSCM, Lionheart FX

Abbildung 25 zeigt die Zunahme der mit Zellen bewachsenen Fläche CAL-27 in DMEM im Vergleich zu CAL-27 in MSCM über 17 Stunden, in der automatischen Auswertung des Lionheart™ FX. Im MSCM ist der zellfreie Spalt nach ca. 15 Stunden verschlossen.

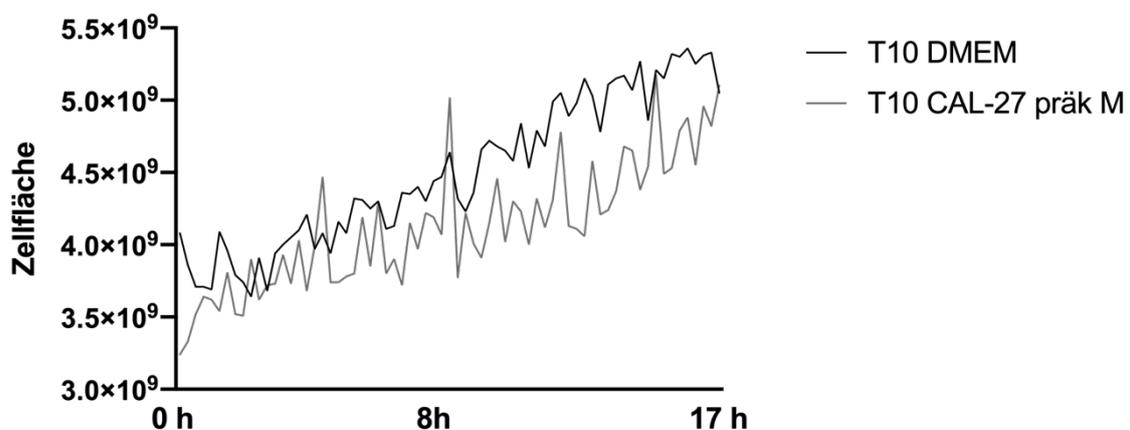


Abbildung 24: Migration ASC-T10, Lionheart FX

In Abbildung 24 ist die Zunahme der mit Zellen bewachsenen Fläche bei ASC-T10 in den Inserts unter der Zugabe von Serum-freiem DMEM im Vergleich zu

von CAL-27 präkonditioniertem DMEM abgebildet. Da ASCs langgezogene Zellkörper besitzen und sich nur schwach zur zellfreien Fläche kontrastieren ist die automatische Auswertung deutlich eingeschränkt. In der Betrachtung schließt sich der zellfreie Spalt kontinuierlich, zwischenzeitliche Rückgänge, wie in dieser Grafik dargestellt, waren nicht zu beobachten.

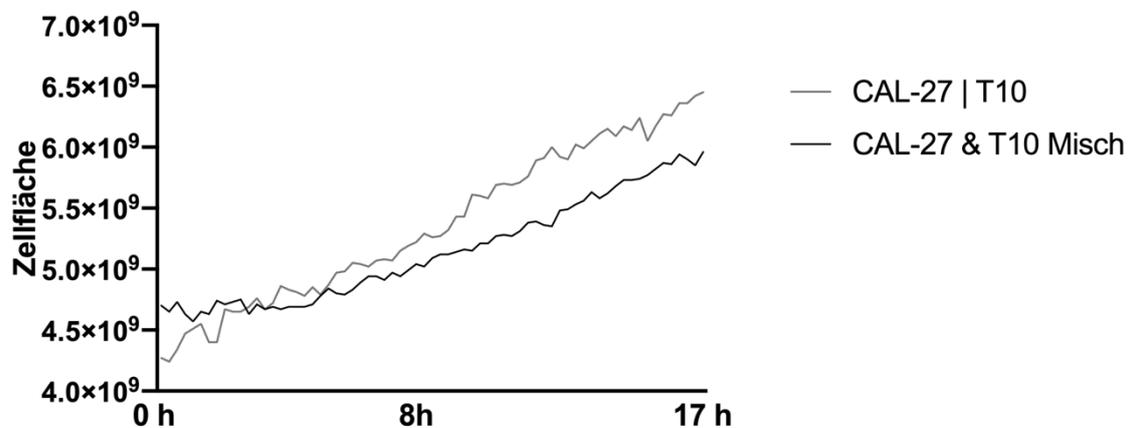


Abbildung 25: Migration Mischkultur gegen Parallelkultur, Lionheart FX

Hier abgebildet ist ein Vergleich von Parallelkultur und Mischkultur. Der relative Unterschied ist bei gering unterschiedlichen Ausgangswerten etwas höher, als dieser Graph suggeriert. In diesem Experiment ließen sich die Ergebnisse aus den manuell ausgewerteten Migrationsexperimenten reproduzieren.

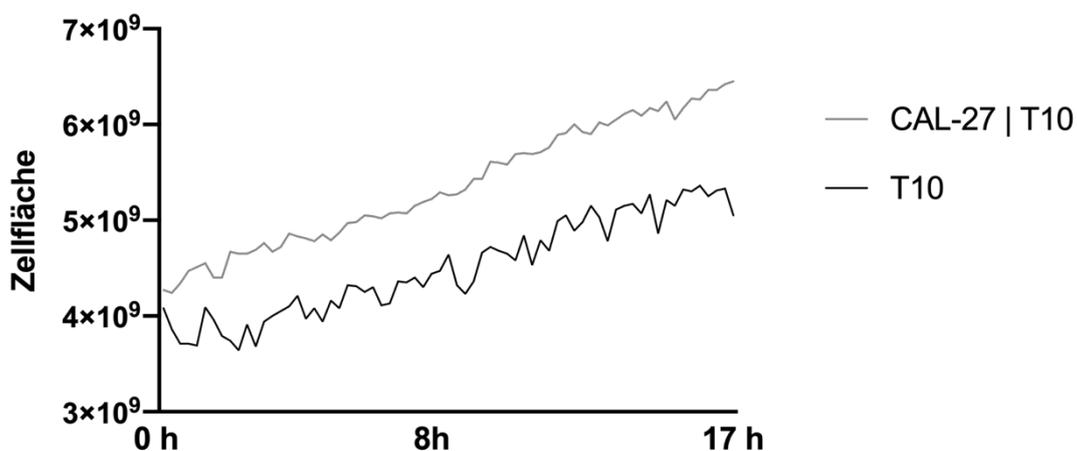


Abbildung 26: Migration ASC-T10 Lionheart FX

Die Abbildung 26 stellt die Zunahme der Zellfläche von ASC-T10 in Monokultur der Abnahme in der Parallelkultur mit CAL-27 gegenüber. Auch die Induktion der

Migration von ASC-T10 durch CAL-27 in der Parallelkultur, welche sich in den manuell ausgewerteten Migrationsexperimenten zeigten, ließ sich reproduzieren. Betrachtet man die Aufnahmen aus den manuellen Migrationsexperimenten (Abbildung 16) zeigt sich, dass die Zunahme der Zellfläche im Wesentlichen auf die Migration der ASCs zurückging. Dies war auch in den Migrationsexperimenten mit dem Lionheart FX der Fall.

## 5.4 Dreidimensionale Zellkultur

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Herstellung eines *in vitro* Modells, welches die real herrschenden Bedingungen eines Tumors besser repräsentiert als die zweidimensionale Zellkultur. Dies ist nützlich, um die Interaktion zwischen den beiden Zelltypen, den Tumorzellen und den mesenchymalen Fettgewebstammzellen, weiter zu analysieren. In der konventionellen Zellkultur wachsen die Zellen in einer 2D-Monolage, welche eine sehr starke Vereinfachung zu den *in vivo* Bedingungen darstellt.

Im Vergleich dazu ist die dreidimensionale Zellkultur besser geeignet, die komplexen Bedingungen eines realen Tumors nachzustellen.

Ziel war es, analog zu Vinci et al., die Migration von Tumorzellen aus Sphäroiden in eine umgebende Extrazellulärmatrix, darzustellen und zu quantifizieren (Vinci et al., 2013).

### 5.4.1 Magnetic Levitation

Mithilfe des Magnetic Levitation Systems ließen sich zuverlässig große, kompakte und zuverlässig kohärente Sphäroide erzeugen.

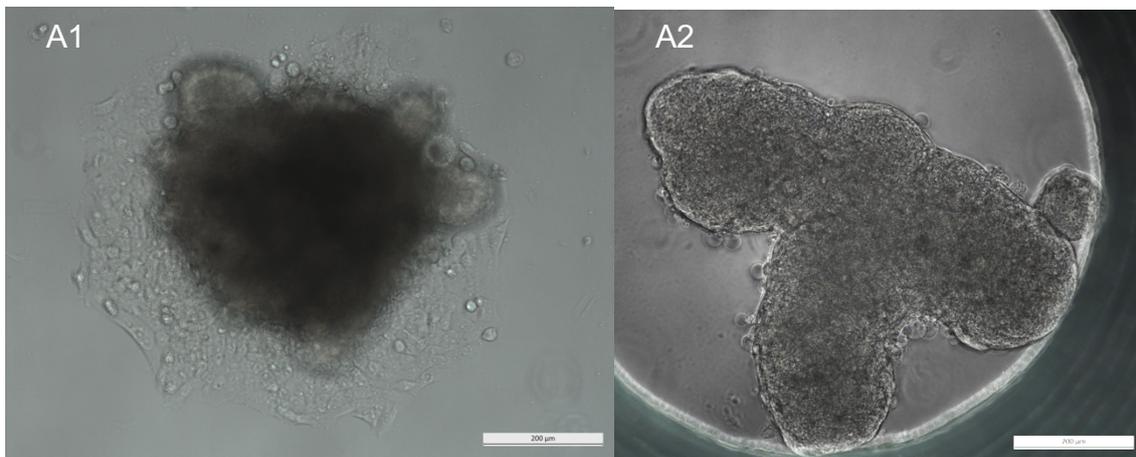


Abbildung 27: Sphäroide aus CAL-27

A1: Sphäroid aus CAL-27 mit ferromagnetischen Partikeln nach Entfernung aus dem Magnetic Levitation Kit.

A2: Irregulär geformtes Sphäroid

Aufgrund der Nachteile dieser Methode, die durch das Vorhandensein der ferromagnetischen Partikeln bedingt sind, wie die Fehldosierungen bei Bestrahlung, Verfälschung bei durchflusszytometrischen Analysen und eine erschwerte Beurteilbarkeit im Phasenkontrastmikroskop, wurde, trotz der erfolgreichen Generierung relativ großer (0,6-1,0 mm) 3D Konstrukte, dieser Versuchsansatz nicht weiterverfolgt.

#### 5.4.2 Hanging Drop

Im Hanging-Drop Kit formen sich die Sphäroide durch Zell-Zell-Kontakte ohne weitere Hilfsmittel. Bei korrekter Handhabung lassen sich so ebenfalls zuverlässig Sphäroide erzeugen, diese sind jedoch fragiler und kleiner als die Sphäroide aus dem Magnetic Levitation Kit. Im Hanging-Drop erzeugte Sphäroide können aus beliebig zusammengesetzten Zellgemischen erzeugt werden. Sie sind ohne Fehldosierung bestrahlbar und können nach mechanischer Lyse durchflusszytometrisch analysiert werden.

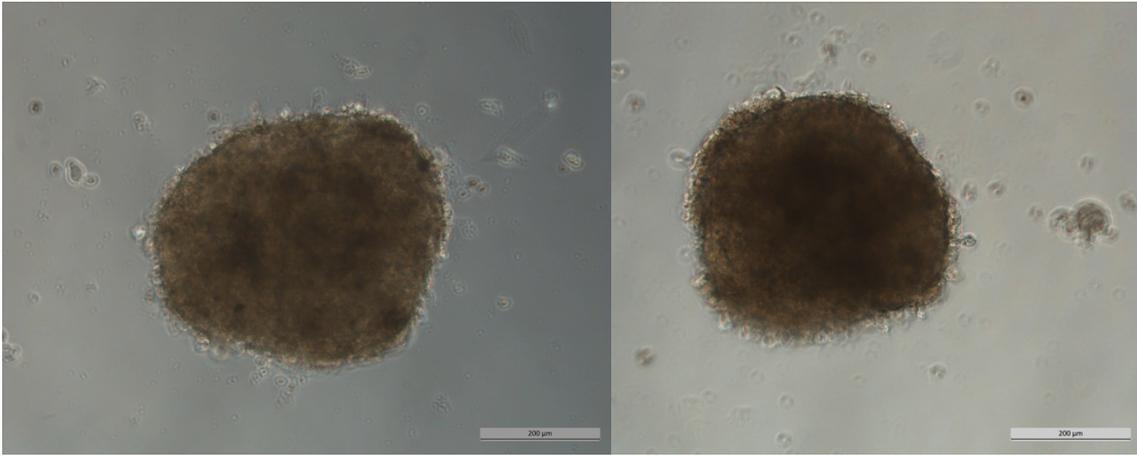


Abbildung 28: Sphäroide aus CAL-27 aus dem Hanging-Drop-Kit

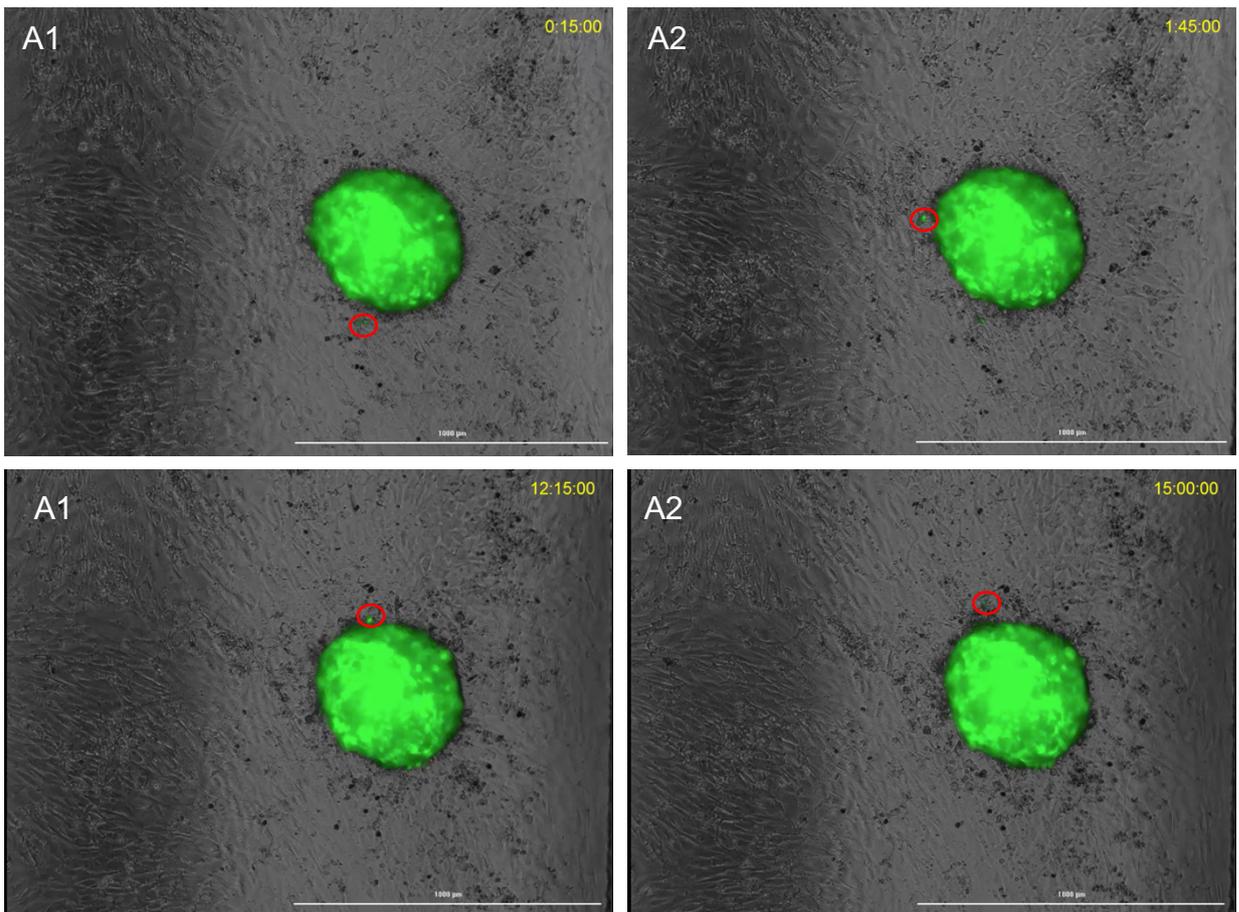


Abbildung 29: Momentaufnahmen CAL-27 GFP Sphäroid

In den Momentaufnahmen des Sphäroids aus GFP transfizierten CAL-27 auf einem Monolayer aus ASC-T10 lässt sich beobachten, wie sich kleine fluoreszierende Zellverbände aus dem CAL-27-Sphäroid herauslösen, von dem Sphäroid entfernen und Ihre Fluoreszenz verlieren. Eine Migration von ASCs zu

dem Sphäroid und in das Sphäroid hinein, wie man es als Folgerung aus den zweidimensionalen Migrationsassays erwarten könnte, ließ sich bildgebend nicht quantifizieren.

## 5.5 Durchflusszytometrische Analysen

### 5.5.1 Gating Hierarchie

Die durchflusszytometrischen Analysen erfolgten in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Professor Carsten B. Schmidt-Weber am Zentrum für Allergie und Umwelt der technischen Universität München und des Helmholtz Zentrums München, sowie der Arbeitsgruppe von Dr. Mohamed Shamji am National Heart and Lung Institute des Imperial College London.

Bei allen FACS-Analysen wurden zunächst die Lymphozytenpopulation über die Größe und Granularität abgegrenzt, im zweiten Schritt wurden Doublets exkludiert und im dritten Schritt wurden über eine fixierbare lebend/tot Färbung sämtliche toten Zellen aus allen weiteren Analyseschritten ausgeschlossen. Zur Erhöhung der Reinheit der Leukozyten wurden nur CD45+ Zellen weiter analysiert.

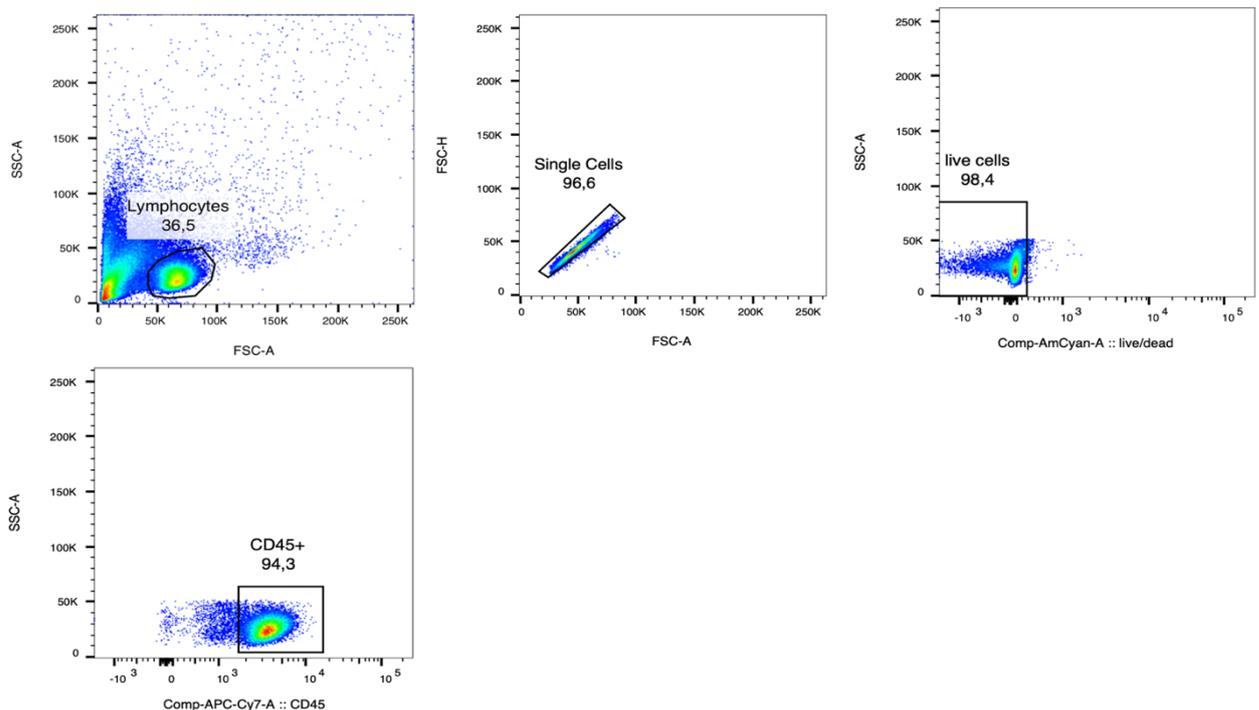


Abbildung 30: Basisgating

Diese hier gezeigten vier Schritte erfolgten bei jeder Analyse. Die Ergebnisse der FACS-Analysen wurden als Prozentwert der jeweiligen Elternpopulation angegeben. Die lebenden CD45+ Einzelzellen mit Leukozyten-typischer Größe und Granularität stellen hierfür die Basispopulation dar. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten durchweg einen hohen Anteil an vitalen Zellen. Es wurden mindestens  $5,00 \times 10^5$  Zellen pro Durchlauf analysiert, so konnten auch für kleine Subpopulationen valide Daten erhoben werden.

### Gating NK-Zell-Panel

Das natürliche Killerzellen-Panel wurde gemäß folgender Hierarchie gated:

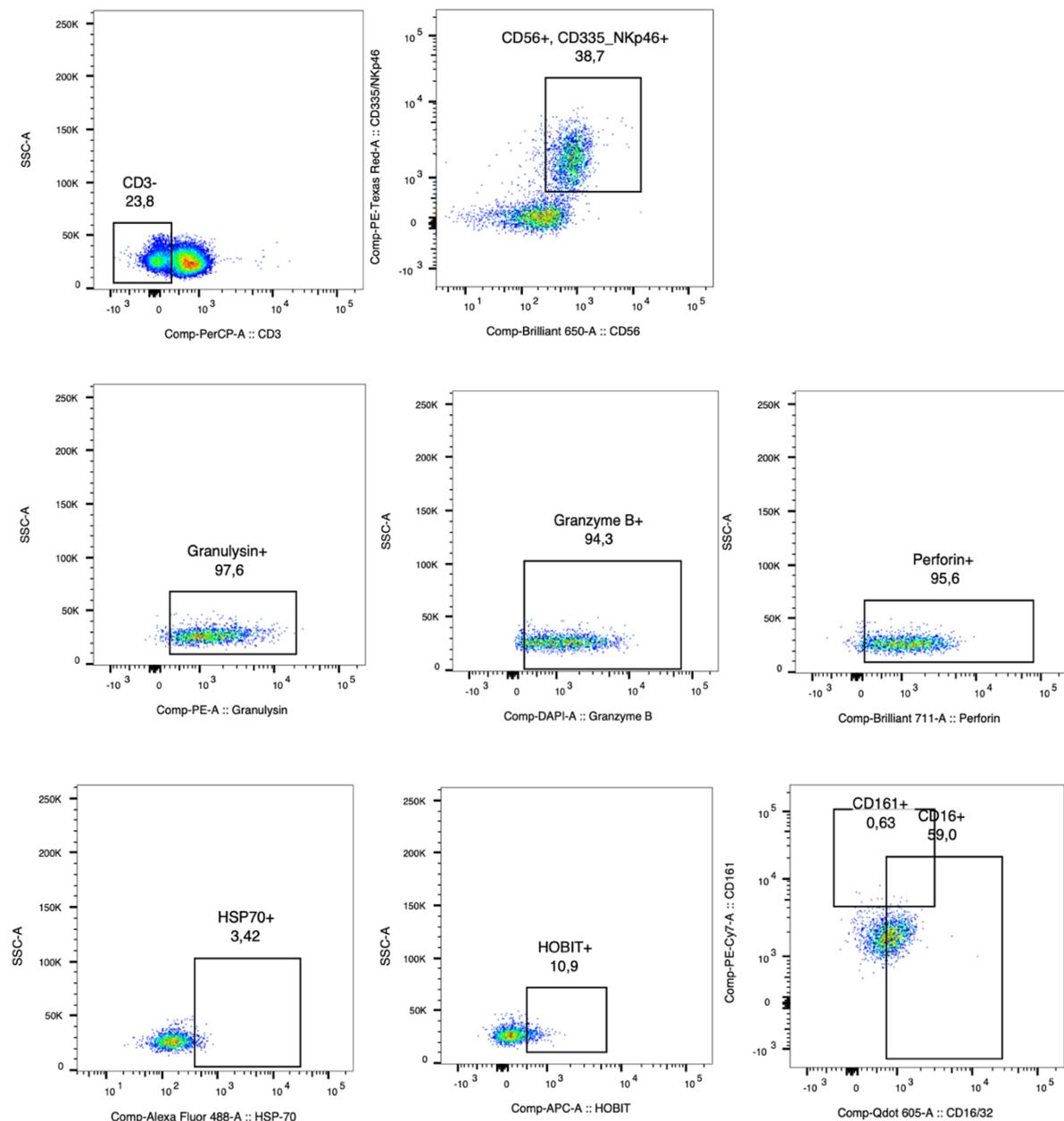


Abbildung 31: Gating NK-Zellen

Nach oben genanntem Basis-Gating wurden mithilfe des CD3-Rezeptors sämtliche T-Zellen ausgeschlossen und anschließend die NK-Zellen über CD56 und CD335 Positivität selektiert.

Somit sind die CD45+, CD3-, CD56+, CD335+ Zellen als NK-Zellen definiert.

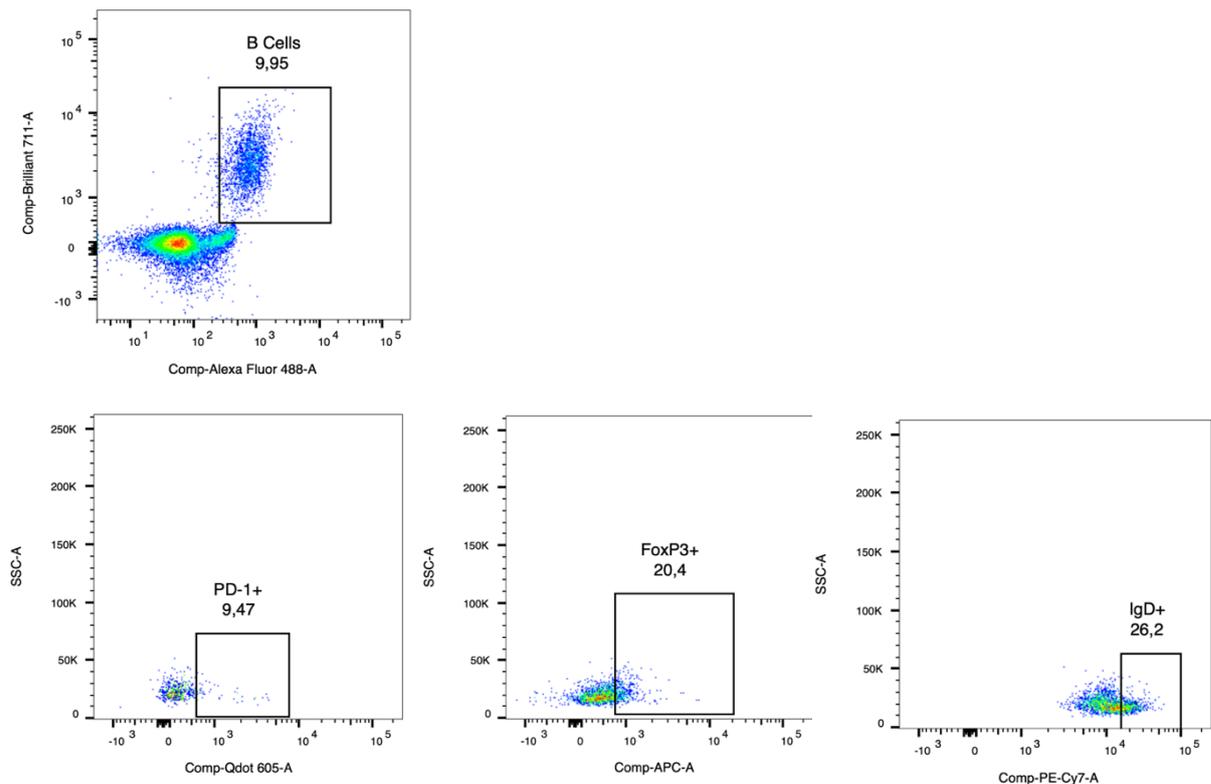
Von diesen Zellen wurde jeweils der Anteil an Granulysin+, Granzym B+ Perforin+, HSP70+ und HOBIT+, CD161+ und CD16+ Zellen angegeben.

Diese Charakterisierung diente der Evaluation der zytotoxischen und antitumorösen Potenz der NK-Zellen.

In allen Proben konnten zuverlässig und reproduzierbar NK-Zellen und deren Subtypen identifiziert werden. Für HSP-70 und CD161+ waren die Anteile an der Elternpopulation (NK-Zellen) sehr gering. Bei weniger als 0,01% der Gesamtevents sind diese Populationen vermehrt störanfällig.

### Gating B-Zell-Panel

Das B-Zell-Panel wurde gemäß folgender Hierarchie gegated:



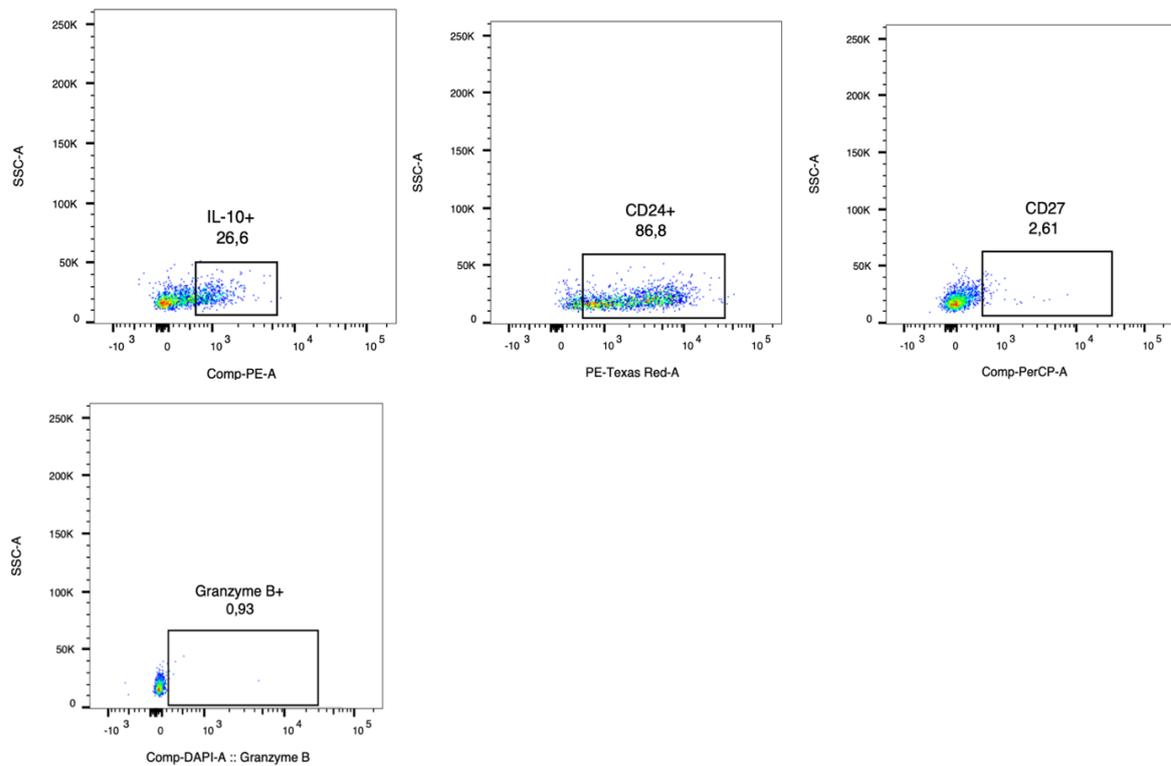
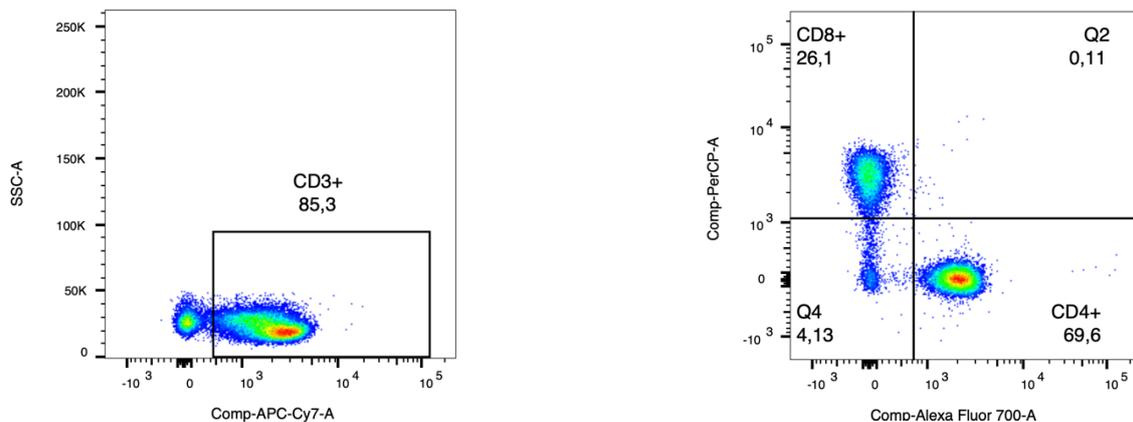


Abbildung 32: Gating B-Zellen

Als B-Zellen wurden die CD45+, CD19+, CD20+ Zellen definiert. Von diesen Zellen konnte jeweils der Anteil von CD24+, IL-10+, IgD+, FoxP3+ und PD-1 zuverlässig abgegrenzt werden. Es zeigten sich jedoch in allen Ansätzen ein nur sehr geringer Anteil an CD-27+ und Granzym B+ Zellen.

### Gating T-Zell-Panel

Das T-Zell-Panel wurde gemäß folgender Hierarchie gated:



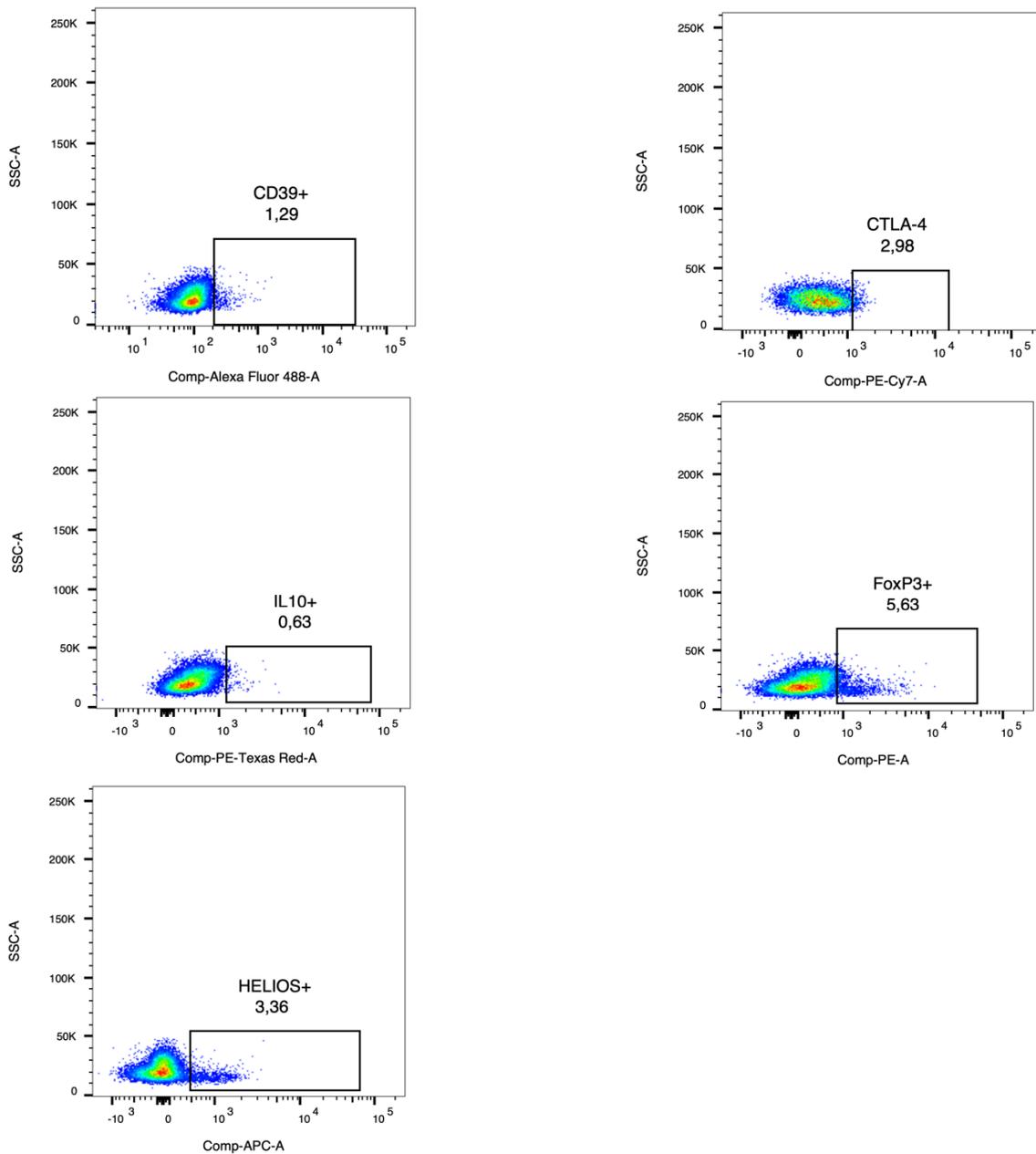


Abbildung 33: Gating T-Zellen

Als T-Zellen wurden die CD45+, CD3+ Zellen definiert. Von diesen Zellen konnte jeweils der Anteil von CD24+, IL-10+, IgD+, FoxP3+ und PD-1 zuverlässig abgegrenzt werden. Es zeigte sich jedoch in allen Ansätzen ein nur sehr geringer Anteil an CD-27+ und Granzym B+ Zellen.

### Gating ASC

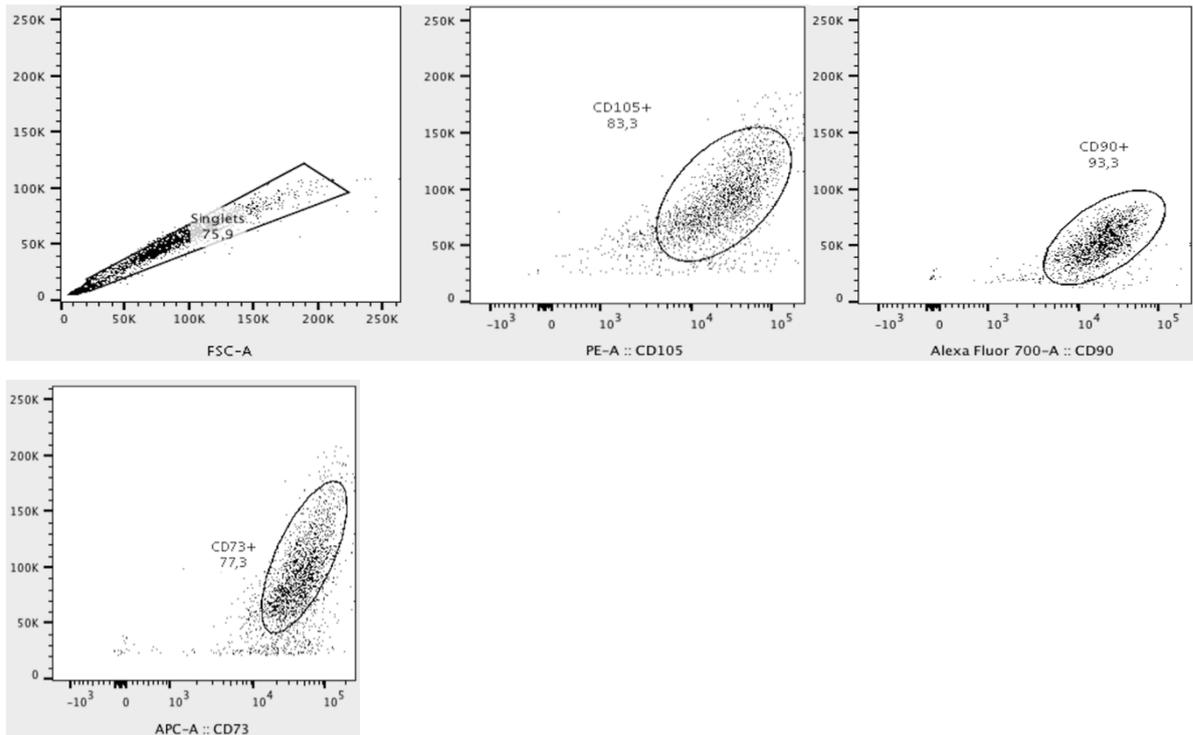


Abbildung 34: Gating mesenchymale Fettgewebstammzelle

Es konnten die Oberflächenantigene CD105, CD90 und CD73 auf den ASCs durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Damit konnten neben der Differenzierung weitere Kriterien erfüllt werden, um zu demonstrieren, dass es sich bei den isolierten Zellen und mesenchymale Stammzellen handelt.

### 5.5.2 Analyse des Einflusses von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen und mesenchymalen Fettgewebstammzellen auf Immunzellen

#### Konditioniertes Medium aus Monokultur

Um den Einfluss von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen und mesenchymalen Fettgewebstammzellen, sowohl einzeln als auch im Zusammenspiel zu untersuchen, waren zunächst einleitende Experimente mit der Probenzahl  $n=1$  notwendig im Sinne einer Machbarkeitsstudie. Dies diente zur Prüfung der Durchführbarkeit nachfolgender Experimente, indem gezeigt werden konnte, dass die Immunzellen alle angewandten Kulturbedingungen tolerierten. Hierzu erfolgten zunächst Versuche mit konditioniertem Medium aus Monokultur.

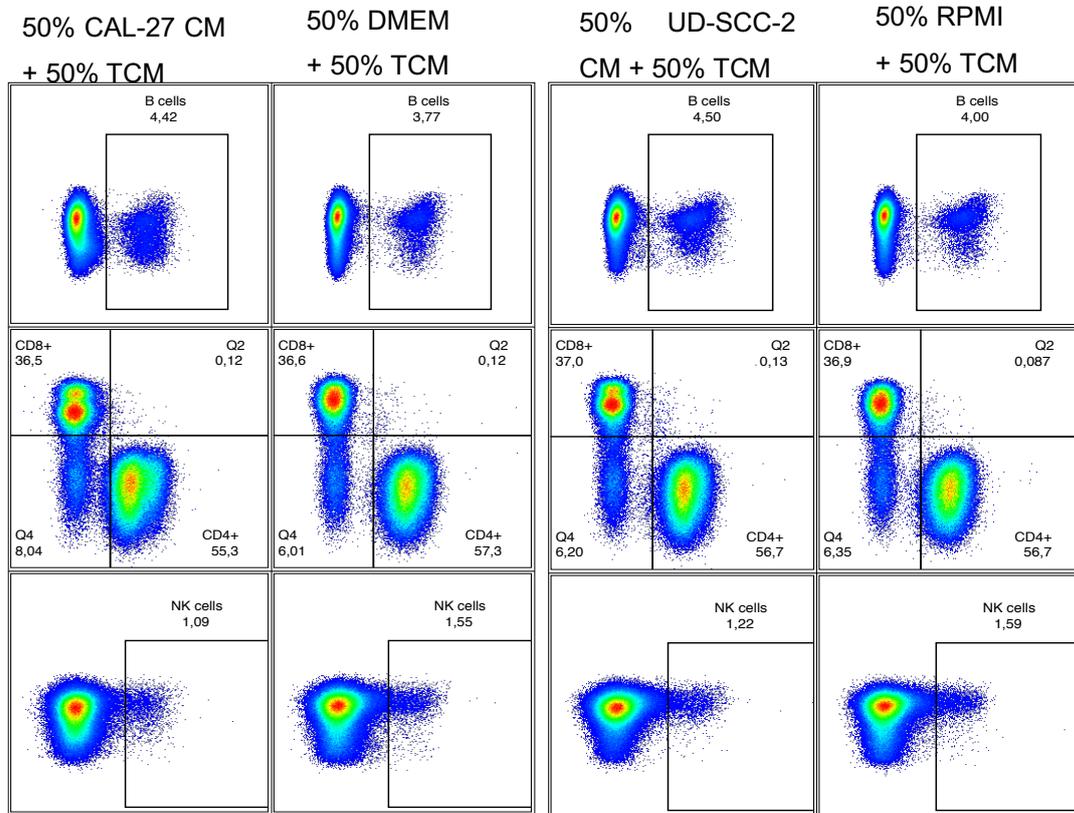


Abbildung 35: Gating Einfluss von Tumorzell-konditioniertem Medium auf PBMCs

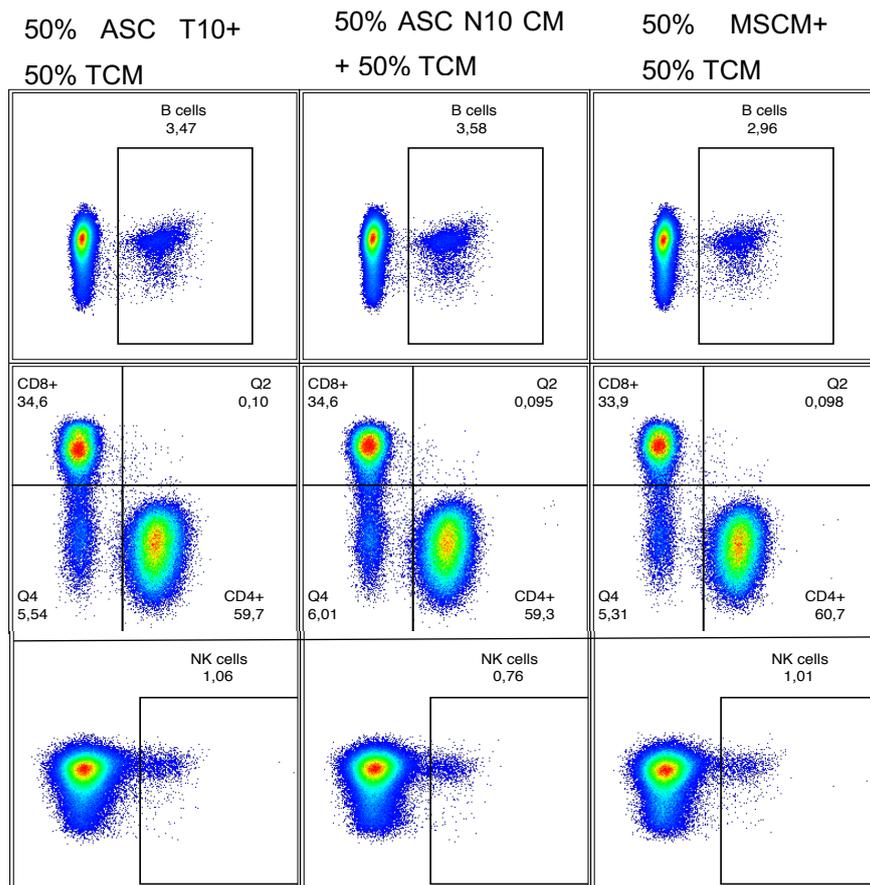


Abbildung 36: Gating Einfluss von ASC-konditioniertem Medium auf PBMCs

B-Zellen wurden als Anteil der CD19+ Zellen der CD45+ Zellen angegeben.  
 NK-Zellen wurden als Anteil der CD56+ Zellen der lebenden Zellen angegeben.  
 T-Killer- und T-Helferzellen wurden als CD8+ bzw. CD4+ Zellen der CD3+ Zellen angegeben.

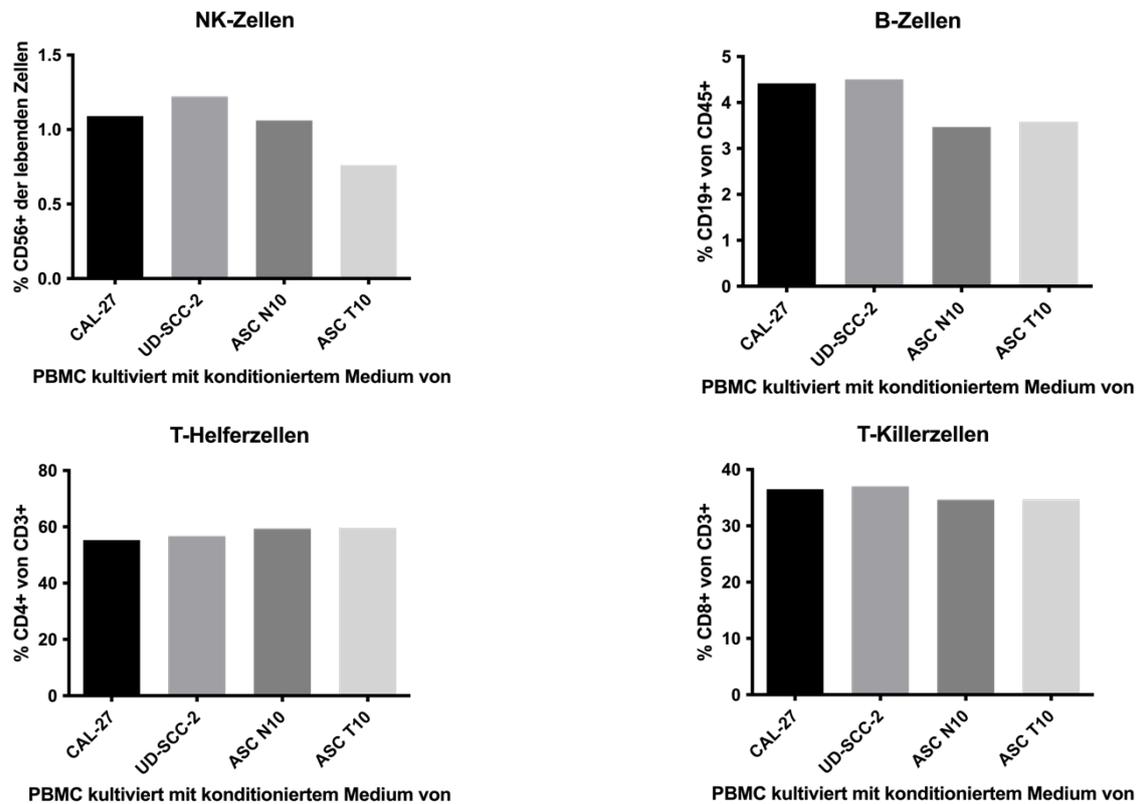


Abbildung 37: Einfluss von ASC- und Tumorzell-konditioniertem Medium auf PBMCs

Nach viertägiger Kultivierung der PBMCs mit Überständen von Tumorzellen zeigten sich nur geringe relative Unterschiede in den Populationen von CD8+/CD4+ Zellen, B-Zellen und NK-Zellen. Alle Versuchsansätze zeigten einen hohen Anteil an lebenden Zellen und eine durchweg hohe Ausbeute an analysierbaren Zellen in Relation zu den ausgesäten Zellen. Es konnte erfolgreich demonstriert werden, dass die PBMCs unter diesen Bedingungen mehrere Tage kultiviert werden können. Diese Beobachtung macht eine detaillierte Analyse mit differenzierteren Panels und der Betrachtung einzelner Phänotypen der PBMCs möglich. Bei n=1 zeigen sich keine validen Unterschiede

zwischen den Ansätzen, es kann jedoch beobachtet werden, dass die eher proinflammatorischen und antitumorösen Phänotypen NK-, B-Zellen und T-Killerzellen einen höheren Anteil der Elternpopulation darstellen, wenn die PBMCs mit Überständen von Tumorzellen, insbesondere mit der HPV-positiven Tumorzelllinie SCC-UD-2 kultiviert wurden. Um diese These zu erhärten, ist eine detaillierte Analyse mit einem größeren Kollektiv notwendig.

Co-Kultur von ASCs oder Tumorzellen mit PBMCs

Auf erfolgreiche Vorversuche mit konditioniertem Medium erfolgten Experimente mit direkter Co-Kultur von ASCs oder Tumorzellen mit den Immunzellen.

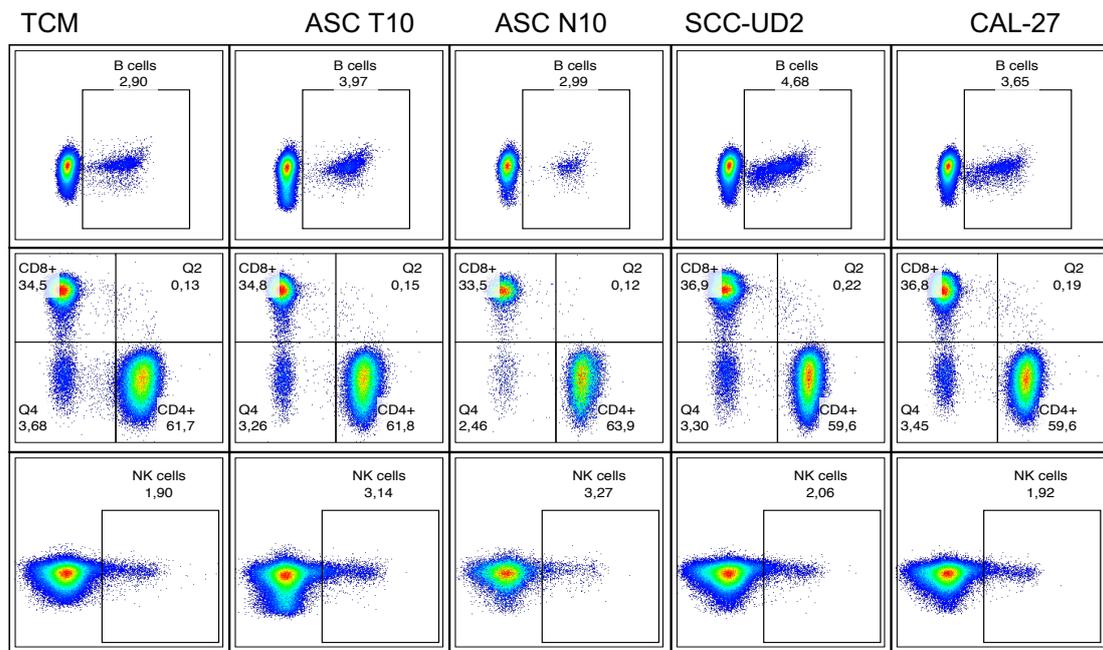
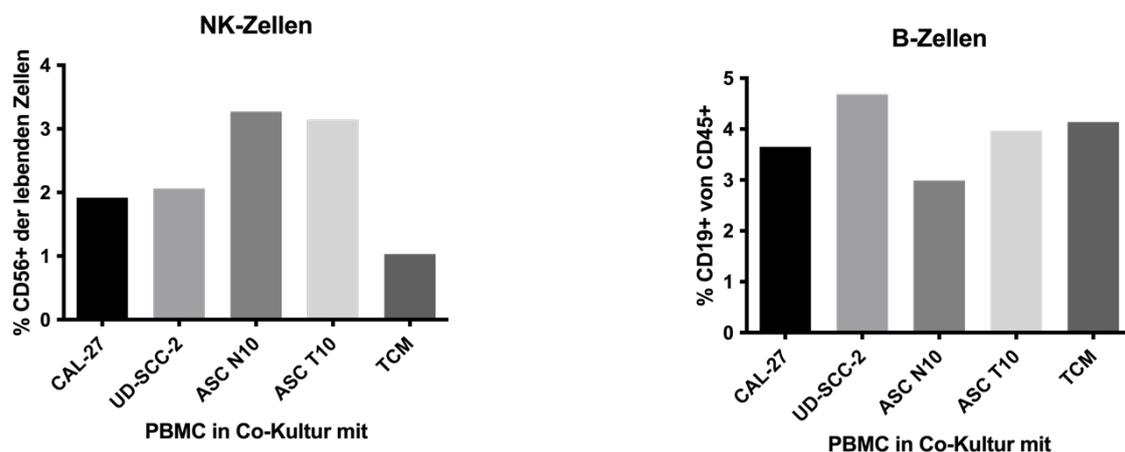


Abbildung 38: Gating Einfluss von Co-Kultivierung auf PBMCs



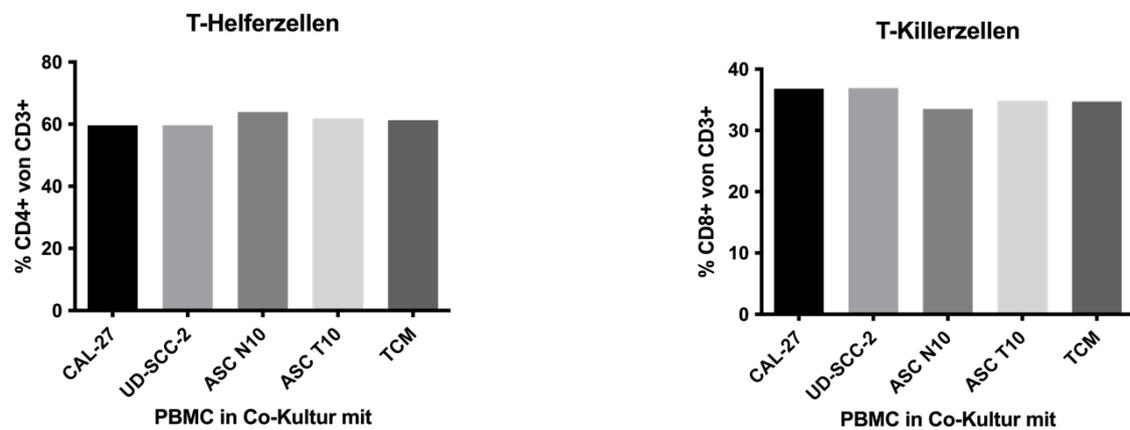


Abbildung 39: Einfluss von Co-Kultivierung auf PBMCs

Auch nach einer viertägigen Co-Kultivierung von PMBCs mit ASCs beziehungsweise Tumorzellen zeigt sich eine hohe Ausbeute an vitalen PBMCs, welche sich durchflusszytometrisch charakterisieren ließen. Es stellten sich ebenfalls nur geringe relative und absolute Unterschiede der jeweiligen Zellpopulationen zwischen den einzelnen Ansätzen dar. Der Anteil der NK-Zellen an den vitalen Zellen ist für die Co-Kultur mit ASCs höher als für die anderen Ansätze. Dies steht dem Ergebnis aus der Kultivierung der PBMCs mit konditionierten Überständen entgegen.

#### Konditioniertes Medium von Co-Kulturen

Die nächste Stufe der Komplexität in der Untersuchung der gegenseitigen Einflüsse der drei Zelltypen aufeinander, stellt die Kultivierung von Immunzellen in den konditionierten Medien der Tumorzell-ASC-Co-Kulturen dar.

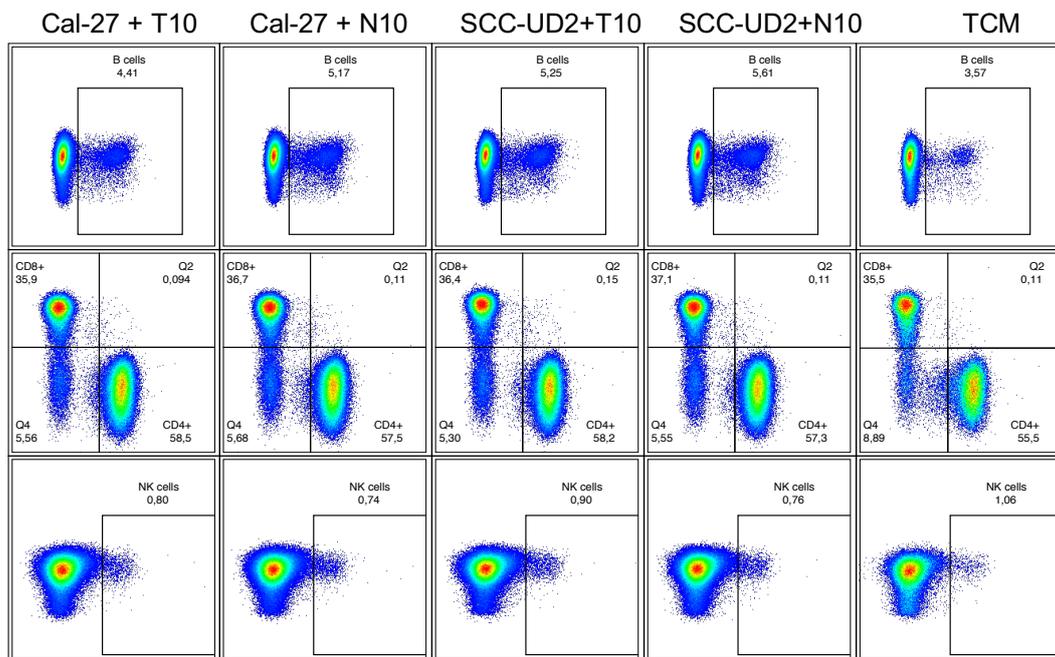


Abbildung 40: Gating Einfluss von Co-Kultur-konditioniertem Medium auf PBMCs

Um zu untersuchen, ob ASCs und Tumorzellen sich in Co-Kultur gegenseitig zur Sekretion von immunmodulatorischen Zytokinen anregen, wurden PBMCs mit den Überständen von in TCM kultivierten Co-Kulturen aus Tumorzellen und ASCs inkubiert.

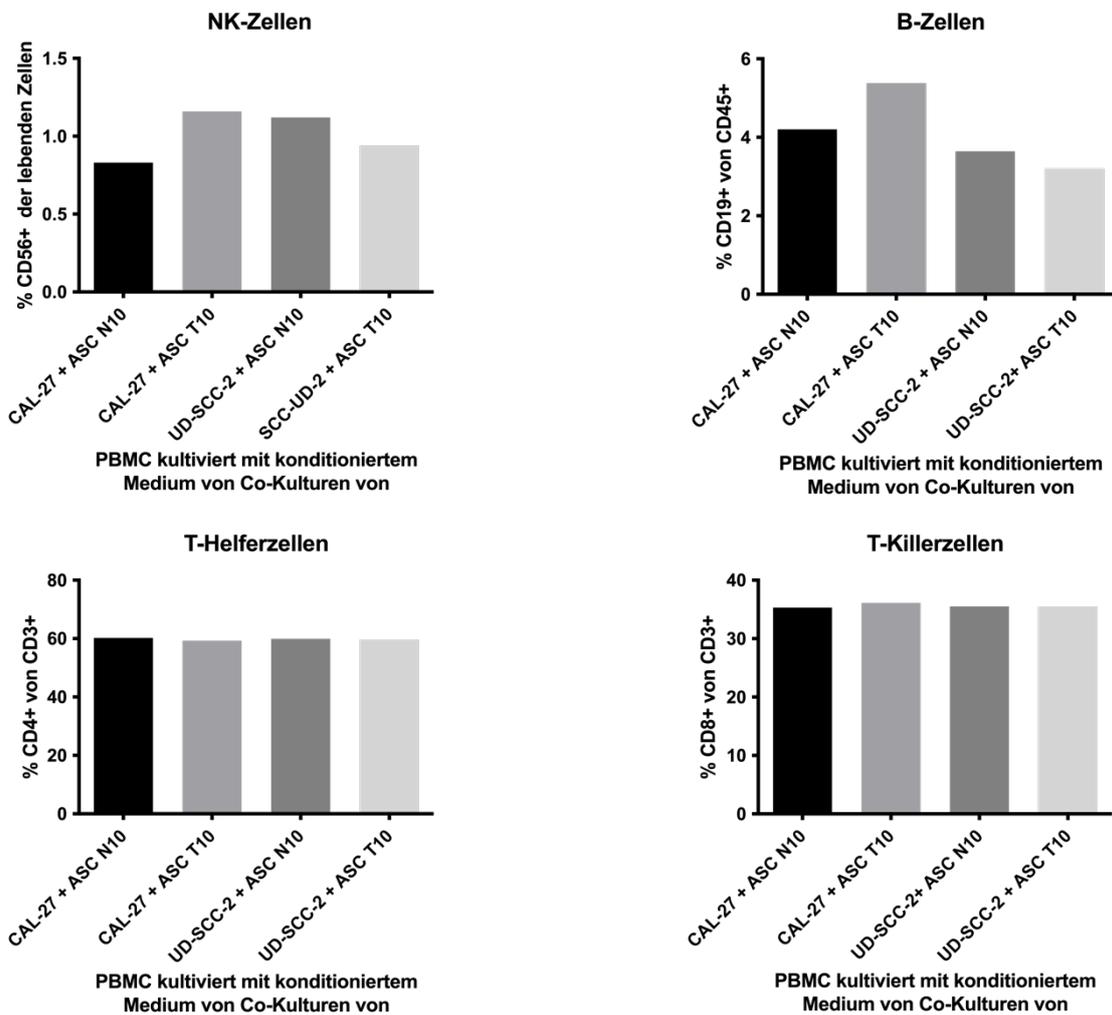


Abbildung 41: Einfluss von Co-Kultur-konditioniertem Medium auf PBMCs

Auch hier zeigte sich eine gute Auswertbarkeit der PBMCs. Es zeigen sich, wie bei den vorhergegangenen Experimenten, keine ausgeprägten Unterschiede der einzelnen Zellpopulationen.

#### Tri-Co-Kultur in TCM

Auch eine direkte Co-Kultivierung aller drei Zelltypen erfolgte im Rahmen der Vorexperimente. Dieses Experiment ließ sich ebenfalls gut umsetzen und stellt somit einen potenziellen Ansatz für die anschließende Detailanalyse dar.

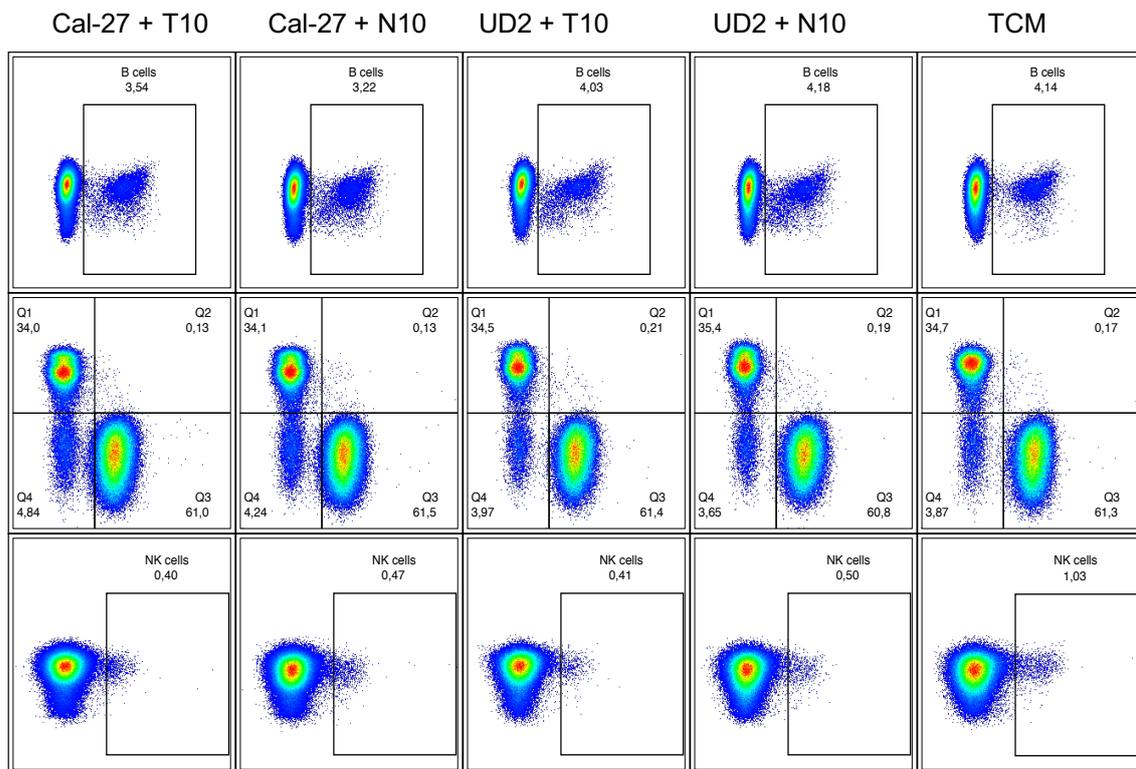


Abbildung 42: Gating Einfluss von Tri-Co-Kultivierung auf PBMCs

Reihe 2: Q1: CD8, Q3: CD4+

Um das Tumormikroenvironment *in vitro* zu simulieren, wurden zu einer 1:10 Co-Kultur von ASCs und Tumorzellen PBMCs hinzugegeben. Somit können mögliche wechselseitige immunmodulatorische Interaktionen zwischen allen drei Zelllinien analysiert werden.

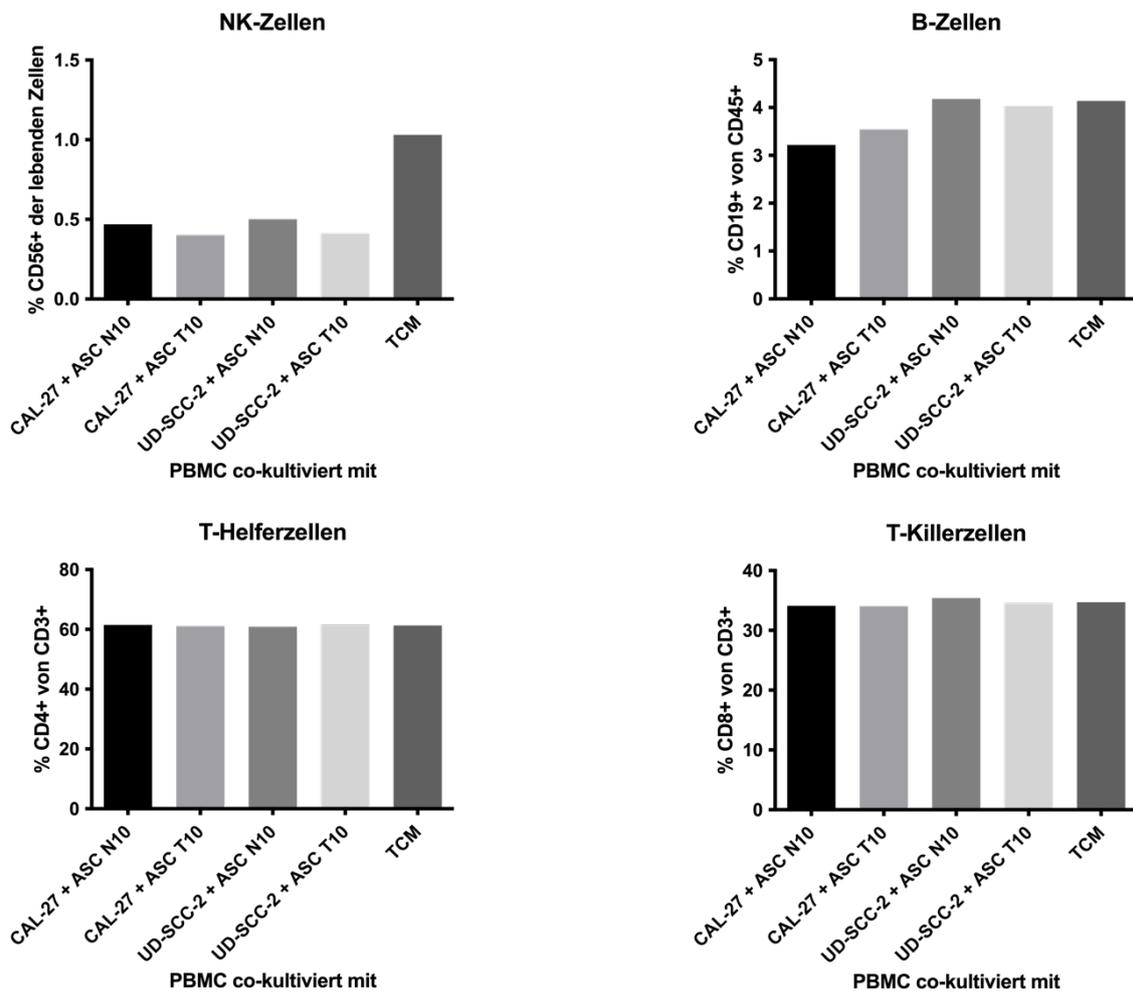


Abbildung 43: Einfluss von Tri-Co-Kultivierung auf PBMCs

Selbst unter diesen komplexen Kulturbedingungen ließen sich die PBMCs zuverlässig isolieren und analysieren. Sie wiesen nach viertägiger Kultivierung keine relevante Einschränkung der Vitalität auf. Auch die Tumorzellen und die ASCs zeigten sich morphologisch vital.

Es war eine Verminderung des NK-Zellanteils in allen Ansätzen mit drei Zelllinien zu beobachten.

### 5.5.3 Modell tumorinfiltrierender Lymphozyten in der dreidimensionalen Zellkultur

Ziel des hier dargestellten Experiments war ein *in vitro* Modell zur Untersuchung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten zu etablieren. Die Sphäroide behielten

während der viertägigen Inkubationszeit ihre kugelige Form bei und zeigten sich am Ende der Inkubationszeit an der Zellkulturschale adhärent. Die Sphäroide zeigten sich ausreichend kohärent, sodass die Trennung von Lymphozyten, welche die Sphäroide infiltrierten von jenen, welche im umgebenden Medium verblieben, gelang, ohne die Sphäroide zu zerstören.

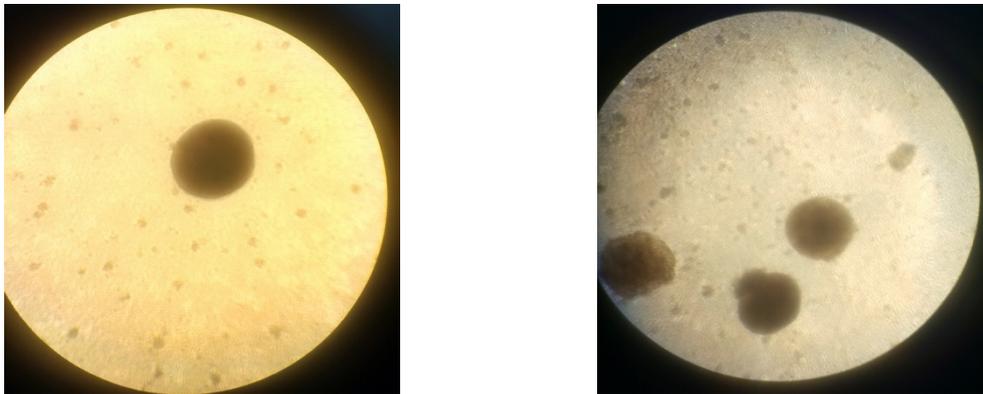


Abbildung 44: Sphäroide umgeben von PBMCs

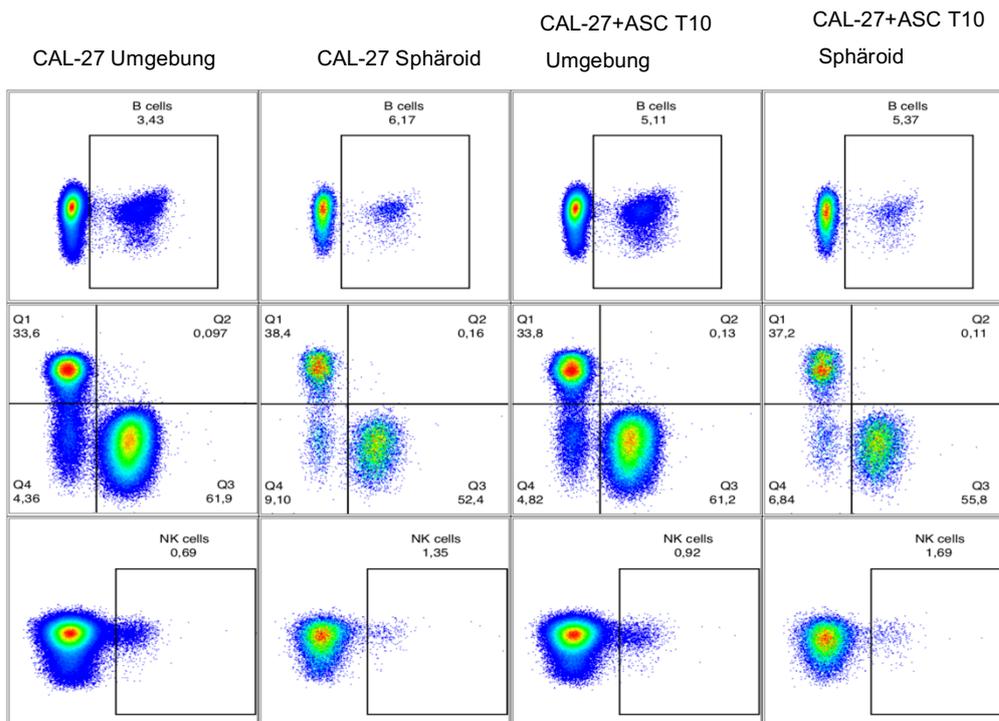


Abbildung 45: Gating PBMCs in der Umgebung verglichen mit in vitro TILs

Reihe 2: Q1: CD8, Q3: CD4+

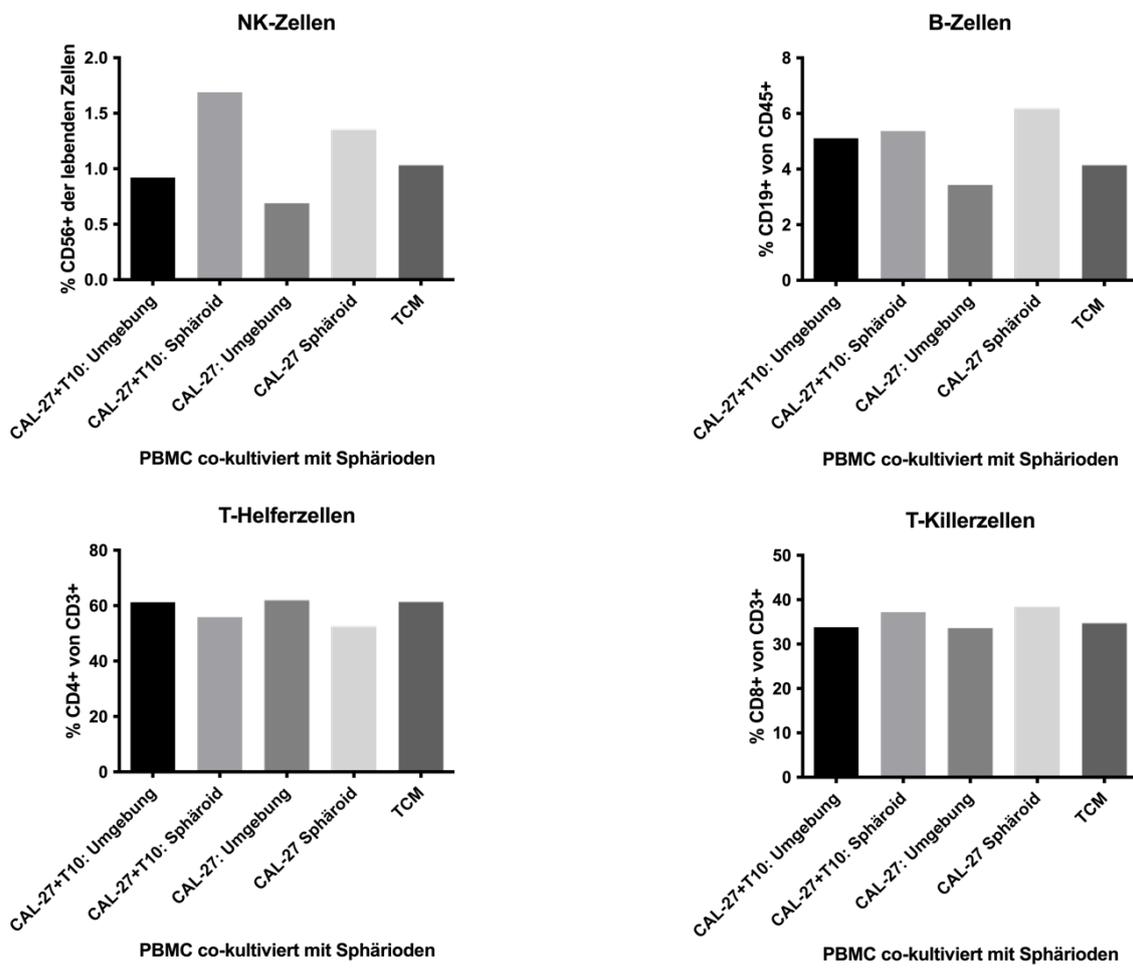


Abbildung 46: PBMCs in der Umgebung verglichen mit in vitro TILs

Um ausreichend Lymphozyten für die Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie zu erhalten, wurden sieben (CAL-27) beziehungsweise neun (CAL-27 & ASC-T10) Sphäroide verwendet. Die so erreichten Zellzahlen an CD45+ Lymphozyten betragen für CAL-27 Sphäroide 18.204 und für die Co-Kultursphäroide 17.989. Damit erhielt man auch für die kleinste Subpopulation der NK-Zellen folgende Zahlen: 258 (CAL-27) und 308 (CAL-27 & ASC-T10). Verglichen mit der jeweiligen Umgebung fand sich in den Sphäroiden ein höherer Anteil an NK-Zellen und an zytotoxischen T-Zellen. Korrespondierend dazu war der Anteil an T-Helferzellen in dem umgebenden Medium höher. Ausgeprägte Unterschiede zwischen einem reinen Tumorzellsphäroid und einem Co-Kultursphäroid waren nicht zu erkennen. Diese Ergebnisse demonstrieren die Durchführbarkeit dieses Experimentaufbaus zur *in vitro* Simulation von tumorinfiltrierenden Lymphozyten. Aussagen über die statistische Signifikanz der beschriebenen Unterschiede ist bei dieser Pilotstudie (n=1) nicht möglich.

#### 5.5.4 Detailanalyse des Einflusses von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen und mesenchymalen Fettgewebstammzellen auf Immunzellen

Zur näheren Untersuchung, welche Rolle ASCs in der Immunmodulation innerhalb der Tumormikroumgebung haben könnten, wurden PBMCs erneut dem konditionierten Medium von Tumorzellen und von Co-Kulturen von Tumorzellen und ASCs ausgesetzt. In den folgenden Experimenten erfolgte eine detaillierte Analyse der Veränderung der Immunzellphänotypen nach viertägiger Co-Kultivierung. Für diese Detailanalyse wurde aus den oben aufgeführten Vorexperimenten der Ansatz mit konditioniertem Medium ausgewählt. Dieser bietet gegenüber der direkten Co-Kultivierung den Vorteil der deutlich einfacheren Handhabbarkeit, was bei größeren Versuchsansätzen die Realisierbarkeit gewährleistet und die Zuverlässigkeit erhöht.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte zum einen als prozentualer Anteil der jeweiligen Elternpopulation. Zum anderen ist die relative Änderung des Anteils zu dem entsprechenden Anteil unter Standardbedingungen für den jeweiligen Probanden berechnet worden. Da sich die Anteile der einzelnen Phänotypen von Spender zu Spender unterscheiden, erfolgt durch die Bezugnahme auf den korrespondierenden Kontrollansatz und der Darstellung der relativen Veränderungen eine bessere Repräsentation des Effekts, welcher durch das konditionierte Medium hervorgerufen wurde.

NK-Zell-Panel

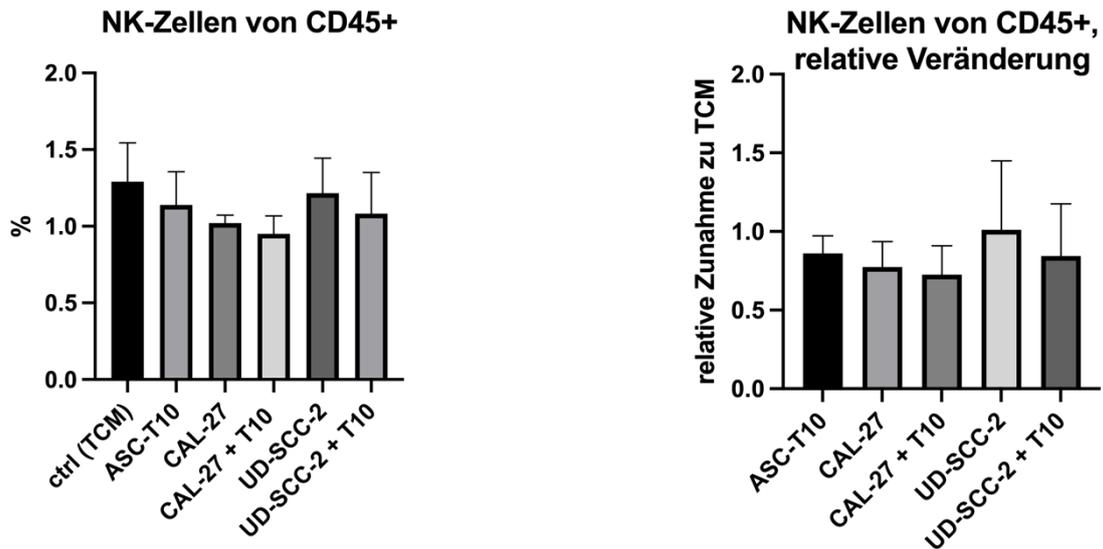


Abbildung 47: Einfluss von konditioniertem Medium auf den Anteil an NK-Zellen

Für NK-Zellen (CD3-, CD56+, CD335+) war keine signifikante relative oder absolute Veränderung zu beobachten. Es war eine geringe, nicht signifikante Abnahme der NK-Zellen in allen konditionierten Medien zu verzeichnen, mit Ausnahme des konditionierten Mediums der HPV-positiven Zelllinie.

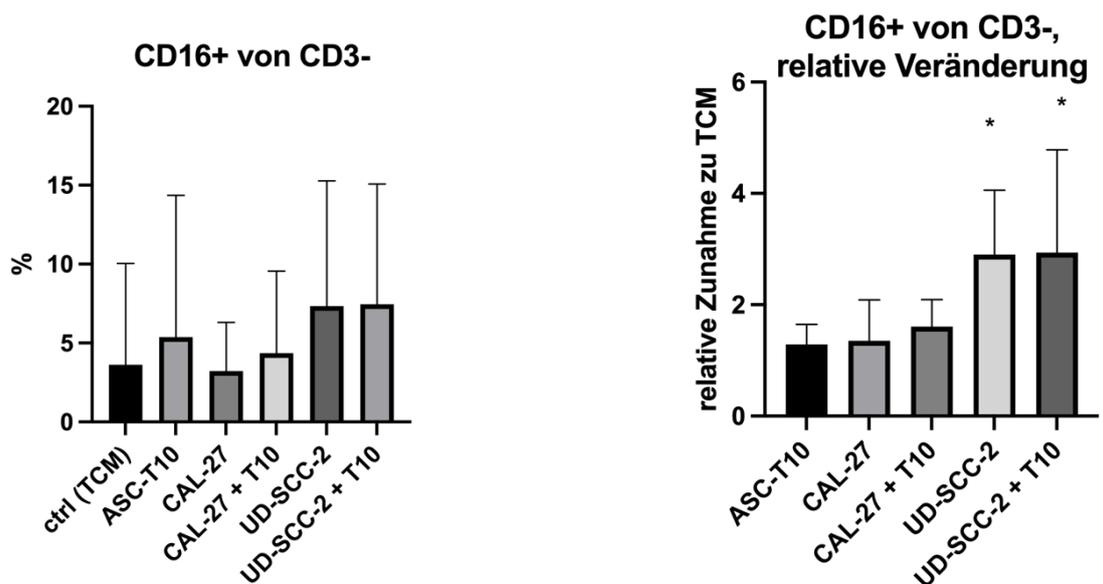


Abbildung 48: Einfluss von konditioniertem Medium auf den CD16+ Anteil der CD3- negativen Zellen

Die CD3-, CD16+ Zellen definieren eine Subgruppe der NK-Zellen mit hohem zytotoxischem Potential.

Durch die konditionierten Medien der HPV-positiven Zelllinie gab es eine signifikante Zunahme dieses Zelltyps. Ob die Tumorzellen allein, oder mit ASCs co-kultiviert wurden, brachte keinen signifikanten Unterschied.

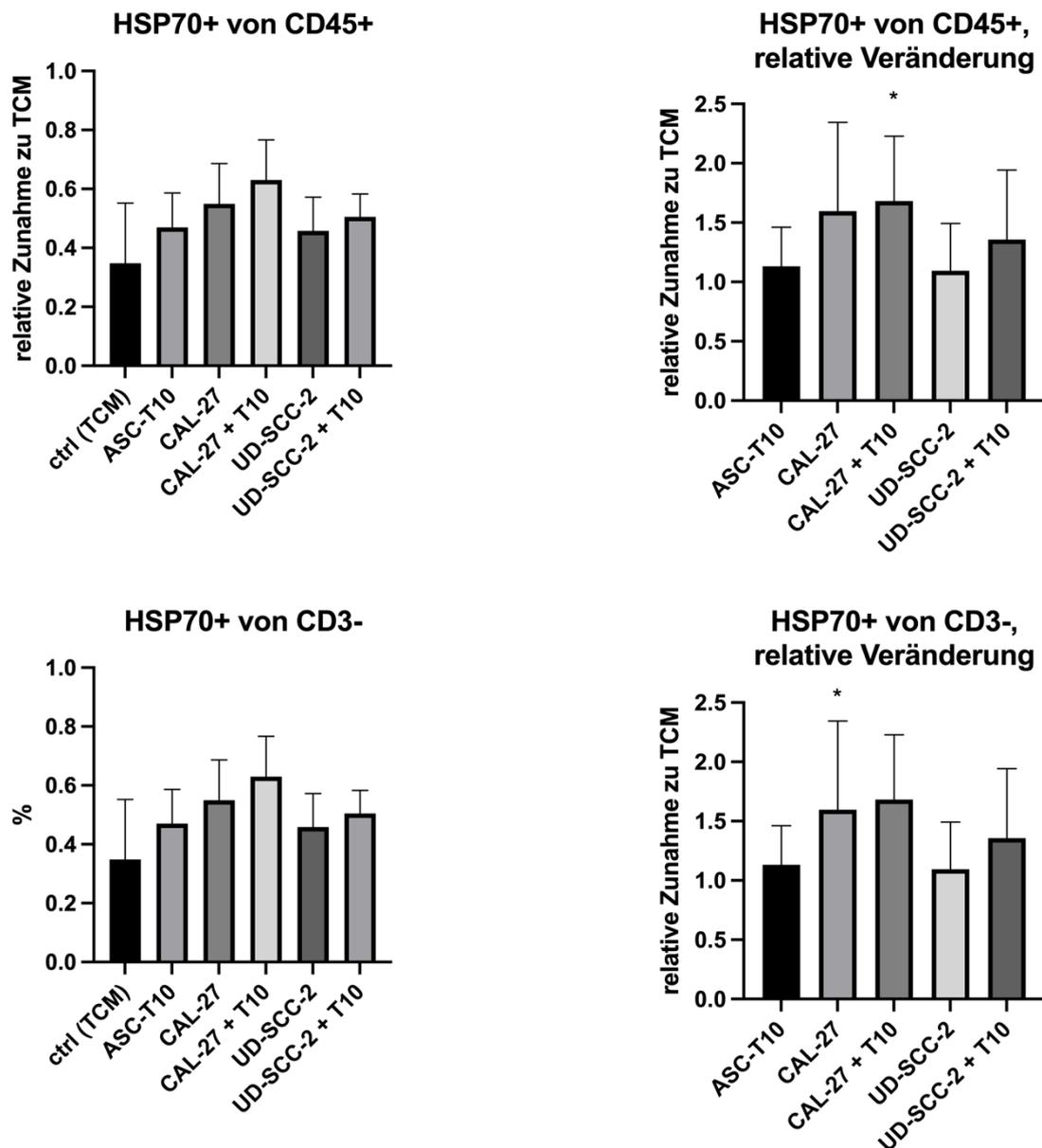


Abbildung 49: Expression von HSP70 bei Lymphozyten und bei CD3- Lymphozyten

HSP70 hat eine antiapoptotische Funktion und ist ein aktivierendes Signal für die Immunantwort.

Die Quantifizierung des HSP70 auf der Zelloberfläche der Lymphozyten zeigte eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der Expression auf Lymphozyten nach Kultivierung mit konditioniertem Medium von CAL-27 & ASC Co-Kulturen. Bei

Betrachtung der Expression auf CD3-Lymphozyten zeigte sich für CAL-27 konditioniertes Medium ein signifikanter Anstieg. Es war zu beobachten, dass die HSP70 Expression durch konditioniertes Medium von Co-Kulturen stärker erhöht war als durch konditioniertes Medium der Tumorzellen. Das konditionierte Medium von CAL-27 führte zu einer stärkeren HSP70 Expression als jenes von UD-SCC-2.

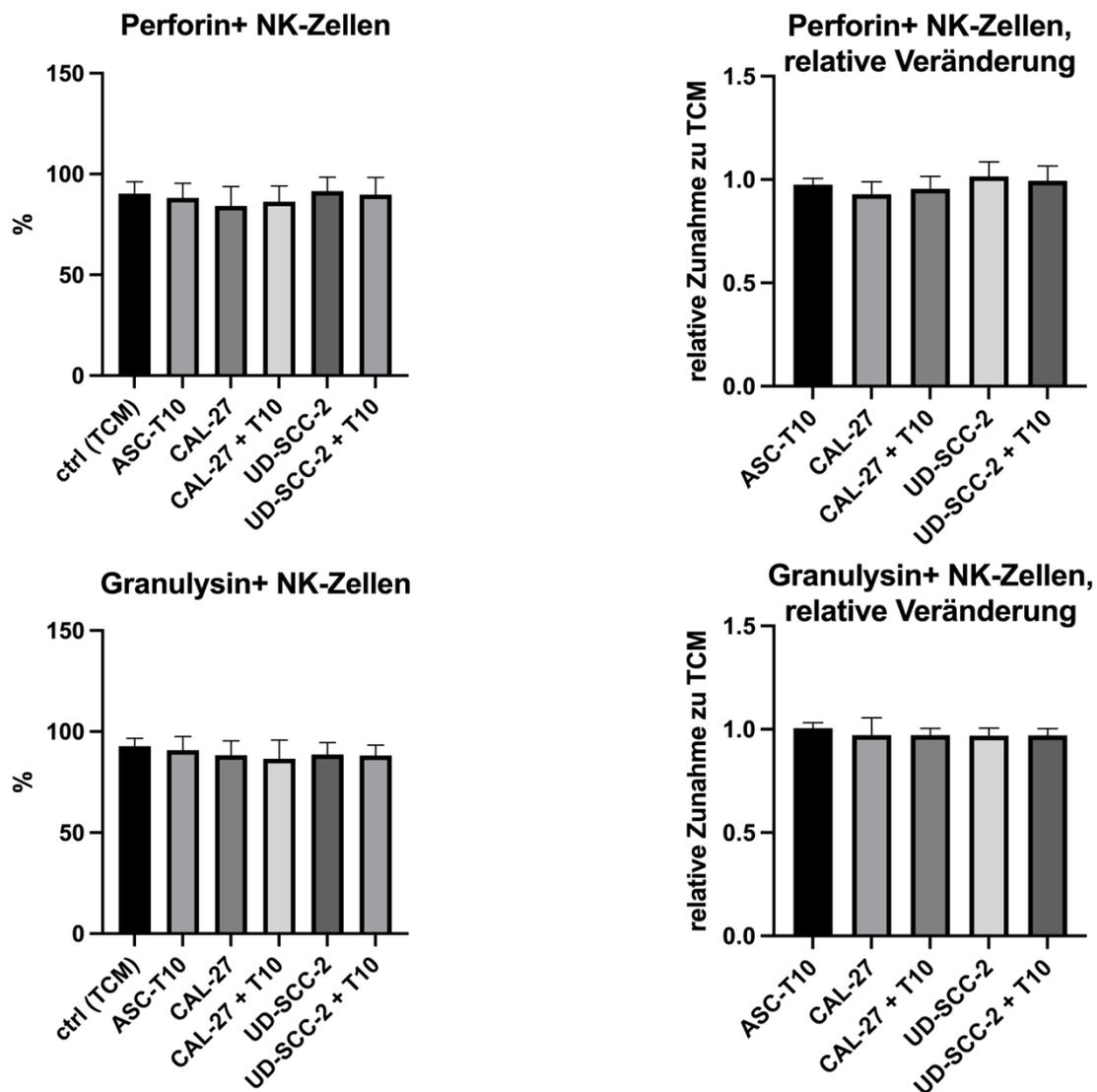


Abbildung 50: Expression von Granulysin und Perforin in CD3-, CD56+, CD335+ Lymphozyten

In der direkten Zytotoxizität von NK-Zellen spielen Perforin und Granulysin eine zentrale Rolle. In den untersuchten Proben konnte in nahezu allen NK-Zellen sowohl Perforin als auch Granulysin nachgewiesen werden. Die Kultivierung mit dem konditionierten Medium hatte darauf keinen Einfluss.

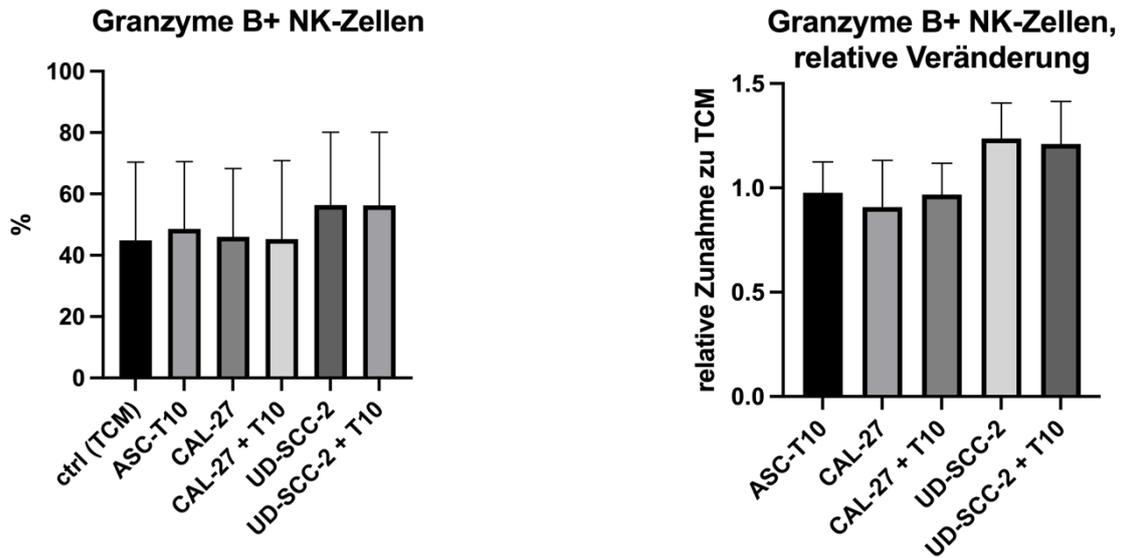


Abbildung 51: Expression von Granzyme B in CD3-, CD56+, CD335+ Lymphozyten

Die Protease Granzyme B ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil in der direkten Zytotoxizität von NK-Zellen. In dem hier aufgeführten Experiment wurde die Granzym B Expression in CD3- Zellen quantifiziert. In diesen Zellen kann angenommen werden, dass der antitumoröse Effekt überwiegt. Der Anteil an Granzym B positiven Zellen erhöhte sich durch konditioniertes Medium der HPV-positiven Zelllinie, die Veränderung war jedoch nicht statistisch signifikant.

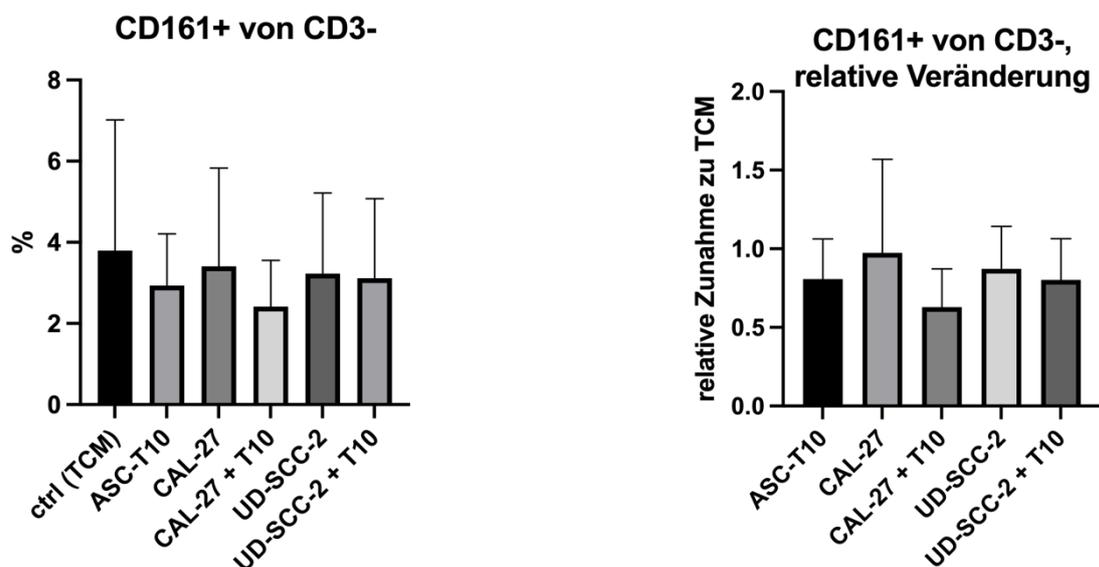


Abbildung 52: Expression von CD161 bei CD3- Lymphozyten

CD161+ CD3- Zellen definieren eine pro-inflammatorische Untergruppe der NK-Zellen.

Die Exposition zu konditionierten Medien führte zu keiner signifikanten Veränderung des Anteils dieses Phänotyps.

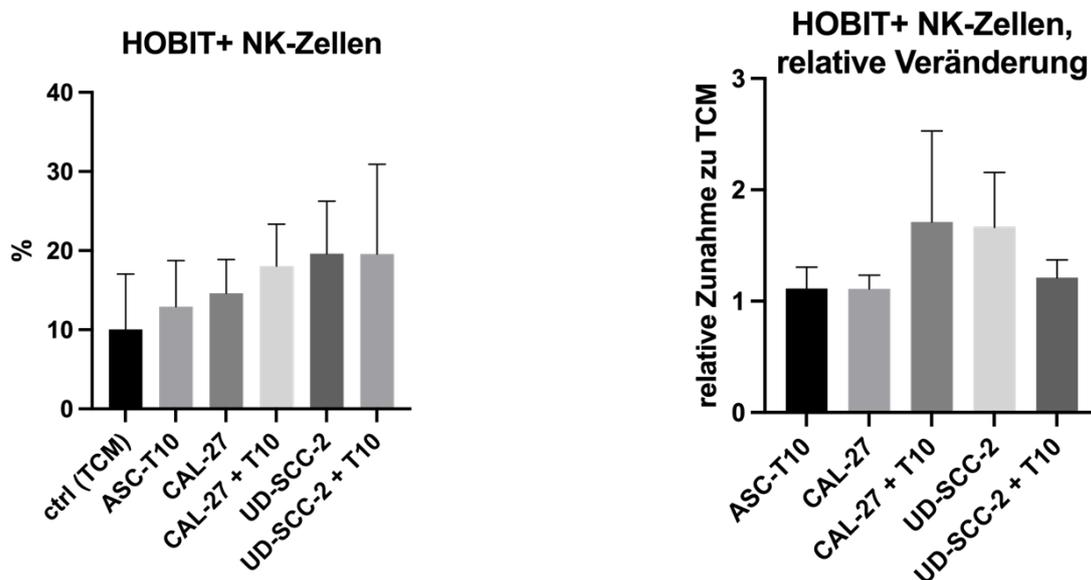


Abbildung 53: Expression von HOBIT in CD3-, CD56+, CD335+ Lymphozyten

HOBIT ist im Reifungsprozess von NK-Zellen hochreguliert. Nach Kultivierung von PBMCs mit konditioniertem Medium von CAL-27 & ASC-T10 Co-Kulturen, sowie von UD-SCC-2 Kulturen zeigte sich eine statistisch nicht signifikante Erhöhung dieses Transkriptionsfaktor in NK-Zellen.

T-Zell-Panel

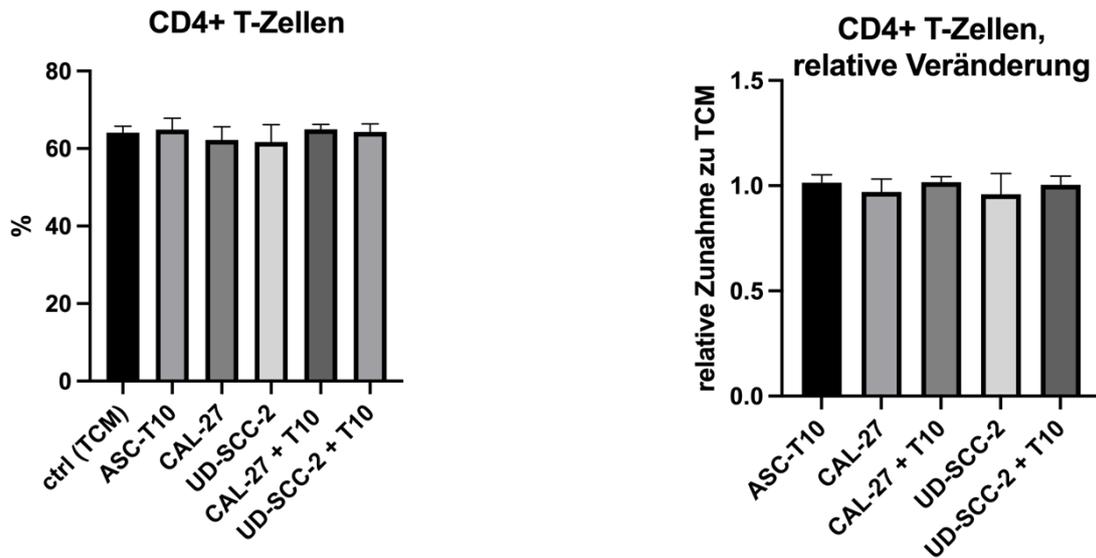


Abbildung 54: Expression von CD4 bei CD3+ Lymphozyten

In der Analyse des Anteils der CD4+ T-Helferzellen ist, wie in den weiter oben aufgeführten Experimenten, keine Änderung zu verzeichnen. Zur genaueren Untersuchung sind im Folgenden die Subgruppen der T-Helferzellen aufgeführt.

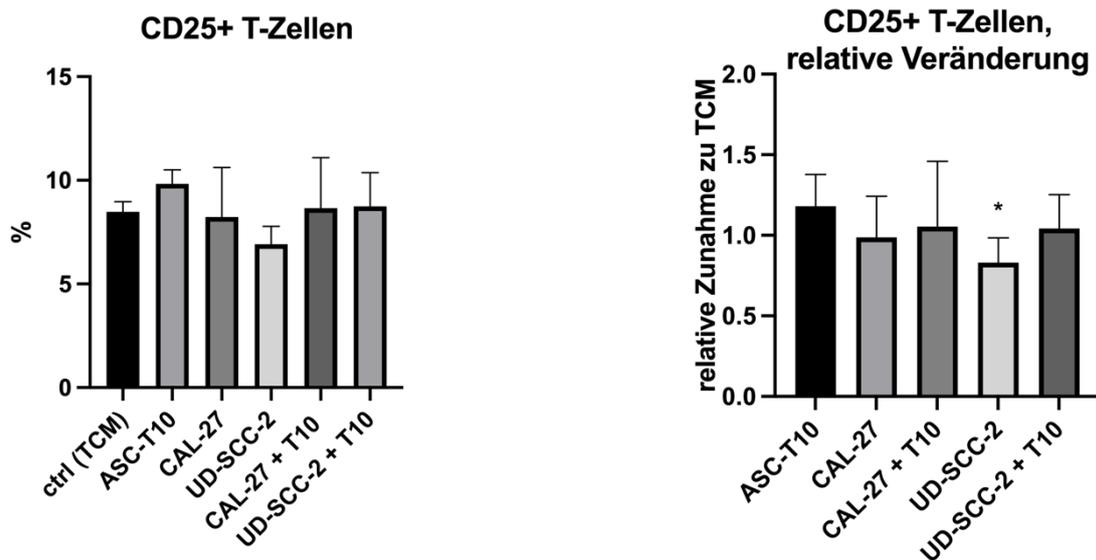


Abbildung 55: Expression von CD25 bei CD3+ Lymphozyten

Bei der Betrachtung der CD4+ CD25+ regulatorischen T-Zellen zeigt sich eine signifikante Verringerung durch die Kultivierung mit konditioniertem Medium der HPV-positiven Zelllinie UD-SCC-2 im Vergleich zum Standardmedium. Die mit

ASC konditioniertem Medium kultivierten PBMCs wiesen den höchsten Anteil an regulatorischen T-Zellen auf.

Das Medium der Co-Kulturen führte zu einer nicht-signifikanten Steigerung der regulatorischen T-Zellen gegenüber dem Medium der reinen Tumorzellkulturen.

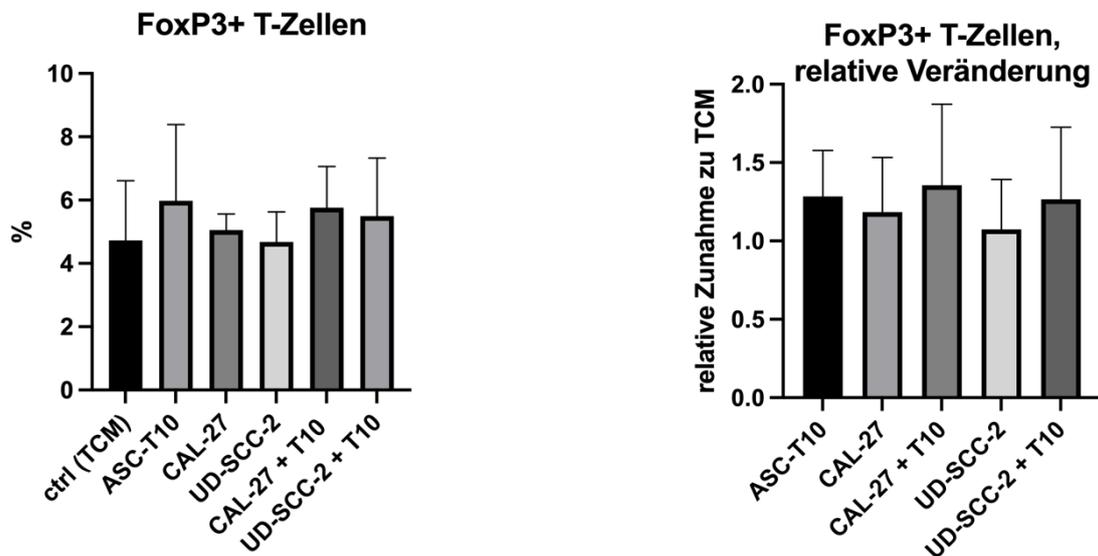


Abbildung 56: Expression von FoxP3 bei CD3+ Lymphozyten

Der Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein 3 definiert spezifisch regulatorische T-Zellen. Die Ergebnisse für die über FoxP3 definierten regulatorischen T-Zellen sind nahezu identisch mit der oben aufgeführten Auswertung der CD25+ regulatorischen T-Zellen. Bei etwas höheren Standardabweichungen und kleinem Kollektiv (n=6) zeigten sich hier jedoch keine signifikanten Unterschiede.

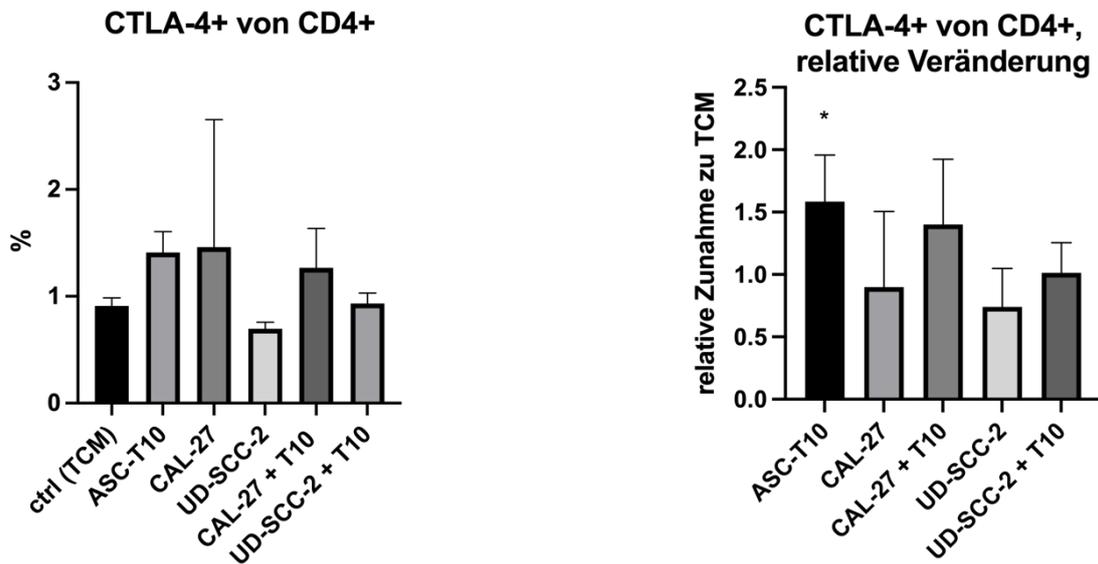


Abbildung 57: Expression von CTLA-4 bei CD3+ CD4+ Lymphozyten

Die Expression des Immuncheckpoint-Rezeptors CTLA-4 war auf den CD4+ Zellen nach Kultivierung mit präkonditioniertem Medium von ASC-T10 statistisch signifikant um das 1,58-fache gesteigert. Analog zu den Ergebnissen der Marker regulatorischer T-Zellen wurde die Expression von CTLA-4 durch Medien der Co-Kultivierung mit ASCs im Vergleich zu Medien von reinen Tumorzellkulturen erhöht. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

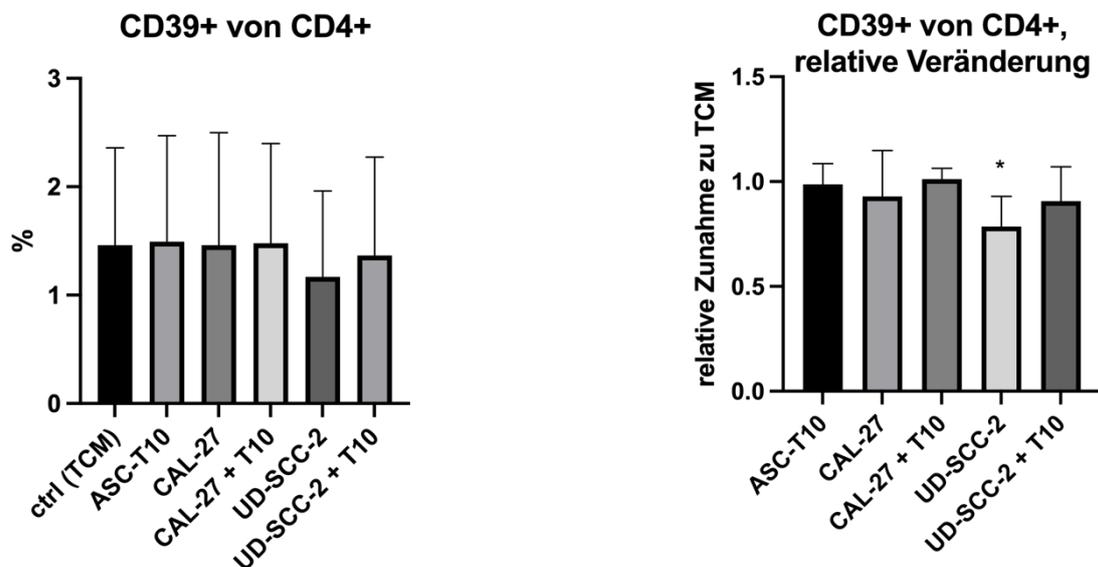


Abbildung 58: Expression von CD39 bei CD3+ CD4+ Lymphozyten

CD39+ T-Helferzellen können einen immunsupprimierenden Effekt haben. Nach der Kultivierung mit konditioniertem Medium von UD-SCC-2, zeigte sich signifikant weniger CD39+ auf den untersuchten T-Helferzellen.

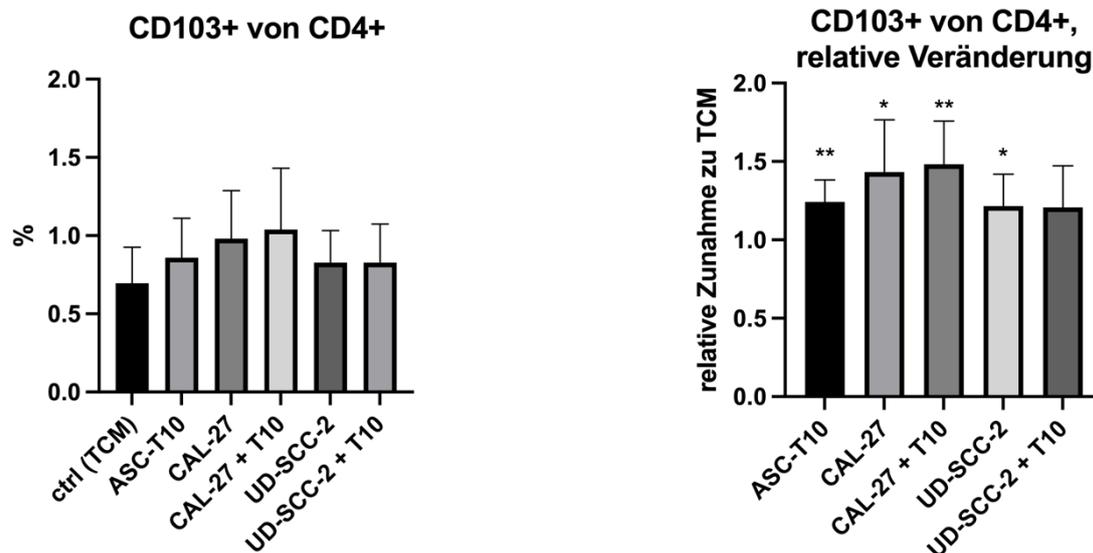


Abbildung 59: Expression von CD103+ bei CD3+ CD4+ Lymphozyten

CD103+ T-Zellen können eine inhibierende Wirkung auf T-Effektorzellen haben. Die Expression von CD103 wird durch TGF-beta gefördert. Gegenüber dem Kontrollansatz erhöhte sich für alle konditionierten Medien die CD103 Expression signifikant, außer für das Co-Kulturmedium UD-SCC-2 + T10. Die deutlichste Erhöhung auf das 1,5-fache zeigte sich für konditionierte Medien mit CAL-27, sowohl in der Mono- als auch in der Co-Kultur.

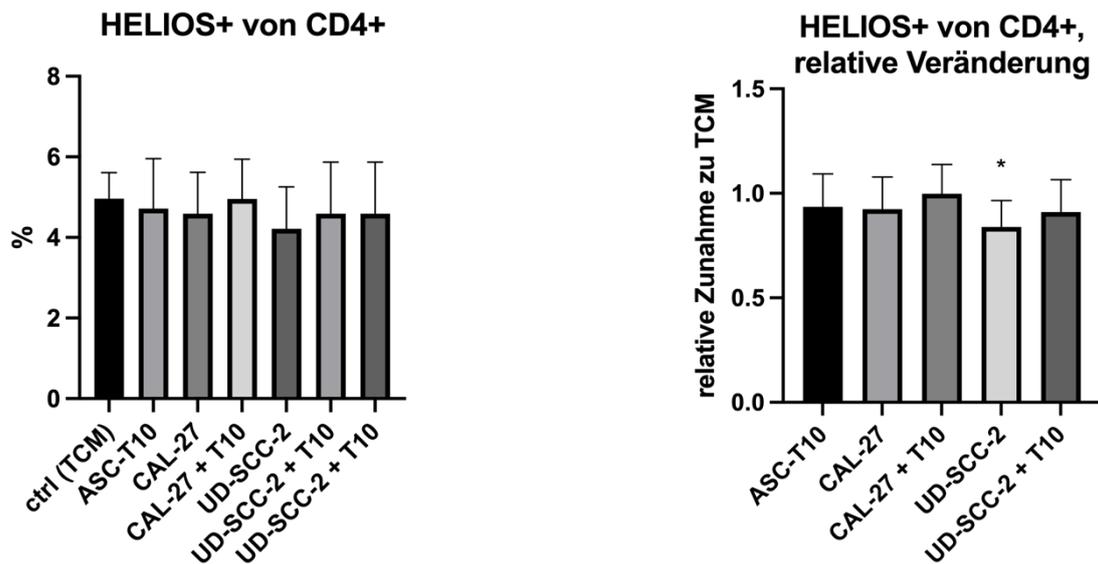


Abbildung 60: Expression von HELIOS in CD3+ CD4+ Lymphozyten

Der Transkriptionsfaktor HELIOS wird von regulatorischen T-Zellen exprimiert, welche aus Thymus stammen.

Die HELIOS Expression ist in PBMCs, welche mit UD-SCC-2 konditioniertem Medium kultiviert wurden, signifikant verringert (Faktor 0,83).

B-Zell-Panel

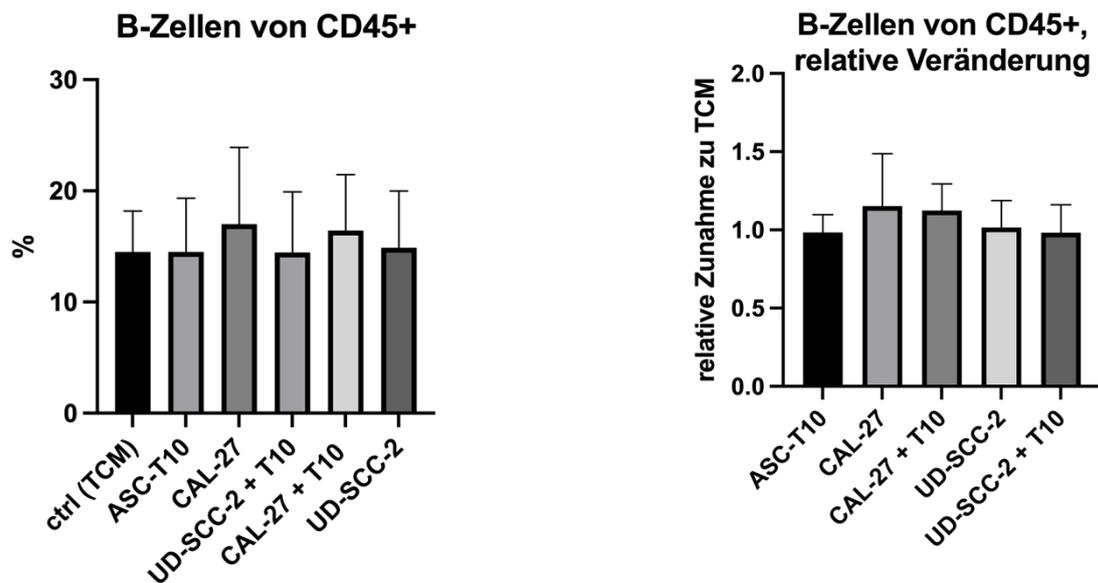


Abbildung 61: Anteil von CD20+, CD19+ von CD45+ Zellen

Für die über CD20+ und CD19+ definierten B-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen konditionierten Medien.

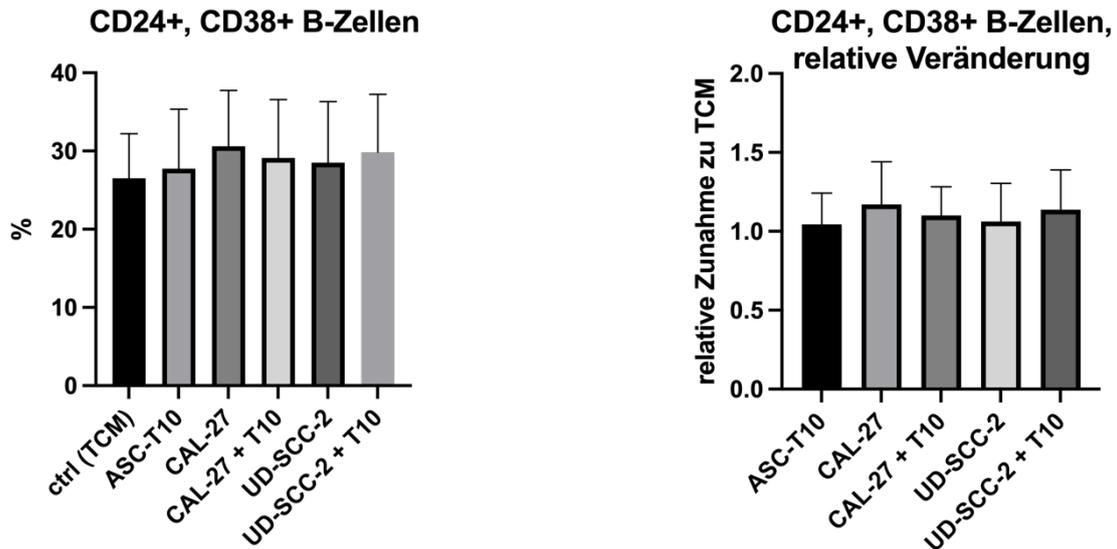


Abbildung 62: Anteil von CD24+, CD38+ von CD19+, CD20+ Zellen

CD24+, CD38+ B-Zellen können an der lokalen Immunsuppression der Tumormikroumgebung beteiligt sein.

Die Kultivierung mit konditionierten Medien führte zu keiner signifikanten Veränderung der CD24+, CD38+ B-Zellen.

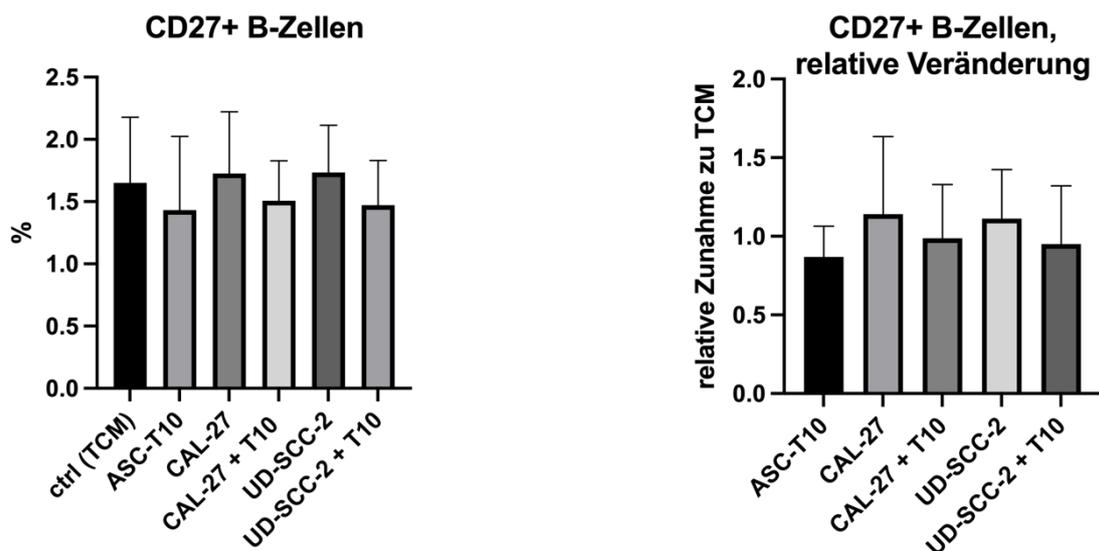


Abbildung 63: Anteil von CD27+ von CD19+, CD20+ Zellen

CD27 kommt gehäuft auf B-Gedächtniszellen vor und kann CD8+ Zellen aktivieren.

Die Expression von CD27 zeigte keine signifikante Veränderung in diesem Experiment. Die Expression war für ASC-T10 konditioniertes Medium am

geringsten und für das konditionierte Medium der Tumorzellmonokulturen am höchsten.

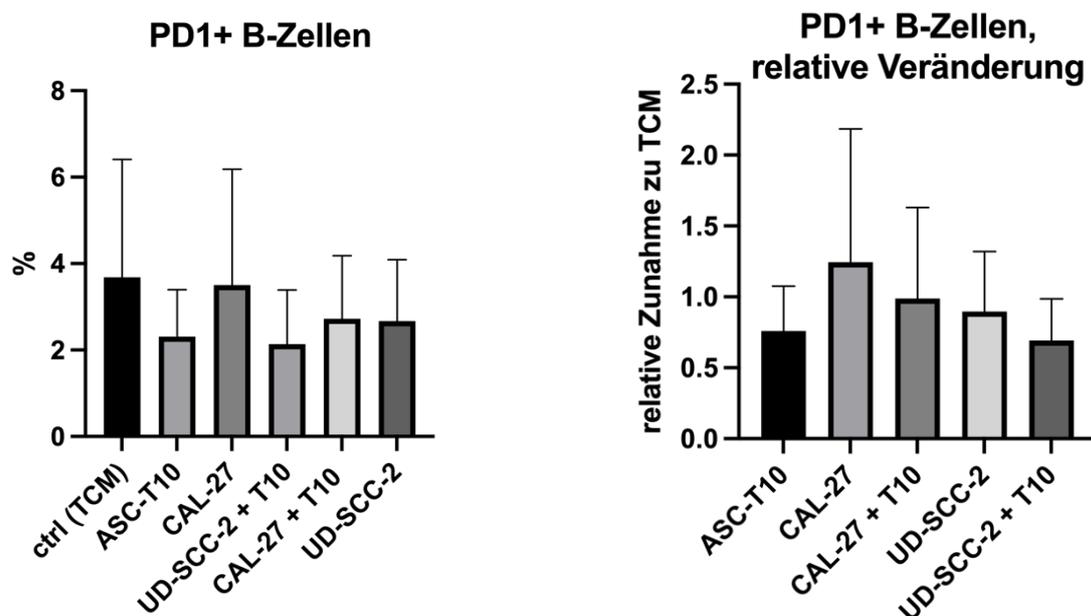


Abbildung 64: Expression von PD1 auf CD19+, CD20+ Zellen

PD-1 Expression auf B-Zellen trägt zu tumorfördernden Lokalbedingungen bei. Bei hoher Standardabweichung zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die Expression von PD-1 nach Kultivierung mit konditionierten Medien.

## 5.6 Zytokinanalyse in konditionierten Medien

Um herauszufinden, über welche Botenstoffe in der Interaktion von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen und mesenchymalen Fettgewebstammzellen mit Immunzellen reguliert werden könnte, erfolgte eine quantitative Analyse bestimmter Zytokine. Hierzu wurden zunächst Eichkurven aus einer Verdünnungsreihe von Doublets erstellt. Danach wurden die konditionierten Medien unverdünnt und in einer 1:4 Verdünnung (Faktor 5) auf folgende Zytokine analysiert:

Free-active TGF-beta, IL-6, IL-8, IL-22, INF-gamma, EGF, VEGF, CCL2, SDF-1, PD-1, MIP3-alpha.

Das Tissue Culture Medium (TCM) besteht aus DMEM mit hitzeinaktiviertem humanem Serum. Hierin sollten sich durch Hitzedenaturierung keine funktions-, beziehungsweise nachweisfähigen Zytokine befinden.

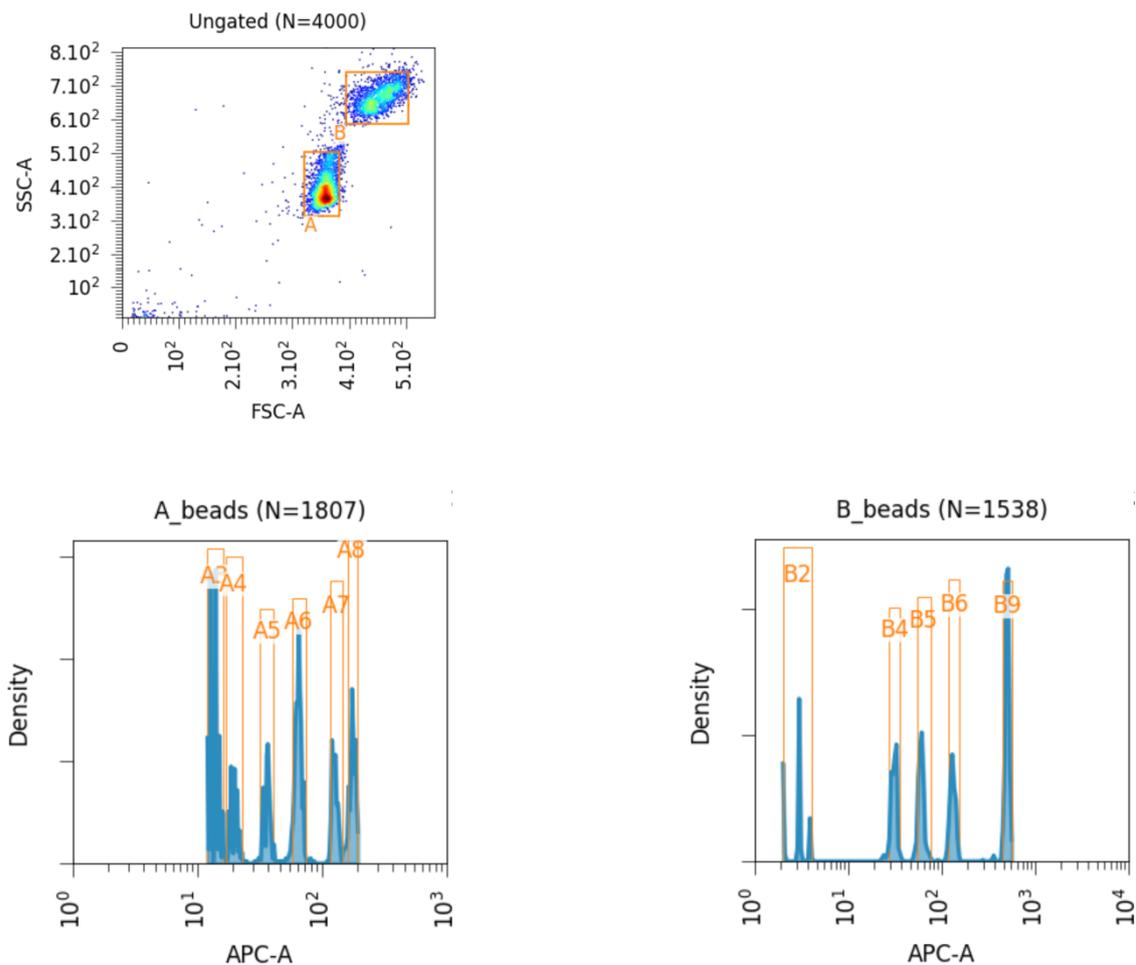


Abbildung 65: Gating Übersicht Legendplex

In Abbildung 65 ist oben links die Gesamtzahl der aufgenommenen Events dargestellt, diese sollten pro spezifischem Bead bei ca. 300 bis 400 liegen, daher wurden für das 11-fach Panel 4000 Events aufgenommen. Die Aufteilung in A und B Beads erfolgte über die Größe und Granularität. Die Unterteilung in A3 - A8, beziehungsweise B2, B4 - B6 und B9 erfolgt über die APC-Intensität, die Quantifizierung erfolgt dann über die Intensität des PE-Signals, welches in den hier abgebildeten Beispielgraphen als „Density“ bezeichnet wird.

Free active TGF-beta

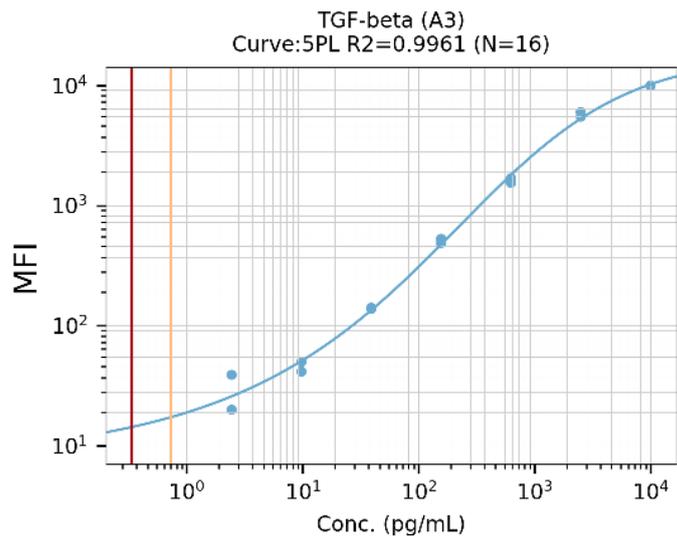


Abbildung 66: Eichkurve TGF-beta

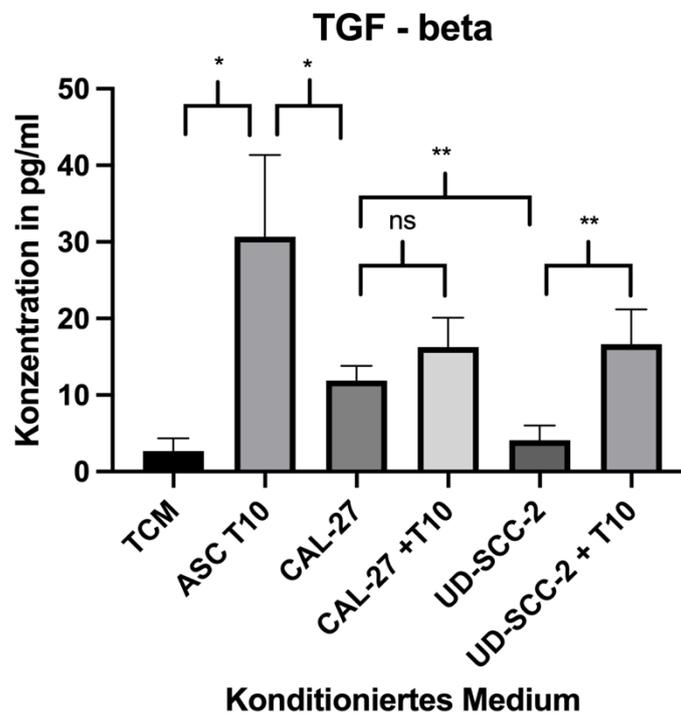


Abbildung 67: TGF-beta Konzentrationen der konditionierten Medien

Außer den Doublets mit der geringsten Konzentration sind die Datenpunkte von guter Qualität. TGF-beta Konzentrationen zwischen 10 pg/ml und 10 ng/ml lassen sich mit diesem Assay zuverlässig quantifizieren.

Der Graph zeigt, dass die ASCs viel TGF-beta sekretieren. Eine Stimulation der Sekretion durch Tumorzellen findet nicht statt. CAL-27 sekretiert etwas TGF-

beta. Im UD-SCC-2 konditioniertem Medium findet sich TGF-beta nur knapp über der Nachweisschwelle.

IL-6

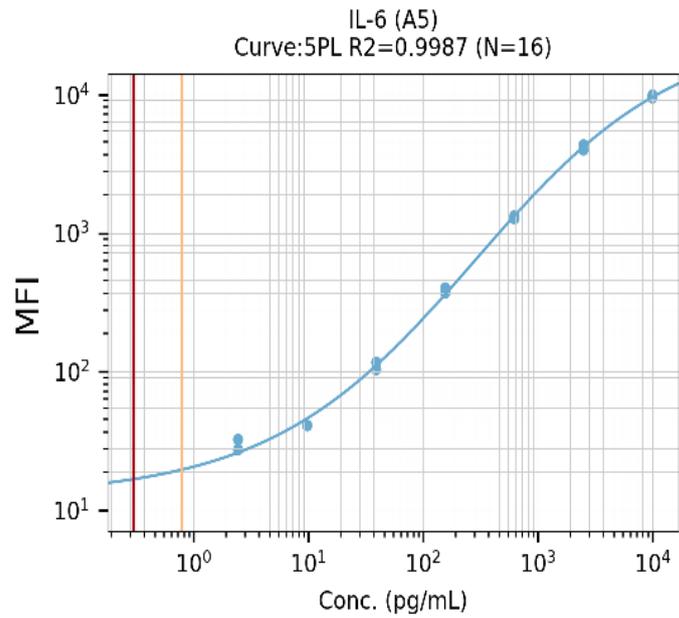


Abbildung 68: Einkurve von IL-6

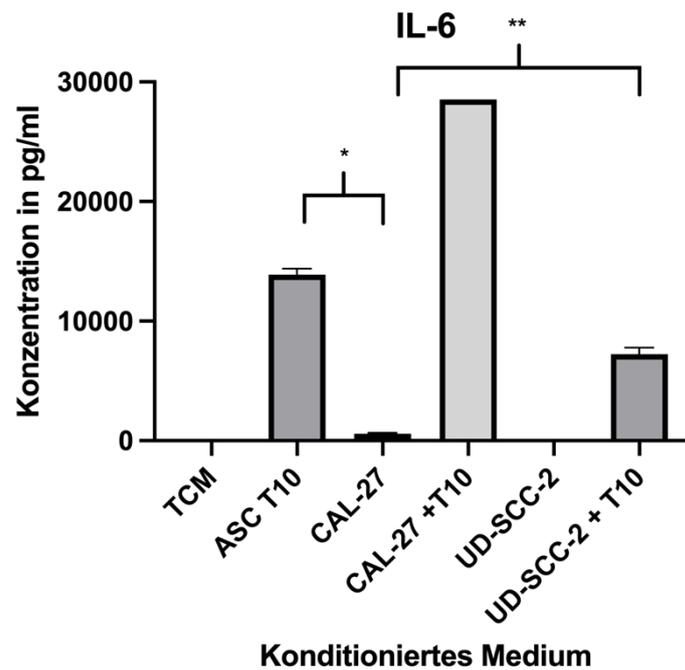


Abbildung 69: IL-6 Konzentrationen der konditionierten Medien

Die Datenpunkte sind von guter Qualität. Konzentrationen zwischen 10 pg/ml und 10 ng/ml lassen sich mit diesem Assay zuverlässig quantifizieren.

Der IL-6 Gehalt von TCM liegt erwartungsgemäß unter der Nachweisschwelle. ASC-T10 sekretiert so viel IL-6, dass nur die 1:4 Verdünnung innerhalb der Eichkurve lag. Für die Co-Kultur von T10 und CAL-27 lag selbst die 1:4 Verdünnung an der oberen Schwelle. Die IL-6 Produktion wird durch die Co-Kultivierung von ASC-T10 und CAL-27 stimuliert, es ist davon auszugehen, dass der Großteil des IL-6 in der Co-Kultur von ASCs stammt. Für die UD-SCC-2 Co-Kultur besteht dieser Effekt nicht.

### IL-8

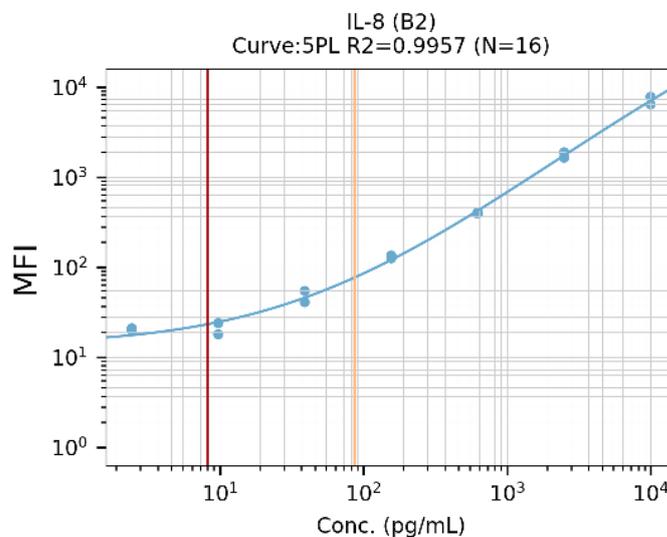


Abbildung 70: Eichkurve von IL-8

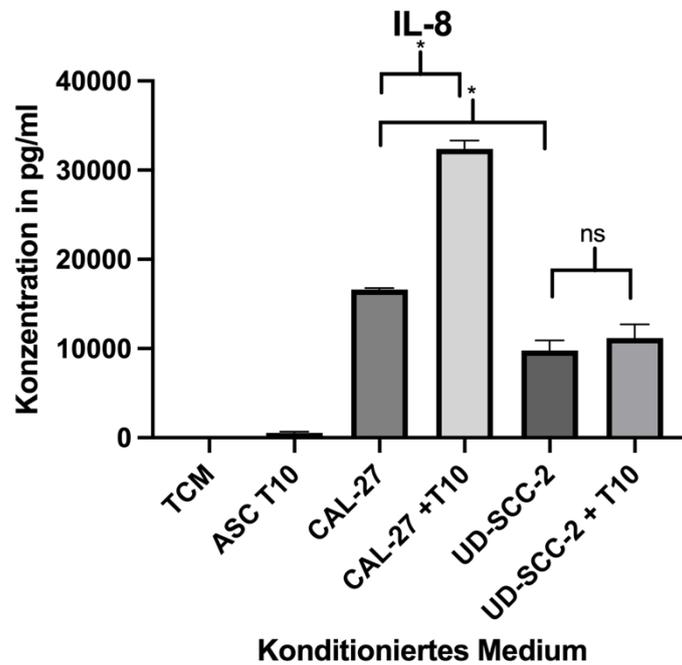


Abbildung 71: IL-8 Konzentrationen der konditionierten Medien

Die Datenpunkte bis zur dritten Verdünnung sind von guter Qualität. Konzentrationen zwischen 100 pg/ml und 10 ng/ml lassen sich mit diesem Assay zuverlässig quantifizieren.

Außer bei ASC-T10 traten in allen Proben hohe IL-8 Konzentrationen auf, sodass nur die Werte der verdünnten Proben verwendet wurden. Besonders hohe Konzentration von IL-8 kommen durch die Co-Kultivierung von CAL-27 und ASC-T10 zustande. Hier ist im Gegensatz zu IL-6 davon auszugehen, dass die Sekretion von CAL-27 stammt.

## IL-22

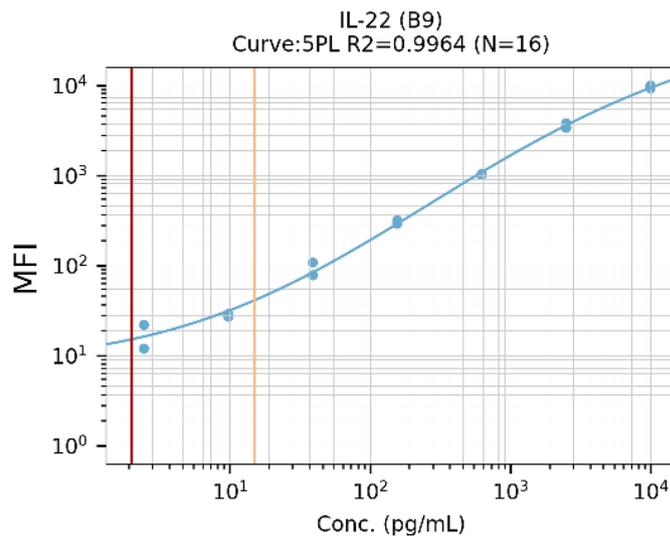


Abbildung 72: Eichkurve von IL-22

Die Datenpunkte sind von guter Qualität. Konzentrationen zwischen 10 pg/ml und 10 ng/ml lassen sich mit diesem Assay zuverlässig quantifizieren.

Die Konzentrationen von IL-22 lagen in allen konditionierten Medien unter der Quantifizierungsschwelle dieses Assays.

## INF-gamma

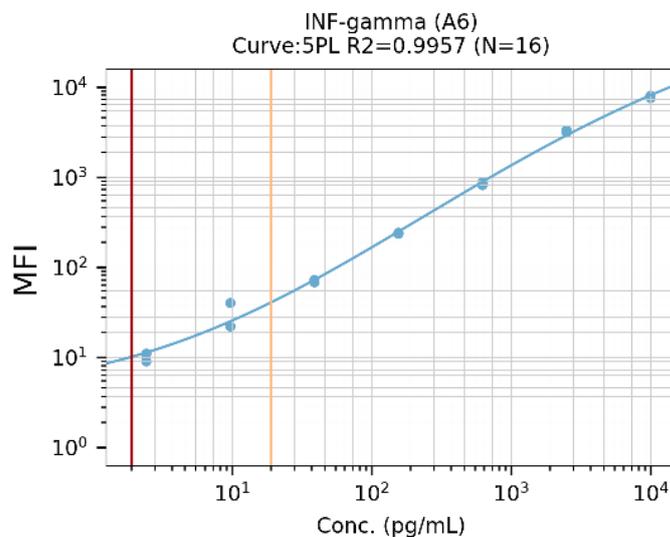


Abbildung 73: Eichkurve von Interferon gamma

Die Datenpunkte sind von guter Qualität. Konzentrationen zwischen 10 pg/ml und 10 ng/ml lassen sich mit diesem Assay zuverlässig quantifizieren.

Die Konzentrationen von Interferon gamma lagen in allen konditionierten Medien unter der Quantifizierungsschwelle dieses Assays.

### EGF

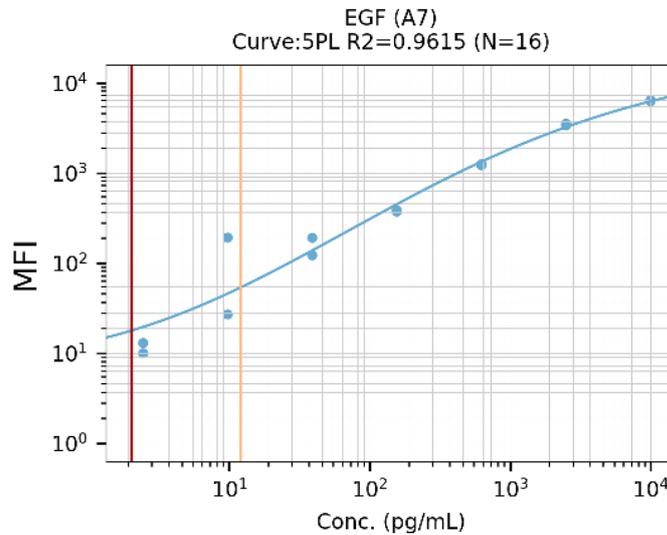


Abbildung 74: Eichkurve von EGF

Die Datenpunkte sind von guter Qualität. Konzentrationen zwischen 10 pg/ml und 10 ng/ml lassen sich mit diesem Assay zuverlässig quantifizieren.

Die Konzentrationen von EGF lagen in allen konditionierten Medien unter der Quantifizierungsschwelle dieses Assays.

### VEGF

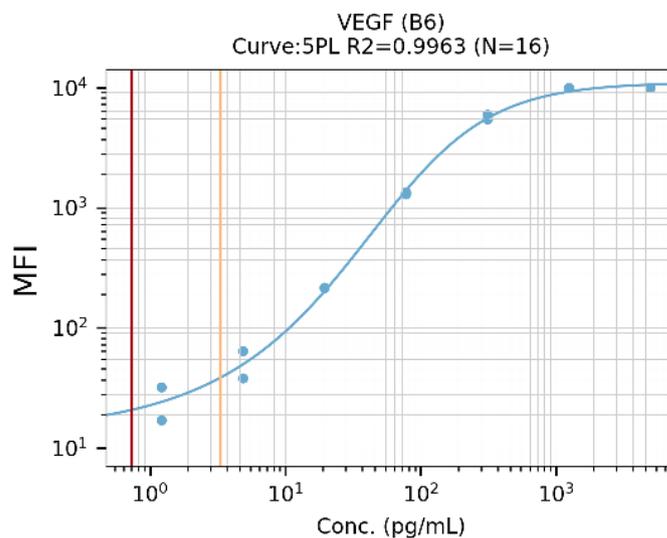


Abbildung 75: Eichkurve VEGF

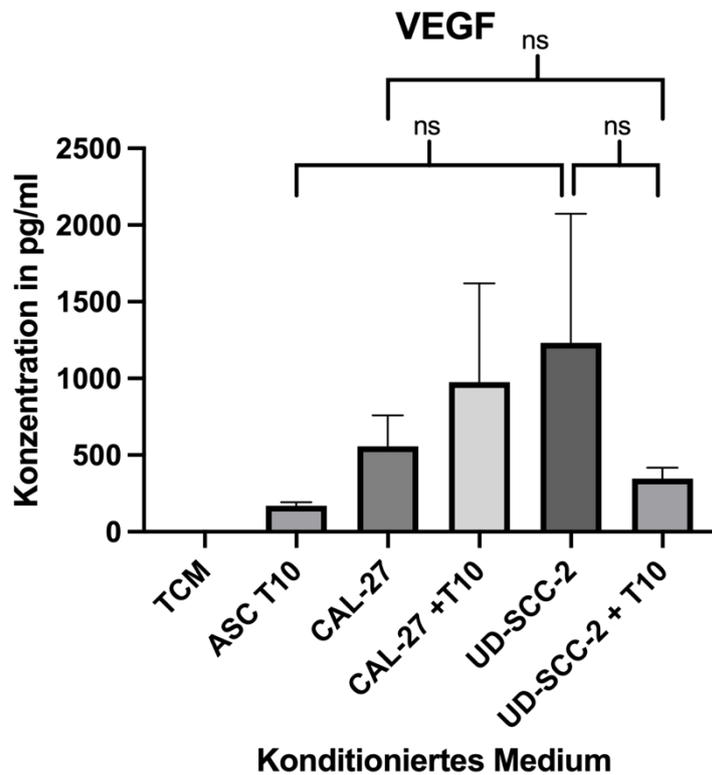


Abbildung 76: VEGF Konzentrationen der konditionierten Medien

Die Datenpunkte sind von guter Qualität. Konzentrationen zwischen 10 pg/ml und 10 ng/ml lassen sich mit diesem Assay zuverlässig quantifizieren.

In den konditionierten Medien von UD-SCC-2 wurden die höchsten Werte von VEGF nachgewiesen und für die reine ASC-Kultur die niedrigsten Werte. Die Abweichung der Messwerte war jedoch so groß, dass auch zwischen dem höchsten und niedrigsten Wert kein signifikanter Unterschied bestand.

## CCL2

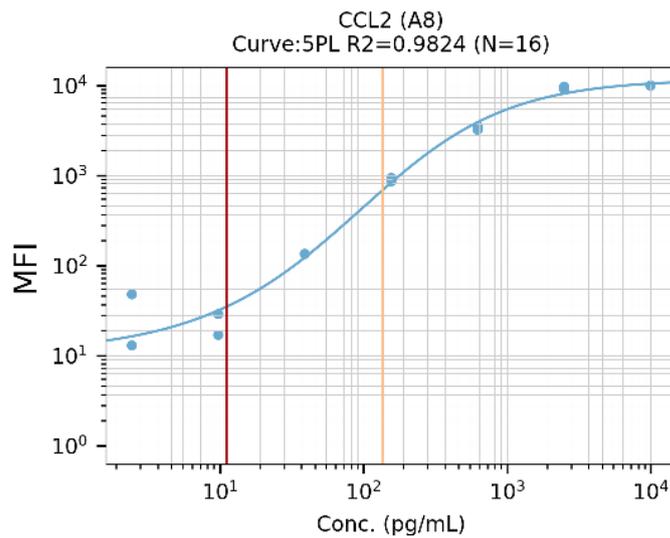


Abbildung 77: Eichkurve von CCL2

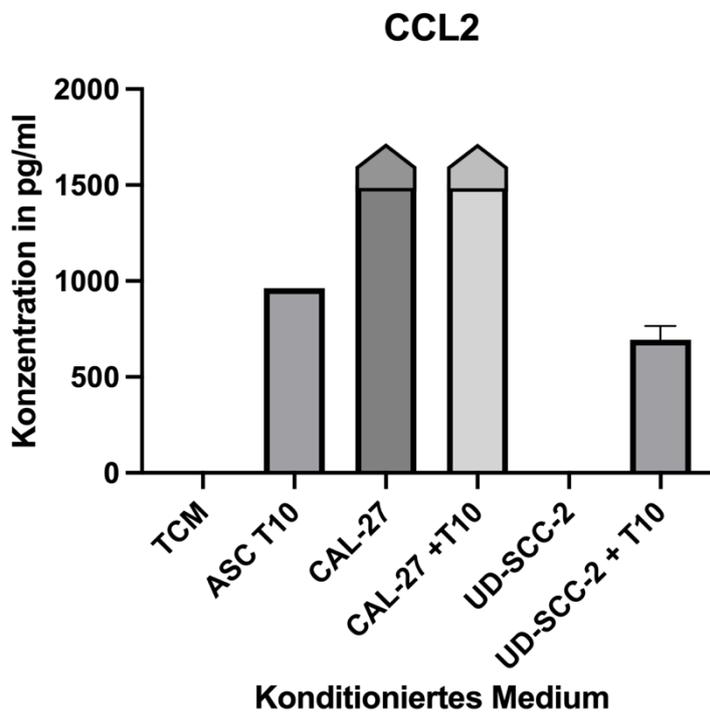


Abbildung 78: CCL2 Konzentrationen der konditionierten Medien

Die Datenpunkte sind von ausreichender Qualität. Konzentrationen zwischen 10 pg/ml und 1 ng/ml lassen sich mit diesem Assay zuverlässig quantifizieren.

UD-SCC-2 konditioniertes Medium weist CCL2 Werte unter der Quantifizierungsschwelle auf, während CAL-27, CAL-27+T10 Werte oberhalb des Quantifizierungsbereichs aufweisen. Für T10 und UD-SCC2 + T10 wiesen lediglich die Verdünnungen quantifizierbare Werte auf. Das lässt darauf

schließen, dass CAL-27 massiv CCL2 sekretiert und ASC-T10 eine etwas geringere Menge, während UD-SCC-2 kein, oder sehr wenig CCL2 sekretiert.

### SDF-1

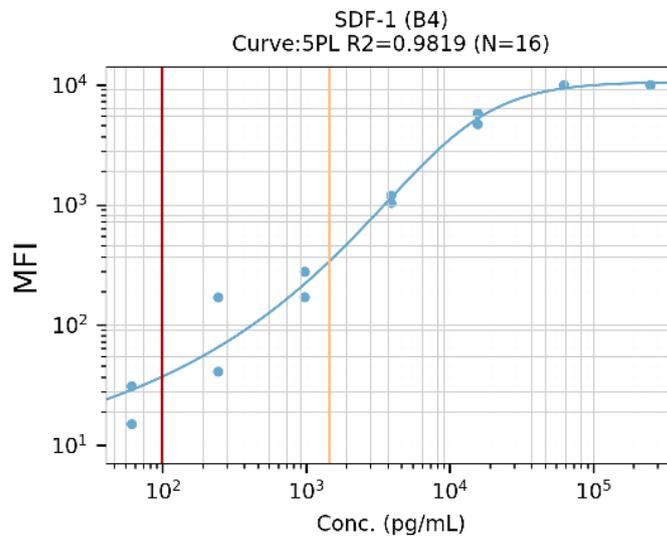


Abbildung 79: Eichkurve von SDF-1

Die Datenpunkte sind von eingeschränkter Qualität. Konzentrationen zwischen 1 ng/ml und 10 ng/ml lassen sich mit diesem Assay zuverlässig quantifizieren. Die Konzentrationen von SDF-1 in den konditionierten Medien lagen allesamt außerhalb des mit diesem Assay quantifizierbaren Bereichs.

### PD-1

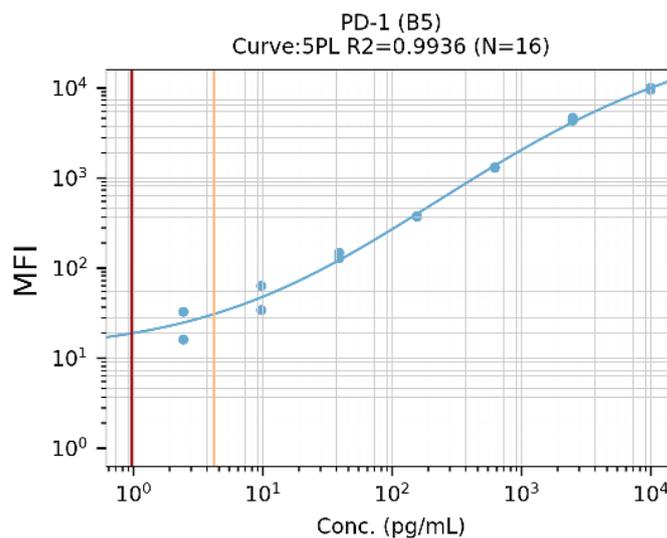


Abbildung 80: Eichkurve von PD-1

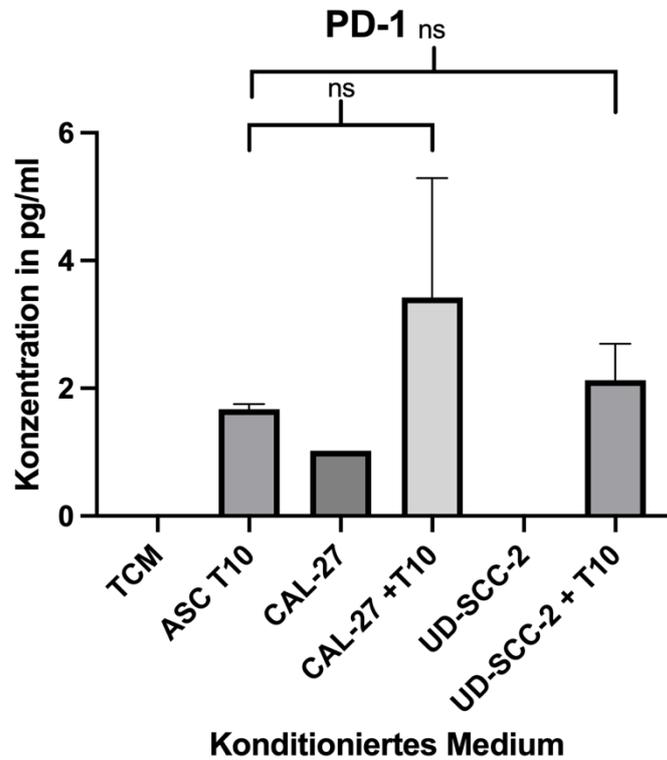


Abbildung 81: PD-1 Konzentrationen der konditionierten Medien

Die Datenpunkte sind von guter Qualität. Konzentrationen zwischen 10 pg/ml und 1 ng/ml lassen sich mit diesem Assay zuverlässig quantifizieren. Bei Konzentrationen zwischen 2 pg/ml und 10 pg/ml ist eine Quantifizierung möglich, jedoch sind die Werte weniger genau als über 10 pg/ml.

Der Graph zeigt, dass die PD-1 Konzentration in allen konditionierten Medien relativ niedrig ist und somit die absoluten Werte nicht zuverlässig sind, die relativen Unterschiede sind jedoch valide. PD-1 wird durch die Hinzugabe von ASC-T10 zu Tumorzellkulturen im Vergleich zu den Einzelkulturen vermehrt sekretiert.

MIP3-alpha (CCL20)

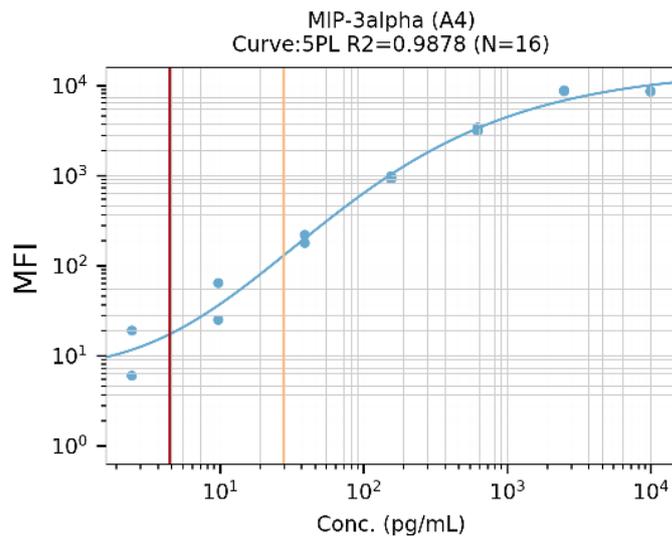


Abbildung 82: Eichkurve von MIP-3 alpha/CCL20

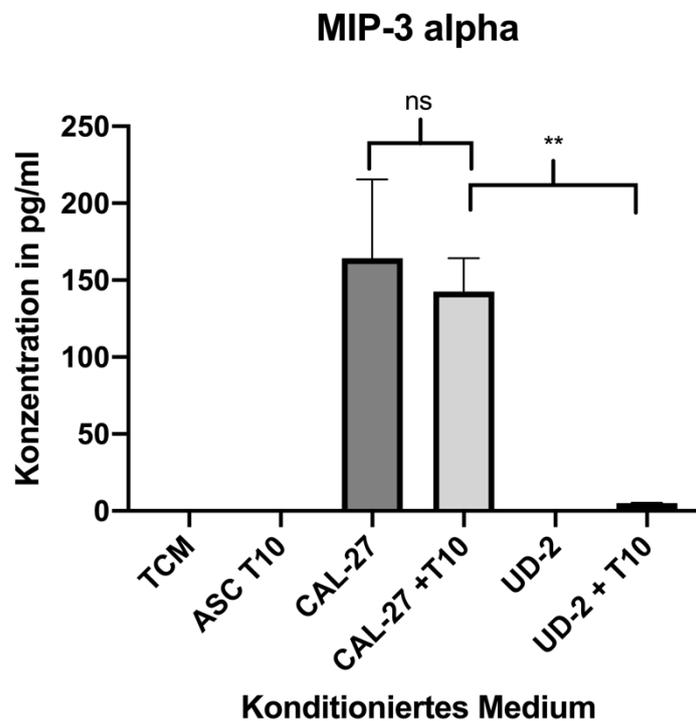


Abbildung 83: MIP-3 alpha/CCL20 Konzentrationen der konditionierten Medien

Die Datenpunkte sind von guter Qualität. Konzentrationen zwischen 10 pg/ml und 1 ng/ml lassen sich mit diesem Assay zuverlässig quantifizieren. Außerhalb dieses Bereichs ist keine valide Quantifizierung möglich.

MIP-3 alpha beziehungsweise CCL20 wird von CAL-27 exprimiert. Die Hinzugabe von ASC-T10 führt zu keiner signifikanten Veränderung. Für das

konditionierte Medium der UD-SCC-2 und ASC-T10 Co-Kultur zeigt sich die CCL20 Menge am unteren Rand der Nachweisgrenzen.

## 6 Diskussion

Bei Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen sind die hohe Lokalrezidivrate und die, insbesondere bei HPV-positiven Tumoren früh auftretende, Lymphknotenmetastasierung prognosebestimmend. Dieser Herausforderung wird zum einen durch die Optimierung der chirurgischen und strahlentherapeutischen Therapie und zum anderen durch die Erforschung der biologischen Grundlagen begegnet. Hierbei stehen unter anderem das Migrationsverhalten, die Tumormikroumgebung und die Tumorummunologie im Fokus.

Die Fähigkeit in das umliegende Gewebe zu migrieren, ist eine Eigenschaft von Tumorzellen, welche die Metastasierung ermöglicht und Lokalrezidive begünstigt (Yamaguchi et al., 2005). Bei korrekter onkologischer Resektion werden für die Entstehung von Lokalrezidiven im Wesentlichen zwei Mechanismen verantwortlich gemacht: Zum einen die Feldkanzerisierung mit einer zeitversetzten Entartung von Vorläuferläsionen und zum anderen der Verbleib von nicht erkannten mikroskopischen Tumorresiduen in der Umgebung des Primärtumors (Tabor et al., 2004).

Die Tumorzellmigration und weitere wichtige biologische Eigenschaften von Tumoren, wie die Immunmodulation oder Proliferation hängen nicht allein von dem Tumor ab, sondern werden durch das umliegende Gewebe, die Tumormikroumgebung wesentlich beeinflusst (Gajewski et al., 2013; Whiteside, 2008b).

Stammzellen mesenchymalen Ursprungs sind ein Zelltyp, welcher gehäuft in der Tumormikroumgebung vorkommt. Das perivaskuläre Fettgewebe ist, neben dem Knochenmark, eine reichhaltige Quelle von mesenchymalen Stammzellen. Verschiedene Autoren stellten fest, dass mesenchymale Fettgewebstammzellen (ASCs) gehäuft in Tumoren vorkommen (Antoine et al.,

2007; Liotta et al., 2015). Die Frage, ob diese Zellen eine pro- oder antitumoröse Wirkung haben und über welche Mechanismen diese Wirkung entfaltet wird, ist Thema einer anhaltenden Debatte.

Ein Aspekt, welcher der Untersuchung der Interaktion zwischen mesenchymalen Fettgewebstammzellen und Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen besondere Relevanz verleiht, ist, dass ASCs immunmodulatorische Eigenschaften haben (Ceccarelli et al., 2020). Die Erforschung dieser Eigenschaften ist unerlässlich, um die lokale Immunsuppression der Tumormikroumgebung zu verstehen.

Daher hat die vorliegende Arbeit die Interaktion zwischen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen und aus Fettgewebe isolierten mesenchymalen Stammzellen untersucht. Dabei wurde untersucht, ob ASCs die Migration der Tumorzellen anregen und ob Tumorzellen die Migration der ASCs steigern. Dies erfolgte zum einen durch die Verwendung von konditioniertem Medium und zum anderen in zwei Co-Kulturmodellen: der Mischkultur und der Parallelkultur. Dabei wurde stets darauf geachtet, ob Unterschiede zwischen Fettgewebstammzellen peritumoralen Ursprungs und Fettgewebstammzellen ohne Tumorassoziation bestehen. Da HPV-assoziierte Tumore eine distinkte Tumorentität darstellen, wurde überprüft, ob sich diese Andersartigkeit im Migrationsverhalten abzeichnet.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die ASCs in Richtung der Tumorzellen migrieren, folgten Experimente zur Evaluation ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften. Abschließend folgte eine Identifizierung von Zytokinen, welche möglicherweise für die beobachteten Effekte verantwortlich sind.

## 6.1 Primärkulturen

Die Isolation, Anzucht, Charakterisierung und der Nachweis der Stammzeleigenschaften der mesenchymalen Fettgewebstammzellen gelang erfolgreich. Die Anzucht korrespondierender autologer Tumorzellprimärkulturen gelang nicht, so konnten keine autologen Co-Kulturmodelle etabliert werden. Allogene Co-Kulturmodelle sind jedoch weit verbreitet und anerkannt, auch bei der Kultivierung von PBMCs (Klyushnenkova et al., 2005; Wang et al., 2012; Yu et al., 2008).

## 6.2 Migrationsanalyse

### 6.2.1 Tumorzellmigration

Die Tumorzelllinien UD-SCC-2 und CAL-27 wurden mithilfe von Ibidi Inserts im Migrationsassay daraufhin untersucht, ob ihre Migration durch mesenchymale Fettgewebstammzellen gefördert wird.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich keine signifikante Veränderung, insbesondere keine Zunahme der Tumorzellmigration durch mesenchymale Fettgewebstammzellen. Zu beobachten war ein nicht signifikanter Trend zugunsten einer verringerten Migration der Tumorzellen durch das präkonditionierte Medium. Aus den hier aufgeführten Experimenten geht nicht hervor, ob es sich um eine zufällige Beobachtung handelt, oder ob der verwendete Migrationsassay eine möglicherweise bestehende Reduktion der Tumorzellmobilität nicht wiederzugeben vermag. Für eine Reduktion der Tumorzellmobilität sprechen bisher unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe, welche eine signifikante Verringerung der Invasion von Tumorzellen im Invasion-Chamber-Assay durch ASCs beschreiben.

In Bezug auf die möglichen Gründe einer verringerten Tumorzellmobilität durch ASCs lassen sich anhand der hier vorliegenden Daten keine Schlüsse ziehen. Auch die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zytokinanalysen liefern diesbezüglich keinen Erklärungsansatz.

Vergleicht man die Migrationsdaten der Tumorzellen unter dem Aspekt, ob peritumorale mesenchymale Fettgewebstammzellen oder ASCs eines tumorfreien Patienten verwendet wurden, ist kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Daher ist anhand dieser Daten nicht davon auszugehen, dass Tumore die Eigenschaften der ASCs in ihrem Umfeld dauerhaft zu Gunsten einer verstärkten Sekretion von pro-migratorischen Zytokinen verändern.

Die Gegenüberstellung der HPV-negativen Zelllinie CAL-27 und der HPV-positiven Zelllinie UD-SCC-2 zeigt CAL-27 als grundlegend migrationsfreudiger. Jedoch sind die relativen Unterschiede, die durch das konditionierte Medium der ASCs hervorgerufen wurden, weitestgehend gleich. Hieraus lässt sich schließen,

dass der HPV-Status keine Bedeutung für die Beeinflussbarkeit der Migration durch mesenchymale Fettgewebstammzellen hat.

Eine Bestrahlung der ASCs vor Gewinnung des konditionierten Mediums brachte keine signifikante Veränderung der Migration der Tumorzellen. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass die bestrahlungsinduzierte Migration, welche unter anderem von Schiefler et al. beschrieben wurde, *in vitro* nicht zusätzlich durch ASCs gefördert wird. (Schiefler et al., 2014).

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit der bestehenden Literatur, dann fällt auf, dass sich eine Reihe von Autoren findet, die eine Förderung der Migration und Metastasierung von Tumorzellen durch ASCs beschreiben. So beschreiben Rowan et al. eine Erhöhung der Migration *in vitro* und eine vermehrte Metastasierung *in vivo* für Brustkrebs und für Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen (Rowan et al., 2014; Rowan et al., 2016) und Nowicka et al. gesteigerte Migration für Ovarialkarzinome *in vitro* durch mesenchymale Stammzellen (Nowicka et al., 2013).

Im Gegensatz dazu gibt es deutlich weniger Literatur, die, wie in der hier vorliegenden Arbeit, eine Abnahme oder ein Gleichbleiben des Migrationsverhaltens beschreibt. Ein Beispiel hierfür findet sich bei Sun et al.. Sie beschreiben eine Abnahme des Wachstums und der Metastasierung von Mammakarzinomzellen im Mausmodell bei Co-Injektion von aus Fettgewebe isolierten mesenchymalen Stromazellen (Sun et al., 2009). Möglicherweise werden negative Ergebnisse, wie das Nichtvorhandensein einer signifikanten Veränderung des Migrationsverhaltens, seltener publiziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern keine Hinweise darauf, dass eine Verwendung von mesenchymalen Fettgewebstammzellen in der rekonstruktiven Chirurgie bei Tumorpatienten negative onkologische Effekte durch eine verstärkte Migration möglicher Tumorresiduen haben könnte.

## 6.2.2 Mesenchymale Fettgewebstammzellenmigration

Um herauszufinden, ob die Migration von ASCs durch Tumorzellen stimuliert wird, wurde von Tumorzellen konditioniertes Medium auf mesenchymale Fettgewebstammzellkulturen gegeben.

Hierbei zeigte sich eine signifikante Zunahme der Migration. Die Beobachtung, dass die Migration der ASCs durch Tumorzellen gefördert wurde, war unabhängig von der verwendeten Tumorzell- und Fettgewebstammzelllinie und war zu allen Auswertungszeitpunkten zu beobachten, wenn auch mit unterschiedlichem Signifikanzniveau.

Der migrationsfördernde Effekt von Tumorzellüberständen auf ASCs wurde durch eine Bestrahlung der Tumorzellen mit zwei Gy zusätzlich verstärkt.

Der gleiche Effekt konnte in den Parallelkultur-Experimenten verzeichnet werden, in denen Tumorzellen auf der einen und mesenchymale Fettgewebstammzellen auf der anderen Seite der Ibidi-Chambers ausgesät wurden. Hier waren die relativen Unterschiede noch stärker ausgeprägt als in den Experimenten mit konditioniertem Medium.

Wurde auf beiden Seiten eine Mischung aus Tumor- und mesenchymalen Fettgewebstammzellen ausgesät, blieb eine signifikante Zunahme der Migration aus.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine Chemotaxis, also eine Anlockung der mesenchymalen Fettgewebstammzellen durch Zytokine der Tumorzellen vorliegt. Damit lieferten die Experimente übereinstimmende Ergebnisse mit publizierten Untersuchungen zu anderen Tumorentitäten.

Es gibt eine solide Evidenz, dass mesenchymale Stammzellen in verletztes oder entzündetes Gewebe einwandern (Fu et al., 2009; Sasaki et al., 2008).

Das lokale Milieu von beschädigtem Gewebe hat Gemeinsamkeiten mit der Tumormikroumgebung. Bereits 1986 beschrieb Dvorak Tumore als Wunden, welche nicht heilen (Dvorak, 1986). Auch in der Eigenschaft mesenchymale Stammzellen anzulocken, ähneln sich verletztes Gewebe und die Tumormikroumgebung. Kidd et al. konnten im Mausmodell per Biolumineszenz sichtbar machen, wie mesenchymale Stammzellen von Brustkrebstumoren

rekrutiert werden (Kidd et al., 2009). Für andere Tumorentitäten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen von Tumoren rekrutiert werden. Nowicka et al. demonstrierten dies für Ovarialkarzinome und ASCs *in vitro* und *in vivo* (Nowicka et al., 2013) und Liotta et al. fanden eine Anreicherung von mesenchymalen Stammzellen in Kopf-Hals-Tumoren von Patienten (Liotta et al., 2015).

Bei der Untersuchung der Interaktion zwischen Kopf-Hals-Tumoren und mesenchymalen Fettgewebstammzellen konnte diese Arbeit Ergebnisse liefern, welche untermauern, dass auch für diese Art von mesenchymalen Stammzellen und für diese Tumorentität, mesenchymale Stammzellen in die Tumormikroumgebung rekrutiert werden.

Dabei scheint der Effekt weder von dem HPV-Status der Tumoren noch davon abzuhängen, ob es sich um peritumorale mesenchymale Fettgewebstammzellen handelt oder um Zellen eines tumorfreien Patienten.

Eine Zunahme der Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen in die Tumormikroumgebung durch Bestrahlung beschreibt Klopp et al. für Mammakarzinome im Mausmodell und führt diesen Sachverhalt auf die vermehrte Ausschüttung des pro-entzündlichen Zytokins TGF-beta und auf eine gesteigerte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, unter anderem VEGF und PDGF, zurück (Klopp et al., 2007). In den oben aufgeführten Experimenten zeigte sich ebenfalls eine Verstärkung des Effekts durch die Bestrahlung mit zwei Gray, diese war jedoch statistisch nicht signifikant.

### 6.2.3 Migrationsexperimente mit fluoreszierenden Zellen

Um die Frage zu klären, wie sich die mesenchymalen Fettgewebstammzellen verhalten, nachdem sie in den Migrationsexperimenten die Tumorzellen erreicht haben, das heißt, nachdem sich der zellfreie Spalt geschlossen hat, war es notwendig die Zellen eindeutig unterscheiden zu können. Dies ist per Phasenkontrastmikroskop im konfluenten Zellrasen nicht möglich. Daher erfolgte die Färbung der beiden Zelltypen mit Fluoreszenzfarbstoffen. Da jedoch die

Migrationseigenschaften dadurch stark verändert wurden, war eine Auswertung nicht möglich.

Als weitere Methode wurde mittels GFP-Transfektion eine CAL-27 Zelllinie mit Fluoreszenz kreiert. Die transfizierten Zellen glichen in ihren Migrationseigenschaften den ursprünglichen Zellen weitestgehend, jedoch konnte keine ausreichende Farbintensität für eine zuverlässige Unterscheidung zwischen ASCs und Tumorzellen erreicht werden.

### 6.3 3D Kultur

Die realen Bedingungen von Tumoren sind durch eine dreidimensionale Zellkultur besser repräsentiert als durch einen einschichtigen Zellrasen. So unterscheidet sich das Ansprechen auf Chemotherapie oder Bestrahlung derselben Zelllinie in der 2D und 3D Kultur (Hagemann et al., 2017; Melissaridou et al., 2019; Sowa et al., 2010).

Für Kopf-Hals-Tumore konnte zudem gezeigt werden, dass Stammzellmarker, sowie Marker der epithelial-mesenchymalen Transition vermehrt in 3D Kulturen exprimiert werden (Melissaridou et al., 2019). Daher war ein Ziel dieser Arbeit die Etablierung eines zuverlässigen und vielseitigen 3D Modells.

Dies gelang über die „Hanging-Drop“ Methode. Damit ließen sich mit hoher Zuverlässigkeit dreidimensionale Tumorzellmodelle und Co-Kulturmodelle generieren. Diese ca. 0,6 mm großen Sphäroide zeigten sich nach dem Transfer aus dem hängenden Tropfen in Standardkulturschalen auch nach mehrtägiger Kultivierung kohärent und formstabil. Hiermit wurde erfolgreich ein dreidimensionales Co-Kulturmodell etabliert, welches für weitere Experimente verwendet werden kann und somit einen Mehrwert in der *in vitro* Erforschung der Interaktionen der verschiedenen Zelltypen in der Tumormikroumgebung bietet.

#### 6.3.1 Migration in 3D Kultur

Eine Zielsetzung war die Etablierung eines dreidimensionalen Migrationsassays, in welchem ausgewertet werden sollte, wie stark Tumorzellen aus dem Sphäroid in die umgebenden ASCs einwandern.

Eine Quantifizierung war mit dem durchgeführten Experiment nicht möglich, da die fluoreszierenden Tumorzellen, welche sich aus dem Sphäroid herausgelöst hatten, ihre Fluoreszenz verloren und damit keine Unterscheidbarkeit per Mikroskop gegeben war.

Umgekehrt war es ebenfalls nicht möglich die ASCs zu quantifizieren, die in das Sphäroid eingewandert waren.

#### 6.4 Immunmodulatorische Effekte von mesenchymalen Fettgewebstammzellen und Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen

Nachdem in den Migrationsexperimenten nachgewiesen werden konnte, dass sich die mesenchymalen Fettgewebstammzellen auf die Tumorzellen zubewegen und in der Literatur berichtet wird, dass sich in Kopf-Hals-Tumoren eine Anreicherung von ASCs findet (Liotta et al., 2015), kann geschlossen werden, dass ASCs aktiv in die Tumormikroumgebung rekrutiert werden.

Daher stellte sich die Frage, welche Rolle die ASCs innerhalb der Tumormikroumgebung einnehmen.

Das Immunsystem ist unter physiologischen Bedingungen in der Lage aberrante Zellen zu erkennen und diese abzutöten, um eine ungebremste Vermehrung zu verhindern. Diese Funktion des Immunsystems wird jedoch von Tumoren umgangen (Hanahan & Weinberg, 2011).

Bei der lokalen Immunmodulation hin zu einem tumorfördernden Milieu wird die Rolle von mesenchymale Stammzellen kontrovers diskutiert.

Die überwiegende Mehrheit der Autoren geht von einer immunsupprimierenden und somit tumorfördernden Rolle von mesenchymalen Stammzellen und ASCs aus (Guan & Chen, 2013).

Dabei werden unter anderem eine Inhibition der T-Zell Antwort (Krampera et al., 2003; Liotta et al., 2015), der B-Zell Proliferation (Tabera et al., 2008), sowie der Reifung und Funktion von dendritischen Zellen beschrieben (Jiang et al., 2005).

In der Tumorimmunologie spielen die regulatorischen T-Zellen, kurz Tregs, eine herausragende Rolle, da sie gehäuft in soliden Tumoren vorkommen, ein tumorförderndes Milieu kreieren und die Inhibition dieser Zellen ein zentraler Mechanismus moderner Immuntherapien ist (Beyer & Schultze, 2006; Tanaka & Sakaguchi, 2017). Daher stellt die Förderung von regulatorischen T-Zellen durch

mesenchymale Stammzellen, welche unter anderem von Prevosto et al. und Patel et al. beschrieben wird, einen interessanten möglichen Ansatzpunkt für Therapeutika dar (Patel et al., 2010; Prevosto et al., 2007).

Ergebnisse, welche eine immunstimulierende Wirkung von mesenchymalen Stammzellen beschreiben, gibt es nur vereinzelt. McIntosh et. al beschreiben eine Stimulation der T-Zell Proliferation durch frisch isolierte ASCs und von ASCs in Passage 1. Die Folgegenerationen jenseits von Passage 1 dieser Primärkulturzellen zeigten jedoch wieder ein immunsuppressives Verhalten (McIntosh et al., 2006).

Mesenchymale Fettgewebstammzellen stellen nur eine Untergruppe der mesenchymalen Stammzellen dar und in vielen tumorimmunologischen Publikationen wurden mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks untersucht. Daher stellen die Ergebnisse von Puissant et al., in denen gezeigt wurde, dass sich ASCs und mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks hinsichtlich ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften stark ähneln, eine wichtige Erkenntnis dar (Puissant et al., 2005). Zu diesem Schluss kommen auch Yoo et al. in einem Vergleich mesenchymaler Stammzellen unterschiedlichen Ursprungs (Yoo et al., 2009).

In den oben aufgeführten Migrationsexperimenten hatten sich mesenchymale Fettgewebstammzellen von Tumorpatienten und von tumorfreien Patienten gleich verhalten. Dieser Vergleich soll auch bei der Evaluation der immunmodulatorischen Eigenschaften gezogen werden. Razmkhah et al. veröffentlichten Ergebnisse, laut denen ASCs von Brustkrebspatienten fortgeschrittenen Stadiums eine stärkere pro-apoptotische Wirkung auf Lymphozyten haben (Razmkhah et al., 2018).

#### 6.4.1 Einfluss von konditioniertem Medium und Co-Kultivierung auf Immunzellen

Ziel war es die immunmodulatorischen Eigenschaften der ASCs, der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen und beider Zelltypen gemeinsam zu evaluieren. Dabei war die Hypothese, dass ASCs über die Förderung von regulatorischen

Lymphozyten einen immunsupprimierenden Effekt haben und sich dieser verstärkt, wenn Tumorzellen und ASCs co-kultiviert werden. Es wurden jeweils eine HPV-positive und eine HPV-negative Zelllinie mit der Hypothese verwendet, dass die HPV-positive Ziellinie immunogener ist.

Zunächst konnte in Vorexperimenten gezeigt werden, dass die Lymphozyten sowohl in der Kultivierung mit konditioniertem Medium als auch in der direkten Co-Kultur vital blieben und eine Auswertung der Subgruppen erlauben.

Die Anteile der Subpopulationen B-Zellen, T-Helfer und T-Killerzellen sowie NK-Zellen änderten sich nicht in relevantem Maße durch die Exposition zu konditioniertem Medium, zu ASCs, zu Tumorzellen oder zu Co-Kulturen. Zu beobachten war jedoch ein Trend hin zu höheren Anteilen von B-Zellen und NK-Zellen in den Versuchsansätzen mit der HPV-positiven Zelllinie, sowie ein geringerer Anteil von NK-Zellen in den Versuchsansätzen mit der ASC-Tumorzell-Co-Kultur. Bei Betrachtung der Ergebnisse lässt sich jedoch sagen, dass die Auswertungsgröße der Lymphozytensubgruppen für die Quantifizierung der immunmodulatorischen Eigenschaften zu grob ist. Daher war zur weiteren Untersuchung dieser Effekte eine detailliertere Analyse einzelner Phänotypen der Lymphozytensubgruppen notwendig.

#### 6.4.2 *In vitro* tumorinfiltrierende Lymphozyten

In der Tumorimmunologie nehmen die Lymphozyten, die innerhalb der Tumore gefunden werden, sogenannte tumorinfiltrierende Lymphozyten, eine herausragende Stellung ein. In der Serie von Publikationen „Focus on TILs“ wird die prognostische Relevanz unterschiedlicher Lymphozyten für eine Reihe von Tumoren untersucht, so auch für Kopf-Hals-Tumore (Uppaluri et al., 2008). Auch hier ist das Bild nicht einheitlich. Häufig korrelieren tumorinfiltrierende CD3+ und insbesondere CD8+ Lymphozyten mit einer besseren Prognose (Nguyen et al., 2016; Pages et al., 2010). Hohe Level von FoxP3+ oder PD-1+ Lymphozyten korrelieren teilweise mit einer günstigen Prognose (Kim et al., 2016). Vereinzelt wird jedoch berichtet, dass diese regulatorischen Marker einen negativen prognostischen Marker darstellen (de Ruiter et al., 2017).

Der Hauptfokus liegt in der Untersuchung von tumorinfiltrierenden T-Zellen. Bezüglich B-Zellen und NK-Zellen gibt es deutlich weniger Literatur. Dabei ist aus der Transplantations-, Autoimmunitäts- und Allergieforschung bekannt, dass B-Zellen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung von T-Zell-Antworten spielen (Nelson, 2010). Darüber hinaus kann eine spezifische Subgruppe von regulatorischen B-Zellen die lokale Immunevasion begünstigen (Olkhanud et al., 2011).

NK-Zellen werden mit ihren zytolytischen Eigenschaften als eine potentiell potente antitumoröse Subgruppe betrachtet (Habif et al., 2019).

Mithilfe der Sphäroide war es möglich *in vitro* tumorinfiltrierende Lymphozyten zu kreieren und auszuwerten, indem die PBMCs mit den Sphäroiden co-kultiviert wurden. Nach einer bestimmten Zeit wurden die Sphäroide geerntet und mechanisch vereinzelt, sodass die darin enthaltenen Lymphozyten durchflusszytometrisch analysiert werden konnten. Mit dieser Methode konnte ein einfach zu reproduzierendes und zuverlässiges Verfahren etabliert werden. Mithilfe dieses Verfahrens kann man die Effekte von unterschiedlichen Bedingungen und Therapeutika auf die tumorinfiltrierenden Lymphozyten testen. Aufgrund der vergleichsweise geringen Anzahl an Lymphozyten, die aus einem einzelnen Sphäroid gewonnen werden können, ist diese Methode jedoch mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden.

Ein Vergleich der *in vitro* tumorinfiltrierenden Lymphozyten mit jenen Lymphozyten, die sich im umgebenden Medium befinden, ergab höhere Anteile von NK-Zellen und CD8+ T-Zellen innerhalb des Sphäroids. Dies ließe sich damit erklären, dass ein allogener Tumor für PBMCs eine Immunogenität aufweist.

Jedoch wurden in diesem Experiment lediglich die Subpopulationen B-Zellen, T-Helfer- und T-Killerzellen sowie NK-Zellen in geringer Probenzahl betrachtet. Daher waren keine relevanten Unterschiede zwischen dem reinen Tumorzellsphäroid und dem ASC-Tumorzell-Co-Kultursphäroid zu beobachten. So konnte zwar ein geeignetes 3D-Modell zur Überprüfung der Hypothese, dass ASCs die lokale Immunevasion begünstigen, etabliert werden, geklärt werden konnte diese Hypothese anhand dieser Daten jedoch nicht.

Die Untersuchung von *in vitro* tumorinfiltrierenden Lymphozyten in Co-Kultur stellt somit weiterhin eine interessante Fragestellung dar. Hier sind weitere

Experimente mit detaillierteren Analysepanels und einer größeren Anzahl an Proben notwendig.

#### 6.4.3 Detailanalyse des Einflusses von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen und mesenchymalen Fettgewebstammzellen auf Immunzellen

Die alleinige Analyse der Subgruppen NK-Zellen, B-Zellen, T-Helfer- und T-Killerzellen stellt eine simple und relativ grobe Methode dar. Um qualifizierte Aussagen über die Immunmodulation von ASCs und Tumorzellen zu treffen, ist eine Detailanalyse einzelner Phänotypen notwendig. Hierzu wurden Lymphozyten von fünf Individuen nach Kultivierung in konditioniertem Medium von ASCs, Tumorzellen und Co-Kulturen mithilfe von drei Panels, bestehend aus insgesamt 35 Markern, analysiert. Hierbei lag der Fokus auf Markern, welche Lymphozyten charakterisieren, die entweder regulatorische und somit die Immunantwort bremsende Eigenschaften haben, oder auf Markern, die antitumoröse beziehungsweise zytotoxische Immunzellen kennzeichnen.

Bezüglich der Hypothese, dass die HPV-positive Zelllinie UD-SCC-2 eine höhere Immunogenität aufweist, ließ sich beobachten, dass nach Kultivierung mit UD-SCC-2 konditioniertem Medium statistisch signifikant mehr CD3<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup> Lymphozyten vorkamen. Diese Zellen stellen eine Subgruppe mit hohem zytolytischen und somit anti-tumorösem Potential dar (Mandelboim et al., 1999).

Darüber hinaus zeigten sich für UD-SCC-2 statistisch signifikant weniger CD39<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup> T-Zellen. CD25<sup>+</sup> T-Helferzellen spielen eine Schlüsselrolle in der Tumorummunevasion und können durch TGF-beta induziert werden (Liu et al., 2007). Die immunsuppressive Wirkung von CD25 ist so stark, dass eine Blockade zu einer Lyse von Tumoren führen kann (Vargas et al., 2017).

Auch die Abnahme der CD39<sup>+</sup> Lymphozyten weist auf eine höhere Immunogenität der UD-SCC-2 Zellen hin, da auch diese Subgruppe einen immunsupprimierenden Effekt hat.

Prüft man die Hypothese, dass ASCs an der lokalen Immunsuppression der Tumormikroumgebung beteiligt sind, sollte man die immunmodulatorischen Phänotypen CD25, FoxP3, CD39 und CTLA-4 und PD-1 betrachten.

Ein gleichförmiges, wenn auch statistisch nicht signifikantes Muster für die Expression von CD25, FoxP3 und CTLA-4, bei welchem das konditionierte Medium der Co-Kulturen und der ASCs jeweils zu einer verstärkten Expression führt, spricht für eine Immunsuppression durch ASCs.

Insbesondere die signifikante Erhöhung der Expression von CTLA-4 durch konditioniertes Medium von ASCs unterstützt diese Hypothese. Dies ist von besonderer Relevanz für das Verständnis der Rolle von ASCs innerhalb der Tumormikroumgebung, da mit Ipilimumab ein CTLA-4 Antikörper zur Verfügung steht, welcher in der Kombination mit Nivolumab in einer Phase II Studie als neoadjuvante Therapie für Kopf-Halstumore in der Rezidivsituation erprobt wird (Zuur et al., 2018).

Eine weitere Fragestellung war, ob die immunmodulatorischen Eigenschaften von ASCs durch die Interaktion mit Tumorzellen zusätzlich gefördert werden. Vergleicht man hierfür die Expression der regulatorischen Marker auf den Lymphozyten, die mit konditioniertem Medium von ASCs Monokulturen inkubiert wurden mit jenen, welche mit konditioniertem Medium der Co-Kulturen inkubiert wurden, so weisen die Co-Kulturen relativ zu der ASC-Kultur keine verstärkten immunsuppressiven Eigenschaften auf. Die Co-Kulturen und die ASC-Monokultur scheinen über ihr konditioniertes Medium ein ähnliches Maß an immunsuppressiver und toleranzinduzierender Wirkung auf die Immunzellen zu haben.

Hier könnte man nun argumentieren, dass die Unterschiede zwischen dem konditionierten Medium der Tumorzellmonokulturen und der Co-Kulturen zugunsten der Expression von immunmodulatorischen Markern lediglich ein proportionaler Effekt der Hinzugabe von ASCs sind. Zu beachten ist jedoch, dass sich in den Co-Kulturen lediglich 10% ASCs und 90% Tumorzellen befunden haben.

Dies macht es unwahrscheinlich, dass es sich bei dem beobachteten immunmodulatorischen Wandel des konditionierten Mediums der Co-Kulturen um einen Effekt handelt, welcher ebenfalls durch eine anteilige Mischung der

konditionierten Monokulturmedien erreicht werden könnte, sondern um einen Effekt, der auf einer Interaktion zwischen Tumorzellen und ASCs beruht.

Zusammenfassend ist anhand der vorliegenden Daten davon auszugehen, dass die immunmodulatorischen Eigenschaften des konditionierten Mediums der Co-Kulturen stärker und komplexer sind als die Addition der Monokulturmedien.

Somit kann anhand dieser Arbeit argumentiert werden, dass unter Co-Kulturbedingungen eine Förderung der immunmodulatorischen Eigenschaften der ASCs durch die Interaktion mit Tumorzellen vorliegt. Alternativ könnte auch eine Induktion von immunmodulatorischen Eigenschaften bei den Tumorzellen durch ASCs vorliegen.

## 6.5 Zytokinanalyse in konditionierten Medien

In den Migrationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen und deren konditionierte Medien die Migration von ASCs verstärken.

In den Analysen der immunmodulatorischen Eigenschaften der präkonditionierten Medien von ASCs, Tumorzellen und deren Co-Kulturen wurde eine Veränderung hin zu regulatorischen Lymphozytenpopulationen beobachtet. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Frage durch welche Zytokine diese Effekte vermittelt werden könnten.

Hierzu wurden einige Zytokine und lösliche Rezeptoren ausgewählt, welche Teil jener zellulären Wege sind, die für die oben genannten Ergebnisse von Bedeutung sind.

Mit dem verwendeten Assay können dabei nur Konzentrationen in einem gewissen Bereich quantifiziert werden. Die untere Nachweisgrenze lag dabei bei ca. einem Hundertstel der oberen Nachweisgrenze. Durch die Verwendung von verdünntem und unverdünntem präkonditioniertem Medium wurde der quantifizierbare Bereich nochmals um Faktor fünf erweitert.

Für IL-22, INF-gamma, EGF, und SDF-1 lagen die Konzentrationen der präkonditionierten Medien unter der jeweiligen Nachweisgrenze.

Da der vom Hersteller festgelegte Nachweisbereich des Assays speziell für Zellkulturmedien und Blutplasma gewählt ist, bedeutet ein Wert unter der

Nachweisgrenze, dass für die oben genannten Zytokine keine biologisch relevante Rolle anzunehmen ist.

Für die im Folgenden aufgeführten Zytokine wurden relevante Mengen nachgewiesen.

CCL-2 ist ein Zytokin, welches die Rekrutierung von myeloiden Suppressorzellen und Tumor assoziierten Makrophagen in die Tumormikroumgebung fördert und somit zu immunsuppressiven Lokalbedingungen führen kann (Huang et al., 2007; Zhou et al., 2019). Hier gab es gravierende Unterschiede in der Ausschüttung dieses Zytokins. Während die HPV-positive Zelllinie UD-SCC-2 CCL-2 unterhalb der Nachweisschwelle sekretierte, zeigten sich bei CAL-27 Werte oberhalb der Quantifizierungsschwelle. Im konditionierten Medium von ASC-T10 wurde ebenfalls viel CCL-2 detektiert. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass HPV-positive Tumore stärker immunogen sind und, dass die Zugabe von ASCs die Immunogenität reduziert.

Mit TGF-beta und IL-6 wurden zwei Zytokine untersucht, welche als Treiber der epithelial-mesenchymale Transition identifiziert wurden (Wendt et al., 2009; Yadav et al., 2011).

Beide Zytokine werden in hohem Maße von mesenchymalen Fettgewebstammzellen ausgeschüttet und könnten Treiber einer Tumorprogression sein. Diese Beobachtung stimmt unter anderem mit den Ergebnissen von Kang et al. überein (Kang et al., 2008).

Einen weiteren Hinweis, dass das Vorkommen von ASCs in der Tumormikroumgebung eine durch lösliche Faktoren verursachte lokale Tumorprogression und die EMT fördern kann, ergibt sich aus der vermehrten Ausschüttung von IL-8 in Co-Kulturen (Chan et al., 2016; Palena et al., 2012).

Die hohe TGF-beta Konzentration im konditionierten Medium von ASCs ist nicht nur im Hinblick auf die EMT interessant, sondern könnte auch ein Weg sein, über den ASCs regulatorische T-Zellen fördern (Huber et al., 2004; Shevach et al., 2008). Ein weiteres Zytokin, welches die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen fördern kann, ist CCL20, auch MIP-3 alpha genannt (Liu et al., 2011). Die Sekretion von CCL20 durch CAL-27 kann ein weiterer Faktor sein, der zu einer stärkeren Tumorevasion von HPV-negativen Tumoren beiträgt.

## 7 Zusammenfassung

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war ein Erkenntnisgewinn über die Interaktion zwischen Kopf-Hals-Tumoren und mesenchymalen Fettgewebstammzellen vor dem Hintergrund des gehäuften Vorkommens von mesenchymalen Fettgewebstammzellen in der Tumormikroumgebung und ihrer unklaren Aufgabe in dieser.

Dabei sollte zum einen die gegenseitige Beeinflussung der Migration quantifiziert werden und zum anderen sollte untersucht werden, welche Effekte diese beiden Zelltypen auf Immunzellen haben, um so mögliche immunmodulatorische Eigenschaften aufzuzeigen. Anschließend sollten Zellbotenstoffe identifiziert werden, welche für die Beobachtungen der vorausgegangenen Experimente mitverantwortlich sein könnten.

Dabei wurde zusätzlich analysiert, ob systematische Unterschiede zwischen einer HPV-positiven Zelllinie und einer HPV-negativen Tumorzelllinie und zwischen peritumoralen mesenchymalen Fettgewebstammzellen und Zellen von tumorfreien Patienten bestehen.

In den Migrationsexperimenten zeigte sich, dass es zu keiner Förderung der Tumorzellmigration kam, weder durch konditioniertes Medium der mesenchymalen Fettgewebstammzellen noch durch eine direkte Co-Kultivierung der beiden Zelltypen.

Dieses Ergebnis war unabhängig von der Tumorassoziation der mesenchymalen Stammzellen. Es zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den beiden verwendeten Tumorzelllinien.

Damit liefert diese Arbeit keinen Hinweis darauf, dass durch die Verwendung von mesenchymalen Fettgewebstammzellen in der rekonstruktiven Chirurgie negative onkologische Effekte aufgrund einer Förderung von Invasion und Metastasierung residualer Tumorzellen zu erwarten ist.

Die Migration der mesenchymalen Fettgewebstammzellen hingegen wurde signifikant durch Tumorzellen erhöht. Dieser Effekt war unabhängig von dem

HPV-Status der Tumorzellen und von der Tumorassoziation der Fettgewebstammzellen. Das gesteigerte Migrationsverhalten zeigte sich, verglichen mit konditioniertem Medium, verstärkt in der direkten Co-Kultur. Für Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen ist eine strahleninduzierte Migration bereits bekannt. In den hier aufgeführten Experimenten war ebenfalls eine Verstärkung der Migration durch Bestrahlung der Co-Kulturen und der Tumorzellkulturen vor Gewinnung des konditionierten Mediums zu beobachten.

Die durch Tumorzellen gesteigerte Migration der mesenchymalen Fettgewebstammzellen legt in Zusammenschau mit den Beobachtungen des gehäuften Vorkommens dieser Zellen in und um Kopf-Hals-Tumore eine aktive Rekrutierung in die Tumormikroumgebung nahe.

Bezüglich der Frage, welche Rolle die mesenchymalen Fettgewebstammzellen in der Tumormikroumgebung einnehmen, wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen auf das zelluläre Immunsystem *in vitro* untersucht. Hierbei konnte die These erhärtet werden, dass mesenchymale Fettgewebstammzellen durch Immunmodulation, wie beispielsweise die signifikante Steigerung der CTLA-4 Expression auf T-Zellen, eine lokale Immunsuppression fördern.

Des Weiteren gab es Hinweise, dass mesenchymale Fettgewebstammzellen einen stärkeren immunmodulatorischen Effekt haben, wenn sie mit Tumorzellen interagieren.

Zur Überprüfung dieser These sind weitere Experimente notwendig, welche eine genauere Quantifizierung der immunsupprimierenden Eigenschaften der Co-Kulturen in Abhängigkeit der Zellmenge der Tumor- und Fettgewebstammzellen liefern.

In der Analyse der konditionierten Medien stellte sich heraus, dass die mesenchymalen Fettgewebstammzellen mit IL-6, TGF-beta und IL-8 vermehrt Botenstoffe exprimieren, welche Treiber der epithelial-mesenchymale Transition darstellen und an Mechanismen der lokalen Immuntoleranzinduktion beteiligt sind. Hervorzuheben ist dabei, dass für IL-6 und IL-8 in der Co-Kultur signifikant höhere Konzentrationen bestimmt wurden, als die Kombination der Monokulturen erwarten ließ.

Darüber hinaus konnte erfolgreich ein Modell der Tumormikroumgebung etabliert werden, welches die *in vitro* Nachbildung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten, deren Isolierung und Analyse ermöglicht.

Diese Ergebnisse sind ein Beitrag zur Etablierung von mesenchymalen Fettgewebstammzellen als bedeutsame Akteure innerhalb der Tumormikroumgebung. Sie unterstützen die These, nach welcher die mesenchymalen Fettgewebstammzellen aktiv durch Kopf-Hals-Tumore rekrutiert werden und legen eine tumorfördernde Wirkung durch Unterstützung der lokalen immunsuppressiven Immunmodulation und der epithelial-mesenchymale Transition nahe.

## 8 Anhang

### 8.1 Danksagung

Mein Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Anja Pickhard für ihre fachliche, wissenschaftliche und auch persönliche Begleitung. Im Speziellen möchte ich mich für die Unterstützung eigener Ideen und die Ermöglichung des Forschungsaufenthaltes am Imperial College London bedanken.

Auch bei meiner Mentorin Dr. med. Maria Buchberger möchte ich mich herzlich bedanken. Ihr Engagement und ihr Einsatz in der Betreuung, sowohl der experimentellen Arbeit als auch der schriftlichen Ausarbeitung, überstiegen das Erwartbare bei Weitem.

Für das Erlernen der praktischen Arbeit im Labor, sowie für die Hilfe bei der Überwindung von methodischen Problemen möchte ich mich bei Guido Piontek bedanken. Er hatte für die Anliegen von uns Doktoranden stets ein offenes Ohr. Außerdem möchte ich mich bei Michael Siegl und Kristin Fritsche bedanken, sie standen mir mit ihrer Erfahrung im Labor allzeit für Rückfragen zur Verfügung.

Ich danke Dr. phil. nat. Ulrich Zißler und seinem Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. rer. nat. Schmidt-Weber für die Einführung in die Durchflusszytometrie, für den Zugang zu dem Durchflusszytometer und insbesondere für die Vermittlung an die Arbeitsgruppe von Dr. Mohamed Shamji.

Die Arbeit am Imperial College London hat nicht nur meine methodischen Fertigkeiten und meinen wissenschaftlichen Horizont erweitert, sondern auch meine Perspektive auf meine berufliche Zukunft geschärft.

Die offene Unterstützung, die ich hierbei von Dr. Mohamed Shamji und Prof. Stephen Durham erfahren habe, möchte ich im Besonderen würdigen und mich für den Zugang zu der Infrastruktur des Imperial Colleges bedanken.

Für die Hilfe bei der Organisation und Durchführung der Experimente möchte ich mich bei Rebecca Parkin und Lobna Kousa bedanken.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Stephanie E. Combs, Direktorin der Klinik für

Strahlentherapie am Klinikum rechts der Isar, für den Zugang zum Bestrahlungsgerät am Zentrum für präklinische Forschung.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Henning Bier für die Ermöglichung dieser umfangreichen Arbeit bedanken und meine Betroffenheit über sein Schicksal zum Ausdruck bringen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Samantha Fichtel und bei meiner Familie für die Begleitung durch alle Höhen und Tiefen, die ich während dieser Arbeit durchlaufen habe, bedanken.

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definitionen der TNM Stadien .....	8
Tabelle 2: T Stadien entsprechend ihrer Lokalisation und Größe .....	9
Tabelle 3: Nodalstatus.....	12
Tabelle 4: UICC Stadien.....	13
Tabelle 5: Von ASCs sekretierte Zytokine und deren Effekte .....	32
Tabelle 6: Verwendete Zelllinien .....	37
Tabelle 7: ASC Primärkulturen.....	37
Tabelle 8: Reagenzien .....	38
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien.....	39
Tabelle 10: Laborgeräte .....	46
Tabelle 11: Software .....	47
Tabelle 12: Kulturbedingungen .....	48
Tabelle 13: Zellzahlen .....	55
Tabelle 14: NK-Zell-Panel .....	59
Tabelle 15: B-Zell-Panel.....	59
Tabelle 16: T-Zell Panel .....	60
Tabelle 17: ASC/PBMC-Panel .....	60

## 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsaufbau Migrationsassays.....	54
Abbildung 2: Fotoaufnahmen der Migrationsassays .....	55
Abbildung 3: Migrationsassays in der Einzel- und Co-Kultur .....	56
Abbildung 4: Proliferationsanalyse von UD-SCC2 und CAL-27 über 72 h.....	63
Abbildung 5: Proliferationsanalysen der ASCs über 72 h .....	64
Abbildung 6: Wachstumsmuster Mischkultur .....	65
Abbildung 7: Migration unter MSCM .....	66
Abbildung 8: Migration CAL-27 .....	67
Abbildung 9: Migration UD-SCC-2 .....	68
Abbildung 10: Migration CAL-27 .....	69
Abbildung 11: Migration ASC-T10 unter CAL-27 .....	70
Abbildung 12: Aufnahmen ASC-T10 .....	71
Abbildung 13: Migration ASC-T10 unter UD-SCC-2 .....	72
Abbildung 14: Migration ASC-N10 unter CAL-27 .....	73
Abbildung 15: Migration ASC-N10 unter UD-SCC-2.....	74
Abbildung 16: Migration Parallelkultur.....	76
Abbildung 17: Migration Mischkultur 8h .....	78
Abbildung 18: Migration Mischkultur 16h .....	79
Abbildung 19: Migration Mischkultur gegen Parallelkultur.....	80
Abbildung 20: Migration Parallelkultur mit Fluoreszenzfarbstoff .....	81
Abbildung 21: Migration Parallelkultur mit GFP.....	82
Abbildung 22: Migration CAL-27 GFP, Lionheart FX .....	82
Abbildung 23: Migration CAL-27 mit MSCM, Lionheart FX.....	83
Abbildung 24: Migration ASC-T10, Lionheart FX .....	83
Abbildung 25: Migration Mischkultur gegen Parallelkultur, Lionheart FX .....	84
Abbildung 26: Migration ASC-T10 Lionheart FX .....	84
Abbildung 27: Sphäroide aus CAL-27 .....	86
Abbildung 28: Sphäroide aus CAL-27 aus dem Hanging-Drop-Kit .....	87
Abbildung 29: Momentaufnahmen CAL-27 GFP Sphäroid .....	87
Abbildung 30: Basisgating.....	88
Abbildung 31: Gating NK-Zellen.....	89
Abbildung 32: Gating B-Zellen .....	91
Abbildung 33: Gating T-Zellen.....	92

Abbildung 34: Gating mesenchymale Fettgewebstammzelle.....	93
Abbildung 35: Gating Einfluss von Tumorzell-konditioniertem Medium auf PBMCs .....	94
Abbildung 36: Gating Einfluss von ASC-konditioniertem Medium auf PBMCs .	94
Abbildung 37: Einfluss von ASC- und Tumorzell-konditioniertem Medium auf PBMCs .....	95
Abbildung 38: Gating Einfluss von Co-Kultivierung auf PBMCs.....	96
Abbildung 39: Einfluss von Co-Kultivierung auf PBMCs .....	97
Abbildung 40: Gating Einfluss von Co-Kultur-konditioniertem Medium auf PBMCs .....	98
Abbildung 41: Einfluss von Co-Kultur-konditioniertem Medium auf PBMCs .....	99
Abbildung 42: Gating Einfluss von Tri-Co-Kultivierung auf PBMCs .....	100
Abbildung 43: Einfluss von Tri-Co-Kultivierung auf PBMCs.....	101
Abbildung 44: Sphäroide umgeben von PBMCs .....	102
Abbildung 45: Gating PBMCs in der Umgebung verglichen mit in vitro TILs ..	102
Abbildung 46: PBMCs in der Umgebung verglichen mit in vitro TILs.....	103
Abbildung 47: Einfluss von konditioniertem Medium auf den Anteil an NK-Zellen .....	105
Abbildung 48: Einfluss von konditioniertem Medium auf den CD16+ Anteil der CD3- negativen Zellen.....	105
Abbildung 49: Expression von HSP70 bei Lymphozyten und bei CD3- Lymphozyten .....	106
Abbildung 50: Expression von Granulysin und Perforin in CD3-, CD56+, CD335+ Lymphozyten .....	107
Abbildung 51: Expression von Granzyme B in CD3-, CD56+, CD335+ Lymphozyten .....	108
Abbildung 52: Expression von CD161 bei CD3- Lymphozyten .....	108
Abbildung 53: Expression von HOBIT in CD3-, CD56+, CD335+ Lymphozyten .....	109
Abbildung 54: Expression von CD4 bei CD3+ Lymphozyten .....	110
Abbildung 55: Expression von CD25 bei CD3+ Lymphozyten .....	110
Abbildung 56: Expression von FoxP3 bei CD3+ Lymphozyten.....	111
Abbildung 57: Expression von CTLA-4 bei CD3+ CD4+ Lymphozyten.....	112
Abbildung 58: Expression von CD39 bei CD3+ CD4+ Lymphozyten.....	112
Abbildung 59: Expression von CD103+ bei CD3+ CD4+ Lymphozyten.....	113

Abbildung 60: Expression von HELIOS in CD3+ CD4+ Lymphozyten.....	114
Abbildung 61: Anteil von CD20+, CD19+ von CD45+ Zellen .....	114
Abbildung 62: Anteil von CD24+, CD38+ von CD19+, CD20+ Zellen.....	115
Abbildung 63: Anteil von CD27+ von CD19+, CD20+ Zellen .....	115
Abbildung 64: Expression von PD1 auf CD19+, CD20+ Zellen .....	116
Abbildung 65: Gating Übersicht Legendplex .....	117
Abbildung 66: Eichkurve TGF-beta .....	118
Abbildung 67: TGF-beta Konzentrationen der konditionierten Medien .....	118
Abbildung 68: Einkurve von IL-6 .....	119
Abbildung 69: IL-6 Konzentrationen der konditionierten Medien.....	119
Abbildung 70: Eichkurve von IL-8.....	120
Abbildung 71: IL-8 Konzentrationen der konditionierten Medien.....	121
Abbildung 72: Eichkurve von IL-22.....	122
Abbildung 73: Eichkurve von Interferon gamma .....	122
Abbildung 74: Eichkurve von EGF .....	123
Abbildung 75: Eichkurve VEGF .....	123
Abbildung 76: VEGF Konzentrationen der konditionierten Medien .....	124
Abbildung 77: Eichkurve von CCL2.....	125
Abbildung 78: CCL2 Konzentrationen der konditionierten Medien.....	125
Abbildung 79: Eichkurve von SDF-1 .....	126
Abbildung 80: Eichkurve von PD-1.....	126
Abbildung 81: PD-1 Konzentrationen der konditionierten Medien.....	127
Abbildung 82: Eichkurve von MIP-3 alpha/CCL20 .....	128
Abbildung 83: MIP-3 alpha/CCL20 Konzentrationen der konditionierten Medien .....	128
Abbildung 84: Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzell-Primärkulturen .....	177
Abbildung 85: Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzell-Primärkulturen in hohen Passagen .....	178

## 8.4 Literaturverzeichnis

### Literaturverzeichnis

- Adithan, A., Peter, J. S. J., Mohammad, A. H., Kim, B., Kang, C.-W., Kim, N. S., Hwang, K.-C., & Kim, J.-H. (2020). A gastric cancer cell derived extracellular compounds suppresses CD161+ CD3-lymphocytes and aggravates tumor formation in a syngeneic mouse model. *Molecular Immunology*, 120, 136-145.
- Agematsu, K., Hokibara, S., Nagumo, H., & Komiyama, A. (2000). CD27: a memory B-cell marker. *Immunology Today*, 21(5), 204-206. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01605-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01605-4)
- Akdis, C. A., Joss, A., AKDIS, M. B., Faith, A., & Blaser, K. (2000). A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. *The FASEB Journal*, 14(12), 1666-1668.
- Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tân, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C. C., Redmond, K. P., & Gillison, M. L. (2010). Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(1), 24-35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912217>
- Antoine, E. K., Ajeeta, B. D., Annie, P. V., Andrew, S., Mary, W. B., George, W. B., Andrea, L. R., Kornelia, P., Ross, T., & Robert, A. W. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162), 557. <https://doi.org/10.1038/nature06188>
- Antonia, S. J., Villegas, A., Daniel, D., Vicente, D., Murakami, S., Hui, R., Yokoi, T., Chiappori, A., Lee, K. H., de Wit, M., Cho, B. C., Bourhaba, M., Quantin, X., Tokito, T., Mekhail, T., Planchard, D., Kim, Y.-C., Karapetis, C. S., Hiret, S., Ostoros, G., Kubota, K., Gray, J. E., Paz-Ares, L., de Castro Carpeño, J., Wadsworth, C., Melillo, G., Jiang, H., Huang, Y., Dennis, P. A., & Özgüroğlu, M. (2017). Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 377(20), 1919-1929. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709937>
- Anz, D., Mueller, W., Golic, M., Kunz, W. G., Rapp, M., Koelzer, V. H., Ellermeier, J., Ellwart, J. W., Schnurr, M., Bourquin, C., & Endres, S. (2011, 2011/11/15). CD103 is a hallmark of tumor-infiltrating regulatory T cells. *Int J Cancer*, 129(10), 2417-2426. <https://doi.org/10.1002/ijc.25902>
- Atkins, M. B. (2006). Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. *Clinical Cancer Research*, 12(7), 2353s-2358s.
- Awwad, H. K., Lotayef, M., Shouman, T., Begg, A. C., Wilson, G., Bentzen, S. M., Abd El-Moneim, H., & Eissa, S. (2002, Feb 12). Accelerated hyperfractionation (AHF) compared to conventional fractionation (CF) in the postoperative radiotherapy of locally advanced head and neck cancer:

- influence of proliferation. *Br J Cancer*, 86(4), 517-523.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600119>
- Bach, P., Abel, T., Hoffmann, C., Gal, Z., Braun, G., Voelker, I., Ball, C. R., Johnston, I. C., Lauer, U. M., & Herold-Mende, C. (2013). Specific elimination of CD133+ tumor cells with targeted oncolytic measles virus. *Cancer research*, 73(2), 865-874.
- Becker, N., & Holzmeier, S. (2012). Krebsatlas. *Abteilung Epidemiologie von Krebserkrankungen Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg*.
- Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., & Anversa, P. (2003, Sep 19). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *cell*, 114(6), 763-776. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00687-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00687-1)
- Berkhof, J. (2018). The Role of Vaccination in the Prevention of Head and Neck Cancer. In *Critical Issues in Head and Neck Oncology* (pp. 3-13). Springer.
- Bernier, J., Domenge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefebvre, J. L., Greiner, R. H., Giralt, J., Maingon, P., Rolland, F., Bolla, M., Cognetti, F., Bourhis, J., Kirkpatrick, A., & van Glabbeke, M. (2004, May 6). Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*, 350(19), 1945-1952. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032641>
- Beyer, M., & Schultze, J. L. (2006). Regulatory T cells in cancer. *Blood*, 108(3), 804-811.
- Bielli, A., Scioli, M. G., Gentile, P., Cervelli, V., & Orlandi, A. (2015, May-Jun). Adipose Tissue-Derived Stem Cell Therapy for Post-Surgical Breast Reconstruction--More Light than Shadows. *Adv Clin Exp Med*, 24(3), 545-548. <https://doi.org/10.17219/acem/31673>
- Blanchard, P., Garden, A. S., Gunn, G. B., Rosenthal, D. I., Morrison, W. H., Hernandez, M., Crutison, J., Lee, J. J., Ye, R., Fuller, C. D., Mohamed, A. S., Hutcheson, K. A., Holliday, E. B., Thaker, N. G., Sturgis, E. M., Kies, M. S., Zhu, X. R., Mohan, R., & Frank, S. J. (2016, Jul). Intensity-modulated proton beam therapy (IMPT) versus intensity-modulated photon therapy (IMRT) for patients with oropharynx cancer - A case matched analysis. *Radiother Oncol*, 120(1), 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.05.022>
- Blobe, G. C., Schiemann, W. P., & Lodish, H. F. (2000). Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  in Human Disease. *New England Journal of Medicine*, 342(18), 1350-1358. <https://doi.org/10.1056/nejm200005043421807>
- Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Winn, D. M., Austin, D. F., Greenberg, R. S., Preston-Martin, S., Bernstein, L., Schoenberg, J. B., Stemhagen, A., &

- Fraumeni, J. F., Jr. (1988). Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. *Cancer research*, 48(11), 3282-3287.
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M. S., Baselga, J., Yousoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E. K., & Ang, K. K. (2006). Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*, 354(6), 567-578. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa053422>
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R. K., Raben, D., Baselga, J., Spencer, S. A., Zhu, J., Yousoufian, H., Rowinsky, E. K., & Ang, K. K. (2010, Jan). Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol*, 11(1), 21-28. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(09\)70311-0](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(09)70311-0)
- Borst, J., Hendriks, J., & Xiao, Y. (2005). CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Current opinion in immunology*, 17(3), 275-281.
- Bourhis, J., Sire, C., Graff, P., Gregoire, V., Maingon, P., Calais, G., Gery, B., Martin, L., Alfonsi, M., Desprez, P., Pignon, T., Bardet, E., Rives, M., Geoffrois, L., Daly-Schweitzer, N., Sen, S., Tuchais, C., Dupuis, O., Guerif, S., Lapeyre, M., Favrel, V., Hamoir, M., Lusinchi, A., Temam, S., Pinna, A., Tao, Y. G., Blanchard, P., & Auperin, A. (2012, Feb). Concomitant chemoradiotherapy versus acceleration of radiotherapy with or without concomitant chemotherapy in locally advanced head and neck carcinoma (GORTEC 99-02): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol*, 13(2), 145-153. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(11\)70346-1](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(11)70346-1)
- Brat, D. J., Bellail, A. C., & Van Meir, E. G. (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-Oncology*, 7(2), 122-133. <https://doi.org/10.1215/s1152851704001061>
- Brodbeck, T., Nehmann, N., Bethge, A., Wedemann, G., & Schumacher, U. (2014). Perforin-dependent direct cytotoxicity in natural killer cells induces considerable knockdown of spontaneous lung metastases and computer modelling-proven tumor cell dormancy in a HT29 human colon cancer xenograft mouse model. *Molecular cancer*, 13, 244-244. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-244>
- Burnet, M. (1957, Apr 6). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J*, 1(5022), 779-786. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5022.779>
- Burtneß, B., Goldwasser, M. A., Flood, W., Mattar, B., & Forastiere, A. A. (2005). Phase III Randomized Trial of Cisplatin Plus Placebo Compared With Cisplatin Plus Cetuximab in Metastatic/Recurrent Head and Neck Cancer: An Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*, 23(34), 8646-8654. <https://doi.org/10.1200/jco.2005.02.4646>

- Burtness, B., Harrington, K. J., Greil, R., Soulières, D., Tahara, M., de Castro Jr, G., Psyrris, A., Basté, N., Neupane, P., & Bratland, Å. (2019). Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*.
- Busch, D. H., Fräßle, S. P., Sommermeyer, D., Buchholz, V. R., & Riddell, S. R. (2016). Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy. *Seminars in immunology*,
- Califano, J., Van Der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., & Koch, W. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer research*, 56(11), 2488-2492.
- Cao, C., Dong, Y., & Dong, Y. (2005, Aug). [Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 19(8), 642-647.
- Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnica-Worms, D. R., & Ley, T. J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, 27(4), 635-646.
- Carey, T. E., Hay, R., Park, J., & Gazdar, A. (1994). Head and neck tumor cell lines. In *Atlas of human tumor cell lines* (pp. 79-120). Academic Press, Inc, New York.
- Ceccarelli, S., Pontecorvi, P., Anastasiadou, E., Napoli, C., & Marchese, C. (2020, 2020-April-17). Immunomodulatory Effect of Adipose-Derived Stem Cells: The Cutting Edge of Clinical Application [Mini Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(236). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00236>
- Chambers, C. A., Krummel, M. E., Boitel, B., Hurwitz, A., Sullivan, T. J., Fournier, S., Cassell, D., Brunner, M., & Allison, J. P. (1996, 1996/10/01). The Role of CTLA-4 in the Regulation and Initiation of T-Cell Responses. *Immunological Reviews*, 153(1), 27-46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1996.tb00919.x>
- Chan, A. T., Leung, S. F., Ngan, R. K., Teo, P. M., Lau, W. H., Kwan, W. H., Hui, E. P., Yiu, H. Y., Yeo, W., Cheung, F. Y., Yu, K. H., Chiu, K. W., Chan, D. T., Mok, T. S., Yau, S., Yuen, K. T., Mo, F. K., Lai, M. M., Ma, B. B., Kam, M. K., Leung, T. W., Johnson, P. J., Choi, P. H., & Zee, B. C. (2005, Apr 6). Overall survival after concurrent cisplatin-radiotherapy compared with radiotherapy alone in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 97(7), 536-539. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji084>
- Chan, L.-P., Wang, L.-F., Chiang, F.-Y., Lee, K.-W., Kuo, P.-L., & Liang, C.-H. (2016). IL-8 promotes HNSCC progression on CXCR1/2-mediated

- NOD1/RIP2 signaling pathway. *Oncotarget*, 7(38), 61820-61831. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11445>
- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Anderson, W. F., & Gillison, M. L. (2008). Incidence Trends for Human Papillomavirus–Related and –Unrelated Oral Squamous Cell Carcinomas in the United States. *Journal of Clinical Oncology*, 26(4), 612-619. <https://doi.org/10.1200/jco.2007.14.1713>
- Church, C. D., Berry, R., & Rodeheffer, M. S. (2014). Isolation and Study of Adipocyte Precursors-Chapter Three. *Methods in Enzymology*, 537, 31-46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411619-1.00003-3>
- Clayberger, C., & Krensky, A. M. (2003). Granulysin. *Current opinion in immunology*, 15(5), 560-565.
- Cooper, J. S., Zhang, Q., Pajak, T. F., Forastiere, A. A., Jacobs, J., Saxman, S. B., Kish, J. A., Kim, H. E., Cmelak, A. J., Rotman, M., Lustig, R., Ensley, J. F., Thorstad, W., Schultz, C. J., Yom, S. S., & Ang, K. K. (2012, Dec 1). Long-term follow-up of the RTOG 9501/intergroup phase III trial: postoperative concurrent radiation therapy and chemotherapy in high-risk squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 84(5), 1198-1205. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.05.008>
- Cousin, B., Ravet, E., Poglio, S., De Toni, F., Bertuzzi, M., Lulka, H., Touil, I., André, M., Grolleau, J.-L., & Péron, J.-M. (2009). Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PLoS one*, 4(7), e6278.
- Curiel, T. J. (2008). Regulatory T cells and treatment of cancer. *Current opinion in immunology*, 20(2), 241-246. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.04.008>
- D'Souza, G., Kreimer, A. R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W. M., Westra, W. H., & Gillison, M. L. (2007). Case–Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 356(19), 1944-1956. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065497>
- Dahlstrom, K. R., Calzada, G., Hanby, J. D., Garden, A. S., Glisson, B. S., Li, G., Roberts, D. B., Weber, R. S., & Sturgis, E. M. (2013). An evolution in demographics, treatment, and outcomes of oropharyngeal cancer at a major cancer center. *Cancer*, 119(1), 81-89.
- Danan, D., Lehman, C. E., Mendez, R. E., Langford, B., Koors, P. D., Dougherty, M. I., Peirce, S. M., Gioeli, D. G., & Jameson, M. J. (2018). Effect of Adipose-Derived Stem Cells on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 158(5), 882-888. <https://doi.org/10.1177/0194599817750361>
- Dayyani, F., Etzel, C. J., Liu, M., Ho, C.-H., Lippman, S. M., & Tsao, A. S. (2010, June 29). Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) [journal article]. *Head & Neck Oncology*, 2(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1758-3284-2-15>

- De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., & Luyten, F. P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism*, 44(8), 1928-1942.
- de Ruiter, E. J., Ooft, M. L., Devriese, L. A., & Willems, S. M. (2017, 2017/11/02). The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*, 6(11), e1356148. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1356148>
- DESTATIS. (2015). Todesursachen in Deutschland. *Statistisches Bundesamt*, 4(12).
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y. Y., Meulle, A., Salles, B., & Le Gonidec, S. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer research*, 71(7), 2455-2465.
- Djouad, F., Plerce, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noël, D., & Jorgensen, C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, 102(10), 3837-3844.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002, Nov). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3(11), 991-998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 329-360.
- Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. *New England Journal of Medicine*, 315(26), 1650-1659.
- Estrella, V., Chen, T., Lloyd, M., Wojtkowiak, J., Cornell, H. H., Ibrahim-Hashim, A., Bailey, K., Balagurunathan, Y., Rothberg, J. M., Sloane, B. F., Johnson, J., Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2013). Acidity Generated by the Tumor Microenvironment Drives Local Invasion. *Cancer research*, 73(5), 1524. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2796>
- Feisst, V., Meidinger, S., & Locke, M. B. (2015). From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem cells and cloning: advances and applications*, 8, 149.
- Ferris, R. L., Blumenschein, G. J., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., Harrington, K., Kasper, S., Vokes, E. E., Even, C., Worden, F., Saba,

- N. F., Iglesias Docampo, L. C., Haddad, R., Rordorf, T., Kiyota, N., Tahara, M., Monga, M., Lynch, M., Geese, W. J., Kopit, J., Shaw, J. W., & Gillison, M. L. (2016). Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*, 375(19), 1856-1867. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602252>
- Fietkau, R., Lautenschläger, C., Sauer, R., Dunst, J., Becker, A., Baumann, M., Wendt, T., Gruschow, K., Hess, C., Budach, V., & Iro, H. (2006). Postoperative concurrent radiochemotherapy versus radiotherapy in high-risk SCCA of the head and neck: Results of the German phase III trial ARO 96-3. *Journal of Clinical Oncology*, 24(18\_suppl), 5507-5507. [https://doi.org/10.1200/jco.2006.24.18\\_suppl.5507](https://doi.org/10.1200/jco.2006.24.18_suppl.5507)
- Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M. R., Isenberg, D. A., & Mauri, C. (2013). CD19+ CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Science translational medicine*, 5(173), 173ra123-173ra123.
- Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z., & Hedrick, M. H. (2006, Apr). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 24(4), 150-154. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.01.010>
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., & Kulagina, N. N. (1976, Sep). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4(5), 267-274.
- Fu, X., Han, B., Cai, S., Lei, Y., Sun, T., & Sheng, Z. (2009). Migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  and its possible role in wound healing. *Wound repair and regeneration*, 17(2), 185-191.
- Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*, 14(10), 1014.
- Gehmert, S., Gehmert, S., Prantl, L., Vykoukal, J., Alt, E., & Song, Y.-H. (2010, 2010/07/30/). Breast cancer cells attract the migration of adipose tissue-derived stem cells via the PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(3), 601-605. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.132>
- Gheybi, M. K., Farrokhi, S., Ravanbod, M. R., Ostovar, A., Mehrzad, V., & Nematollahi, P. (2017, 2017/11/01). The correlation of CD19 + CD24 + CD38 + B cells and other clinicopathological variables with the proportion of circulating Tregs in breast cancer patients. *Breast Cancer*, 24(6), 756-764. <https://doi.org/10.1007/s12282-017-0775-y>
- Ghiringhelli, F., Ménard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P. E., Novault, S., Escudier, B., & Vivier, E. (2005). CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- $\beta$ -dependent manner. *Journal of Experimental Medicine*, 202(8), 1075-1085.

- Gillison, M. L. (2004). Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol*,
- Gorer, P. (1956). Some recent work on tumor immunity. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 4, pp. 149-186). Elsevier.
- Graziano, D. F., & Finn, O. J. (2005). Tumor antigens and tumor antigen discovery. In *Tumor Immunology and Cancer Vaccines* (pp. 89-111). Springer.
- Griffiths, M. J., Bonnet, D., & Janes, S. M. (2005, Jul 16-22). Stem cells of the alveolar epithelium. *Lancet*, 366(9481), 249-260. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)66916-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)66916-4)
- Grulich, A. E., Van Leeuwen, M. T., Falster, M. O., & Vajdic, C. M. (2007). Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *The Lancet*, 370(9581), 59-67.
- Guan, J., & Chen, J. (2013, 2013/07/01). Mesenchymal stem cells in the tumor microenvironment (Review). *Biomed Rep*, 1(4), 517-521. <https://doi.org/10.3892/br.2013.103>
- Habif, G., Crinier, A., André, P., Vivier, E., & Narni-Mancinelli, E. (2019, 2019/05/01). Targeting natural killer cells in solid tumors. *Cellular & Molecular Immunology*, 16(5), 415-422. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0224-2>
- Hagemann, J., Jacobi, C., Hahn, M., Schmid, V., Welz, C., Schwenk-Zieger, S., Stauber, R., Baumeister, P., & Becker, S. (2017). Spheroid-based 3D cell cultures enable personalized therapy testing and drug discovery in head and neck cancer. *Anticancer research*, 37(5), 2201-2210.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S.-C., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wünsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Kelsey, K., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Lence, J. J., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., McClean, M. D., Muscat, J., Eluf-Neto, J., Olshan, A. F., Purdue, M., Rudnai, P., Schwartz, S. M., Smith, E., Sturgis, E. M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q., Winn, D. M., Shangina, O., Pilarska, A., Zhang, Z.-F., Ferro, G., Berthiller, J., & Boffetta, P. (2009). Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research*,

cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 18(2), 541-550. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0347>

- Hu, G., Wu, P., Cheng, P., Zhang, Z., Wang, Z., Yu, X., Shao, X., Wu, D., Ye, J., Zhang, T., Wang, X., Qiu, F., Yan, J., & Huang, J. (2017, 2017/02/01). Tumor-infiltrating CD39+  $\gamma\delta$ Tregs are novel immunosuppressive T cells in human colorectal cancer. *Oncoimmunology*, 6(2), e1277305. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1277305>
- Huang, B., Lei, Z., Zhao, J., Gong, W., Liu, J., Chen, Z., Liu, Y., Li, D., Yuan, Y., & Zhang, G.-M. (2007). CCL2/CCR2 pathway mediates recruitment of myeloid suppressor cells to cancers. *Cancer letters*, 252(1), 86-92.
- Huang, S. H., & O'Sullivan, B. (2017, May 29). Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer [journal article]. *Curr Treat Options Oncol*, 18(7), 40. <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0484-y>
- Huang, S. H., Perez-Ordóñez, B., Liu, F. F., Waldron, J., Ringash, J., Irish, J., Cummings, B., Siu, L. L., Kim, J., Weinreb, I., Hope, A., Gullane, P., Brown, D., Shi, W., & O'Sullivan, B. (2012, Jan 1). Atypical clinical behavior of p16-confirmed HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 82(1), 276-283. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.08.031>
- Huber, S., Schramm, C., Lehr, H. A., Mann, A., Schmitt, S., Becker, C., Protschka, M., Galle, P. R., Neurath, M. F., & Blessing, M. (2004). Cutting edge: TGF- $\beta$  signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+ CD25+ T cells. *The Journal of Immunology*, 173(11), 6526-6531.
- Hussein, A. A., Helder, M. N., de Visscher, J. G., Leemans, C. R., Braakhuis, B. J., de Vet, H. C. W., & Forouzanfar, T. (2017, Sep). Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review. *Eur J Cancer*, 82, 115-127. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.05.026>
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., & Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), 12293-12297.
- J. Beck-Mannagetta, M. B., K. Vinzenz, M. Kopp, S. Rosenlechner. (2011). Kopf-Hals-Malignome. *Manual der Chirurgischen Krebstherapie*(3).
- Jacobs, C., Lyman, G., Velez-García, E., Sridhar, K. S., Knight, W., Hochster, H., Goodnough, L. T., Mortimer, J. E., Einhorn, L. H., & Schacter, L. (1992). A phase III randomized study comparing cisplatin and fluorouracil as single agents and in combination for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Clinical Oncology*, 10(2), 257-263.

- Jenkins, R. W., Barbie, D. A., & Flaherty, K. T. (2018, 2018/01/01). Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *British Journal of Cancer*, *118*(1), 9-16. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.434>
- Jiang, X.-X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.-X., Wu, Y., Yu, X.-D., & Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, *105*(10), 4120-4126.
- Kang, J. W., Kang, K.-S., Koo, H. C., Park, J. R., Choi, E. W., & Park, Y. H. (2008). Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, *17*(4), 681-694.
- Kansy, B. A., Dissmann, P. A., Hemed, H., Bruderek, K., Westerkamp, A. M., Jagalski, V., Schuler, P., Kansy, K., Lang, S., Dumitru, C. A., & Brandau, S. (2014, Aug 12). The bidirectional tumor-mesenchymal stromal cell interaction promotes the progression of head and neck cancer. *Stem Cell Res Ther*, *5*(4), 95. <https://doi.org/10.1186/scrt484>
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *STEM CELLS*, *24*(5), 1294-1301.
- Khakoo, A. Y., Pati, S., Anderson, S. A., Reid, W., Elshal, M. F., Rovira, I. I., Nguyen, A. T., Malide, D., Combs, C. A., & Hall, G. (2006). Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(5), 1235-1247.
- Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J. L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., Battula, V. L., Weil, M., Andreeff, M., & Marini, F. C. (2009). Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *STEM CELLS*, *27*(10), 2614-2623.
- Kidd, S., Spaeth, E., Watson, K., Burks, J., Lu, H., Klopp, A., Andreeff, M., & Marini, F. C. (2012). Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PloS one*, *7*(2), e30563.
- Kim, H. R., Ha, S.-J., Hong, M. H., Heo, S. J., Koh, Y. W., Choi, E. C., Kim, E. K., Pyo, K. H., Jung, I., Seo, D., Choi, J., Cho, B. C., & Yoon, S. O. (2016, 2016/11/14). PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. *Sci Rep*, *6*(1), 36956. <https://doi.org/10.1038/srep36956>
- Klopp, A. H., Spaeth, E. L., Dembinski, J. L., Woodward, W. A., Munshi, A., Meyn, R. E., Cox, J. D., Andreeff, M., & Marini, F. C. (2007). Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer research*, *67*(24), 11687. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1406>

- Klyushnenkova, E., Mosca, J. D., Zernetkina, V., Majumdar, M. K., Beggs, K. J., Simonetti, D. W., Deans, R. J., & McIntosh, K. R. (2005). T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *Journal of biomedical science*, 12(1), 47-57.
- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J., & Schreiber, R. D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450(7171), 903.
- Komdeur, F. L., Prins, T. M., van de Wall, S., Plat, A., Wisman, G. B. A., Hollema, H., Daemen, T., Church, D. N., De Bruyn, M., & Nijman, H. W. (2017). CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-reactive intraepithelial CD8+ T cells associated with prognostic benefit and therapy response in cervical cancer. *Oncoimmunology*, 6(9), e1338230.
- Konjević, G., Mirjačić Martinović, K., Vuletić, A., Jović, V., Jurisić, V., Babović, N., & Spužić, I. (2007, 2007/03/01). Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clinical & experimental metastasis*, 24(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s10585-006-9043-9>
- Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., & Dazzi, F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101(9), 3722-3729.
- Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P., & Franceschi, S. (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 14(2), 467-475.
- Kryczek, I., Liu, R., Wang, G., Wu, K., Shu, X., Szeliga, W., Vatan, L., Finlayson, E., Huang, E., Simeone, D., Redman, B., Welling, T. H., Chang, A., & Zou, W. (2009). FOXP3 Defines Regulatory T Cells in Human Tumor and Autoimmune Disease. *Cancer research*, 69(9), 3995. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3804>
- Kundu, S. K., & Nestor, M. (2012, June 01). Targeted therapy in head and neck cancer [journal article]. *Tumor Biology*, 33(3), 707-721. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0350-2>
- Kurioka, A., Cosgrove, C., Simoni, Y., van Wilgenburg, B., Geremia, A., Björkander, S., Sverremark-Ekström, E., Thurnheer, C., Günthard, H. F., Khanna, N., Swiss, H. I. V. C. S., Oxford, I. B. D. C. I., Walker, L. J., Arancibia-Cárcamo, C. V., Newell, E. W., Willberg, C. B., & Klenerman, P. (2018). CD161 Defines a Functionally Distinct Subset of Pro-Inflammatory Natural Killer Cells. *Front Immunol*, 9, 486-486. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00486>
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., & Gaborilovich, D. I. (2004). Antigen-Specific Inhibition of CD8<sup>+</sup> T Cell Response by Immature Myeloid Cells in Cancer Is Mediated by Reactive Oxygen

- Species. *The Journal of Immunology*, 172(2), 989.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.989>
- Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996, Mar 22). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271(5256), 1734-1736.  
<https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1734>
- Lee, H. K., Finniss, S., Cazacu, S., Bucris, E., Ziv-Av, A., Xiang, C., Bobbitt, K., Rempel, S. A., Hasselbach, L., & Mikkelsen, T. (2013). Mesenchymal stem cells deliver synthetic microRNA mimics to glioma cells and glioma stem cells and inhibit their cell migration and self-renewal. *Oncotarget*, 4(2), 346.
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews cancer*, 11(1), 9.
- Li, A., Dubey, S., Varney, M. L., Dave, B. J., & Singh, R. K. (2003, Mar 15). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*, 170(6), 3369-3376. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3369>
- Li, M. O., & Flavell, R. A. (2008). TGF- $\beta$ : A Master of All T Cell Trades. *cell*, 134(3), 392-404. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.025>
- Liang, M. (2018). Oncorine, the world first oncolytic virus medicine and its update in China. *Current cancer drug targets*, 18(2), 171-176.
- Liotta, F., Querci, V., Mannelli, G., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Rossi, M. C., Mazzoni, A., Cosmi, L., Romagnani, S., Maggi, E., Gallo, O., & Annunziato, F. (2015). Mesenchymal stem cells are enriched in head neck squamous cell carcinoma, correlates with tumour size and inhibit T- cell proliferation. *British Journal of Cancer*, 112(4).  
<https://doi.org/10.1038/bjc.2015.15>
- Liu, J., Zhang, N., Li, Q., Zhang, W., Ke, F., Leng, Q., Wang, H., Chen, J., & Wang, H. (2011). Tumor-associated macrophages recruit CCR6+ regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice. *PloS one*, 6(4), e19495.
- Liu, V. C., Wong, L. Y., Jang, T., Shah, A. H., Park, I., Yang, X., Zhang, Q., Lonning, S., Teicher, B. A., & Lee, C. (2007). Tumor evasion of the immune system by converting CD4+ CD25- T cells into CD4+ CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF- $\beta$ . *The Journal of Immunology*, 178(5), 2883-2892.
- Lorusso, G., & Rüegg, C. (2008, December 01). The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis [journal article]. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(6), 1091-1103.  
<https://doi.org/10.1007/s00418-008-0530-8>

- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., & Wang, Y. (2014, 2014/02/01). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation*, 21(2), 216-225. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.158>
- Maasland, D. H., van den Brandt, P. A., Kremer, B., Goldbohm, R. A., & Schouten, L. J. (2014, March 14). Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study [journal article]. *BMC Cancer*, 14(1), 187. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-187>
- Mandelboim, O., Malik, P., Davis, D. M., Jo, C. H., Boyson, J. E., & Strominger, J. L. (1999). Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5640. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5640>
- Marin-Acevedo, J. A., Dholaria, B., Soyano, A. E., Knutson, K. L., Chumsri, S., & Lou, Y. (2018). Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 39.
- Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., & Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, 13(1), 453-461.
- Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005, 2005/03/01). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(6), 670. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>
- McDermott, D. F., & Atkins, M. B. (2004). Application of IL-2 and other cytokines in renal cancer. *Expert opinion on biological therapy*, 4(4), 455-468.
- McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Mitchell, J. B., Floyd, Z. E., Hammill, L., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Ting, J. P., & Storms, R. W. (2006). The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *STEM CELLS*, 24(5), 1246-1253.
- Mehanna, H., Beech, T., Nicholson, T., El-Hariry, I., McConkey, C., Paleri, V., & Roberts, S. (2013). Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer—systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck*, 35(5), 747-755.
- Mehanna, H., Robinson, M., Hartley, A., Kong, A., Foran, B., Fulton-Lieuw, T., Dalby, M., Mistry, P., Sen, M., O'Toole, L., Al Booz, H., Dyker, K., Moleron, R., Whitaker, S., Brennan, S., Cook, A., Griffin, M., Aynsley, E., Rolles, M., De Winton, E., Chan, A., Srinivasan, D., Nixon, I., Grumett, J., Leemans, C. R., Buter, J., Henderson, J., Harrington, K., McConkey, C., Gray, A., & Dunn, J. (2019, Jan 5). Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*, 393(10166), 51-60. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)32752-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)32752-1)
- Melissaridou, S., Wiechec, E., Magan, M., Jain, M. V., Chung, M. K., Farnebo, L., & Roberg, K. (2019, 2019/01/14). The effect of 2D and 3D cell cultures

- on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell International*, 19(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0733-1>
- Mendenhall, W. M., Morris, C. G., Amdur, R. J., Hinerman, R. W., Malyapa, R. S., Werning, J. W., Lansford, C. D., & Villaret, D. B. (2006, Jun). Definitive radiotherapy for tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Clin Oncol*, 29(3), 290-297. <https://doi.org/10.1097/O1.coc.0000209510.19360.f9>
- Mishra, R. C., Singh, D. N., & Mishra, T. K. (1996, Oct). Post-operative radiotherapy in carcinoma of buccal mucosa, a prospective randomized trial. *Eur J Surg Oncol*, 22(5), 502-504.
- Moncharmont, C., Levy, A., Guy, J.-B., Falk, A. T., Guilbert, M., Trone, J.-C., Alphonse, G., Gilormini, M., Ardail, D., & Toillon, R.-A. (2014). Radiation-enhanced cell migration/invasion process: a review. *Critical reviews in oncology/hematology*, 92(2), 133-142.
- Morata-Tarifa, C., Jimenez, G., Garcia, M. A., Entrena, J. M., Grinan-Lison, C., Aguilera, M., Picon-Ruiz, M., & Marchal, J. A. (2016, Jan 11). Low adherent cancer cell subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem-like cells. *Sci Rep*, 6, 18772. <https://doi.org/10.1038/srep18772>
- Moskovitz, J., Moy, J., & Ferris, R. L. (2018, March 03). Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma [journal article]. *Current Oncology Reports*, 20(2), 22. <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0654-5>
- Muehlberg, F. L., Song, Y.-H., Krohn, A., Pinilla, S. P., Droll, L. H., Leng, X., Seidensticker, M., Ricke, J., Altman, A. M., & Devarajan, E. (2009). Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis*, 30(4), 589-597.
- Murphy, M. B., Moncivais, K., & Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & molecular medicine*, 45(11), e54.
- Nelson, B. H. (2010). CD20<sup>+</sup> B Cells: The Other Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 185(9), 4977. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001323>
- Network, N. C. C. (2017). Clinical practice guidelines, head and neck cancer. Version 1.
- Nguyen, N., Bellile, E., Thomas, D., McHugh, J., Rozek, L., Virani, S., Peterson, L., Carey, T. E., Walline, H., & Moyer, J. (2016). Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 38(7), 1074-1084.
- Nowicka, A., Marini, F. C., Solley, T. N., Elizondo, P. B., Zhang, Y., Sharp, H. J., Broaddus, R., Kolonin, M., Mok, S. C., & Thompson, M. S. (2013). Human

omenta-derived adipose stem cells increase ovarian cancer proliferation, migration, and chemoresistance. *PloS one*, 8(12).

Olkhanud, P. B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R. E., Sen, R., Wejksza, K., Malchinkhuu, E., Wersto, R. P., & Biragyn, A. (2011). Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4+ T cells to T-regulatory cells. *Cancer research*, 71(10), 3505-3515.

Orecchioni, S., Gregato, G., Martin-Padura, I., Reggiani, F., Braidotti, P., Mancuso, P., Calleri, A., Quarna, J., Marighetti, P., & Aldeni, C. (2013). Complementary populations of human adipose CD34+ progenitor cells promote growth, angiogenesis, and metastasis of breast cancer. *Cancer research*, 73(19), 5880-5891.

Otsu, K., Das, S., Houser, S. D., Quadri, S. K., Bhattacharya, S., & Bhattacharya, J. (2009). Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood*, 113(18), 4197-4205.

Pages, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M., Tartour, E., Sautes-Fridman, C., & Fridman, W. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29(8), 1093-1102.

Palena, C., Hamilton, D. H., & Fernando, R. I. (2012). Influence of IL-8 on the epithelial–mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncology*, 8(6), 713-722. <https://doi.org/10.2217/fon.12.59>

Palucka, K., & Banchereau, J. (2013). Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity*, 39(1), 38-48.

Patel, S. A., Meyer, J. R., Greco, S. J., Corcoran, K. E., Bryan, M., & Rameshwar, P. (2010). Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF- $\beta$ . *The Journal of Immunology*, 184(10), 5885-5894.

Pennick, M. O. (2017). Is the Reparative Efficacy of Adipose-Derived Stem Cells Affected by Anatomical Harvest Site? *American Journal of Hematology/Oncology®*, 12(10).

Petrelli, F., Coinu, A., Riboldi, V., Borgonovo, K., Ghilardi, M., Cabiddu, M., Lonati, V., Sarti, E., & Barni, S. (2014). Concomitant platinum-based chemotherapy or cetuximab with radiotherapy for locally advanced head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis of published studies. *Oral Oncology*, 50(11), 1041-1048.

Phulpin, B., Gangloff, P., Tran, N., Bravetti, P., Merlin, J.-L., & Dolivet, G. (2009). Rehabilitation of irradiated head and neck tissues by autologous fat transplantation. *Plastic and reconstructive surgery*, 123(4), 1187-1197.

Pickhard, A. C., Margraf, J., Knopf, A., Stark, T., Piontek, G., Beck, C., Boulesteix, A.-L., Scherer, E. Q., Pigorsch, S., Schlegel, J., Arnold, W., & Reiter, R. (2011). Inhibition of radiation induced migration of human head and neck

- squamous cell carcinoma cells by blocking of EGF receptor pathways. *BMC Cancer*, 11, 388-388. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-388>
- Post, M., Cuapio, A., Osl, M., Lehmann, D., Resch, U., Davies, D. M., Bilban, M., Schlechta, B., Eppel, W., & Nathwani, A. (2017). The transcription factor ZNF683/HOBIT regulates human NK-cell development. *Front Immunol*, 8, 535.
- Prantl, L., Muehlberg, F., Navone, N. M., Song, Y. H., Vykoukal, J., Logothetis, C. J., & Alt, E. U. (2010). Adipose tissue-derived stem cells promote prostate tumor growth. *The Prostate*, 70(15), 1709-1715.
- Prasad, K. V., Ao, Z., Yoon, Y., Wu, M. X., Rizk, M., Jacquot, S., & Schlossman, S. F. (1997). CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), 6346-6351. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6346>
- Prevosto, C., Zancolli, M., Canevali, P., Zocchi, M. R., & Poggi, A. (2007). Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *haematologica*, 92(7), 881-888.
- Puissant, B., Barreau, C., Bourin, P., Clavel, C., Corre, J., Bousquet, C., Taureau, C., Cousin, B., Abbal, M., & Laharrague, P. (2005). Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British journal of haematology*, 129(1), 118-129.
- Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D., & Sotomayor, E. M. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 267-296.
- Rajaratnam, K., Sykes, B. D., Kay, C. M., Dewald, B., Geiser, T., Baggiolini, M., & Clark-Lewis, I. (1994, Apr 1). Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science*, 264(5155), 90-92. <https://doi.org/10.1126/science.8140420>
- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S. A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jäättelä, M., Penninger, J. M., Garrido, C., & Kroemer, G. (2001, 2001/09/01). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature Cell Biology*, 3(9), 839-843. <https://doi.org/10.1038/ncb0901-839>
- Razmkhah, M., Jaberipour, M., Erfani, N., Habibagahi, M., Talei, A.-r., & Ghaderi, A. (2011). Adipose derived stem cells (ASCs) isolated from breast cancer tissue express IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$ 1 and upregulate expression of regulatory molecules on T cells: do they protect breast cancer cells from the immune response? *Cellular immunology*, 266(2), 116-122.
- Razmkhah, M., Mansourabadi, Z., Mohtasebi, M. S., Talei, A. R., & Ghaderi, A. (2018). Cancer and normal adipose-derived mesenchymal stem cells

- (ASCs): do they have differential effects on tumor and immune cells? *Cell biology international*, 42(3), 334-343.
- Rebucci, M., Peixoto, P., Dewitte, A., Wattez, N., De Nuncques, M.-A., Rezvoy, N., Vautravers-Dewas, C., Buisine, M.-P., Guerin, E., & Peyrat, J.-P. (2011). Mechanisms underlying resistance to cetuximab in the HNSCC cell line: role of AKT inhibition in bypassing this resistance. *International journal of oncology*, 38(1), 189-200.
- Rech, A. J., & Vonderheide, R. H. (2009). Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1174(1), 99.
- Ren, Z., Peng, H., & Fu, Y.-X. (2016). PD-1 Shapes B Cells as Evildoers in the Tumor Microenvironment. *Cancer Discovery*, 6(5), 477. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0307>
- Rettig, E. M., & D'Souza, G. (2015, Jul). Epidemiology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, 24(3), 379-396. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.001>
- Ridge, S. M., Sullivan, F. J., & Glynn, S. A. (2017). Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Molecular cancer*, 16(1), 31-31. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0597-8>
- Robert-Koch-Institut. (2014). Krebs in Deutschland 2013/14. *Zentrum für Krebsregisterdaten*, 11.
- Robert-Koch-Institut. (2016). Epidemiologie von Krebserkrankungen. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland*.
- Roithmaier, S., Haydon, A. M., Loi, S., Esmore, D., Griffiths, A., Bergin, P., Williams, T. J., & Schwarz, M. A. (2007, Aug). Incidence of malignancies in heart and/or lung transplant recipients: a single-institution experience. *J Heart Lung Transplant*, 26(8), 845-849. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2007.05.019>
- Rowan, B. G., Gimble, J. M., Sheng, M., Anbalagan, M., Jones, R. K., Frazier, T. P., Asher, M., Lacayo, E. A., Friedlander, P. L., & Kutner, R. (2014). Human adipose tissue-derived stromal/stem cells promote migration and early metastasis of triple negative breast cancer xenografts. *PloS one*, 9(2).
- Rowan, B. G., Lacayo, E. A., Sheng, M., Anbalagan, M., Gimble, J. M., Jones, R. K., Joseph, W. J., Friedlander, P. L., & Chiu, E. S. (2016, Jan). Human Adipose Tissue-Derived Stromal/Stem Cells Promote Migration and Early Metastasis of Head and Neck Cancer Xenografts. *Aesthet Surg J*, 36(1), 93-104. <https://doi.org/10.1093/asj/sjv090>

- Russell, S. J., Peng, K.-W., & Bell, J. C. (2012, 2012/07/01). Oncolytic virotherapy. *Nature Biotechnology*, 30(7), 658-670. <https://doi.org/10.1038/nbt.2287>
- Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., & Shimizu, H. (2008). Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *The Journal of Immunology*, 180(4), 2581-2587.
- Satish, L., Krill-Burger, J. M., Gallo, P. H., Etages, S. D., Liu, F., Philips, B. J., Ravuri, S., Marra, K. G., LaFramboise, W. A., Kathju, S., & Rubin, J. P. (2015, 2015/07/24). Expression analysis of human adipose-derived stem cells during in vitro differentiation to an adipocyte lineage. *BMC Medical Genomics*, 8(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0119-8>
- Schiefler, C., Piontek, G., Doescher, J., Schuettler, D., Mißbeck, M., Rudelius, M., Haug, A., Reiter, R., Brockhoff, G., & Pickhard, A. (2014). Inhibition of SphK1 reduces radiation-induced migration and enhances sensitivity to cetuximab treatment by affecting the EGFR/SphK1 crosstalk. *Oncotarget*, 5(20), 9877.
- Seiwert, T. Y., & Cohen, E. E. W. (2005, 2005/04/01). State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. *British Journal of Cancer*, 92(8), 1341-1348. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602510>
- Shalapour, S., Font-Burgada, J., Di Caro, G., Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., Dhar, D., Willimsky, G., Ammirante, M., Strasner, A., Hansel, D. E., Jamieson, C., Kane, C. J., Klatter, T., Birner, P., Kenner, L., & Karin, M. (2015, May 7). Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature*, 521(7550), 94-98. <https://doi.org/10.1038/nature14395>
- Shaw, R., & Beasley, N. (2016, May). Aetiology and risk factors for head and neck cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol*, 130(Suppl 2), S9-s12. <https://doi.org/10.1017/s0022215116000360>
- Shevach, E. M. (2000, 2000/04/01). Regulatory T Cells in Autoimmunity. *Annual Review of Immunology*, 18(1), 423-449. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.423>
- Shevach, E. M., Davidson, T. S., Huter, E. N., DiPaolo, R. A., & Andersson, J. (2008). Role of TGF- $\beta$  in the induction of Foxp3 expression and T regulatory cell function. *Journal of clinical immunology*, 28(6), 640-646.
- Shi, S., Zhang, Q., Xia, Y., You, B., Shan, Y., Bao, L., Li, L., You, Y., & Gu, Z. (2016). Mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitate nasopharyngeal carcinoma progression. *American journal of cancer research*, 6(2), 459-472. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27186416>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859673/>

- Shinagawa, K., Kitadai, Y., Tanaka, M., Sumida, T., Kodama, M., Higashi, Y., Tanaka, S., Yasui, W., & Chayama, K. (2010). Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer*, *127*(10), 2323-2333.
- Simard, E. P., Torre, L. A., & Jemal, A. (2014). International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncology*, *50*(5), 387-403. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.01.016>
- Slaughter, D. P., Southwick, H. W., & Smejkal, W. (1953). "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, *6*(5), 963-968.
- Sowa, M. B., Chrisler, W. B., Zens, K. D., Ashjian, E. J., & Opresko, L. K. (2010). Three-dimensional culture conditions lead to decreased radiation induced cytotoxicity in human mammary epithelial cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *687*(1-2), 78-83.
- Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O., & Michalek, J. (2012, Sep 20). Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*, *21*(14), 2724-2752. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0722>
- Stromberger, C. (2019). Primäre und adjuvante Radio (chemo) therapie bei Kopf-Hals-Tumoren. *Der Onkologe*, *25*(3), 240-245.
- Sturgis, E. M., & Cinciripini, P. M. (2007). Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence. *Cancer*, *110*(7), 1429-1435. <https://doi.org/10.1002/cncr.22963>
- Su, W.-H., Chuang, P.-C., Huang, E.-Y., & Yang, K. D. (2012). Radiation-induced increase in cell migration and metastatic potential of cervical cancer cells operates via the K-Ras pathway. *The American journal of pathology*, *180*(2), 862-871.
- Sun, B., Roh, K.-H., Park, J.-R., Lee, S.-R., Park, S.-B., Jung, J.-W., Kang, S.-K., Lee, Y.-S., & Kang, K.-S. (2009). Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells in a mouse breast cancer metastasis model. *Cytotherapy*, *11*(3), 289-298.
- Sun, X., Zhang, T., Li, M., Yin, L., & Xue, J. (2019). Immunosuppressive B cells expressing PD-1/PD-L1 in solid tumors: a mini review. *QJM: An International Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcz162>
- Szturz, P., Wouters, K., Kiyota, N., Tahara, M., Prabhash, K., Noronha, V., Castro, A., Licitra, L., Adelstein, D., & Vermorken, J. B. (2017, Sep). Weekly Low-Dose Versus Three-Weekly High-Dose Cisplatin for Concurrent Chemoradiation in Locoregionally Advanced Non-Nasopharyngeal Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-

Analysis of Aggregate Data. *Oncologist*, 22(9), 1056-1066.  
<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0015>

- Tabera, S., Pérez-Simón, J. A., Díez-Campelo, M., Sánchez-Abarca, L. I., Blanco, B., López, A., Benito, A., Ocio, E., Sánchez-Guijo, F. M., & Cañizo, C. (2008). The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *haematologica*, 93(9), 1301-1309.
- Tabor, M. P., Brakenhoff, R. H., Ruijter-Schippers, H. J., Kummer, J. A., Leemans, C. R., & Braakhuis, B. J. M. (2004). Genetically Altered Fields as Origin of Locally Recurrent Head and Neck Cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(11), 3607. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0632>
- TAMURA, F., MASUHARA, A., SAKAIDA, I., FUKUMOTO, E., NAKAMURA, T., & OKITA, K. (1998). FK506 promotes liver regeneration by suppressing natural killer cell activity. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 13(7), 703-708.
- Tanaka, A., & Sakaguchi, S. (2017). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell research*, 27(1), 109-118.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *cell*, 139(5), 871-890.
- Thomas, M., Pim, D., & Banks, L. (1999, 12/21/online). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV [Original Paper]. *Oncogene*, 18, 7690. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202953>
- Thornton, A. M., & Shevach, E. M. (2016). Tregs, Helios and tumor immunity: the sun has not yet risen. *Translational cancer research*, 5(Suppl 4), S672-S674. <https://doi.org/10.21037/tcr.2016.10.47>
- Trivanović, D., Nikolić, S., Krstić, J., Jauković, A., Mojsilović, S., Ilić, V., Okić-Djordjević, I., Santibanez, J. F., Jovčić, G., & Bugarski, D. (2014). Characteristics of human adipose mesenchymal stem cells isolated from healthy and cancer affected people and their interactions with human breast cancer cell line M CF-7 in vitro. *Cell biology international*, 38(2), 254-265.
- Uppaluri, R., Dunn, G. P., & Lewis, J. S., Jr. (2008, Dec 4). Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immun*, 8, 16.
- van Houten, V. M., Tabor, M. P., van den Brekel, M. W., Alain Kummer, J., Denkers, F., Dijkstra, J., Leemans, R., van der Waal, I., Snow, G. B., & Brakenhoff, R. H. (2002). Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 198(4), 476-486.

- Vargas, F. A., Furness, A. J., Solomon, I., Joshi, K., Mekkaoui, L., Lesko, M. H., Rota, E. M., Dahan, R., Georgiou, A., & Sledzinska, A. (2017). Fc-optimized anti-CD25 depletes tumor-infiltrating regulatory T cells and synergizes with PD-1 blockade to eradicate established tumors. *Immunity*, 46(4), 577-586.
- Vega, V. L., Rodríguez-Silva, M., Frey, T., Gehrman, M., Diaz, J. C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., & De Maio, A. (2008). Hsp70 Translocates into the Plasma Membrane after Stress and Is Released into the Extracellular Environment in a Membrane-Associated Form that Activates Macrophages. *The Journal of Immunology*, 180(6), 4299. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4299>
- Vermorcken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H.-R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N., & Hitt, R. (2008). Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(11), 1116-1127. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802656>
- Vermorcken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H.-R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N., & Hitt, R. (2008). Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(11), 1116-1127. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802656>
- Vigneron, N. (2015). Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *BioMed research international*, 2015, 948501-948501. <https://doi.org/10.1155/2015/948501>
- Vinci, M., Box, C., Zimmermann, M., & Eccles, S. A. (2013). Tumor spheroid-based migration assays for evaluation of therapeutic agents. In *Target Identification and Validation in Drug Discovery* (pp. 253-266). Springer.
- von Knebel Doeberitz, M., Rittmüller, C., Aengeneyndt, F., Jansen-Dürr, P., & Spitkovsky, D. (1994). Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRB interactions. *Journal of virology*, 68(5), 2811-2821.
- Wang, Q., Li, X., Luo, J., Zhang, L., Ma, L., Lv, Z., & Xue, L. (2012, 2012/12/13). The allogeneic umbilical cord mesenchymal stem cells regulate the function of T helper 17 cells from patients with rheumatoid arthritis in an in vitro co-culture system. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 13(1), 249. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-13-249>
- Wendt, M. K., Allington, T. M., & Schiemann, W. P. (2009). Mechanisms of the epithelial–mesenchymal transition by TGF- $\beta$ . *Future Oncology*, 5(8), 1145-1168.

- Whiteside, T. L. (2008a, 10/06/online). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth [Review]. *Oncogene*, 27, 5904. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.271>
- Whiteside, T. L. (2008b, 2008/10/01). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27(45), 5904-5912. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.271>
- Whiteside, T. L. (2014, 2014/10/01). Induced regulatory T cells in inhibitory microenvironments created by cancer. *Expert opinion on biological therapy*, 14(10), 1411-1425. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.927432>
- William, L. H., David, M. T., Jacob, A. G., Hubert, T., Killian, T. C., & Glauco, R. S. (2013). Three- dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nature Protocols*, 8(10), 1940. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.125>
- Wittekind, C. (2016). *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. John Wiley & Sons.
- Wong, D. Y.-K., Chang, K.-W., Chen, C.-F., & Chang, R. C.-S. (1990). Characterization of two new cell lines derived from oral cavity human squamous cell carcinomas—OC1 and OC2. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 48(4), 385-390.
- Wong, S.-P., Rowley, J. E., Redpath, A. N., Tilman, J. D., Fellous, T. G., & Johnson, J. R. (2015). Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacology & Therapeutics*, 151, 107-120.
- Xia, Z.-J., Chang, J.-H., Zhang, L., Jiang, W.-Q., Guan, Z.-Z., Liu, J.-W., Zhang, Y., Hu, X.-H., Wu, G.-H., & Wang, H.-Q. (2004). Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus. *Ai zheng= Aizheng= Chinese journal of cancer*, 23(12), 1666-1670.
- Yadav, A., Kumar, B., Datta, J., Teknos, T. N., & Kumar, P. (2011). IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial–mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Molecular Cancer Research*, 9(12), 1658-1667.
- Yamaguchi, H., Wyckoff, J., & Condeelis, J. (2005). Cell migration in tumors. *Current opinion in cell biology*, 17(5), 559-564.
- Ye, Z.-J., Zhou, Q., Zhang, J.-C., Li, X., Wu, C., Qin, S.-M., Xin, J.-B., & Shi, H.-Z. (2011). CD39+ regulatory T cells suppress generation and differentiation of Th17 cells in human malignant pleural effusion via a LAP-dependent mechanism. *Respiratory research*, 12(1), 77.
- Yeap, W. H., Wong, K. L., Shimasaki, N., Teo, E. C. Y., Quek, J. K. S., Yong, H. X., Diong, C. P., Bertolletti, A., Linn, Y. C., & Wong, S. C. (2016). CD16 is

- indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci Rep*, 6, 34310-34310. <https://doi.org/10.1038/srep34310>
- Yoo, K. H., Jang, I. K., Lee, M. W., Kim, H. E., Yang, M. S., Eom, Y., Lee, J. E., Kim, Y. J., Yang, S. K., & Jung, H. L. (2009). Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cellular immunology*, 259(2), 150-156.
- Yu, J. M., Jun, E. S., Bae, Y. C., & Jung, J. S. (2008). Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev*, 17(3), 463-474.
- Zhang, Y., Li, C., Jiang, X., Zhang, S., Wu, Y., Liu, B., Tang, P., & Mao, N. (2004). Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Experimental hematology*, 32(7), 657-664.
- Zhao, M., Sachs, P. C., Wang, X., Dumur, C. I., Idowu, M. O., Robila, V., Francis, M. P., Ware, J., Beckman, M., & Rizki, A. (2012). Mesenchymal stem cells in mammary adipose tissue stimulate progression of breast cancer resembling the basal-type. *Cancer biology & therapy*, 13(9), 782-792.
- Zhou, L., Jiang, Y., Liu, X., Li, L., Yang, X., Dong, C., Liu, X., Lin, Y., Li, Y., & Yu, J. (2019). Promotion of tumor-associated macrophages infiltration by elevated neddylation pathway via NF- $\kappa$ B-CCL2 signaling in lung cancer. *Oncogene*, 38(29), 5792-5804.
- Zimmerlin, L., Donnenberg, A. D., Rubin, J. P., Landreneau, R. J., Basse, P., & Donnenberg, V. S. (2010). Regenerative therapy and cancer: In vitro and in vivo studies of the interaction between adipose- derived stem cells and breast cancer cells from clinical isolates. *Tissue Engineering Part A*, 100730082448028. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0248>
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., & Hedrick, M. H. (2001, Apr). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2), 211-228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>
- Zumbach, K., Hoffmann, M., Kahn, T., Bosch, F., Gottschlich, S., Görögh, T., Rudert, H., & Pawlita, M. (2000). Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*, 85(6), 815-818.
- Zuur, C. L., Elbers, J. B. W., Leun, A. v. d., Brekel, M. v. d., Tan, B., Jasperse, B., Vogel, W., Smit, L., Willems, S. M., Al-Mamgani, A., Nijkamp, J., Schumacher, T., Blank, C. U., Boer, J. P. D., & Haanen, J. B. A. G. (2018). Immunomodulation by the combination of ipilimumab and nivolumab neoadjuvant to (salvage) surgery in advanced or recurrent head and neck carcinoma, IMCISION, an investigator-initiated phase-Ib/II trial (N16IMC, NCT03003637). *Journal of Clinical Oncology*, 36(15\_suppl), e18020-e18020. [https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15\\_suppl.e18020](https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e18020)



## 9 Appendix

### 9.1 Weitere Experimente

#### 8.1.1 Methodik: Etablierung von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzell-Primärkulturen

Die Tumorbiopsien wurden unter sterilen Bedingungen mithilfe von Pinzette, Schere und Skalpell zerkleinert bis die einzelnen Stücke ca. 1-2 mm groß waren. Dann wurden die Tumorstückchen eines Tumors auf die Vertiefungen einer 6-Well Platte gegeben, deren Boden davor mit einem Skalpell leicht gitterförmig eingeritzt wurde, sodass die Tumorstückchen besser hafteten. Die 6-Well Platte wurde nun ohne Medium für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert, damit das Gewebe am Boden der Schale anhaftete. Dann wurde RPMI mit 10% FBS, 1% Penicillin / Streptomycin, 1% L-Glutamin und 1% Non-Essential-Aminoacids hinzugegeben und wieder im Brutschrank inkubiert. Das Wachstum wurde zunächst täglich unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt.

Um den Anteil an Tumorzellen zu erhöhen und den Anteil an Fibroblasten zu verringern wurden verschiedene Methoden angewandt. Zunächst wurde versucht den Anteil an Tumorzellen durch fortlaufendes Passagieren zu erhöhen. Dabei sollten sich die immortalisierten Tumorzellen gegenüber den Fibroblasten durchsetzen. Dazu wurden die Primärkulturen über einen Zeitraum von vier Monaten zwei- bis viermal pro Woche subkultiviert. Da Krebszellen und insbesondere Cancer stem-like Zellen in Kultur weniger adhärent sind als Fibroblasten (Morata-Tarifa et al., 2016) wurde bei der Subkultivierung einiger Zelllinien, nicht wie üblich, fünf Minuten mit TrypLE™ inkubiert, sondern nur zwei Minuten. Es wurden die Zellen subkultiviert, die sich bereits nach dieser Zeit ablösten. Außerdem wurde jede Primärkultur einmal mit RPMI und einmal mit DMEM kultiviert. Es wurden jeweils die Kulturschalen subkultiviert, in welchen die meisten Zellen bei Beurteilung mit dem Phasenkontrastmikroskop ein pflastersteinartiges und damit plattenepithelkarzinomtypisches Wachstumsmuster zeigten. Des Weiteren wurden die Zellen beim Subkultivieren stark vereinzelt, um beurteilen zu können, ob sich einzelne Kolonien mit tumortypischem Wachstumsmuster hervortun.

### 9.1.2 Ergebnis: Etablierung von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzell-Primärkulturen

Ziel war es aus Operationsresektaten Tumorzellen zu isolieren und von diesen immortalisierte Zellkulturen anzulegen. Von den Patienten wurde neben dem Tumor auch peritumorales Fettgewebe entnommen, um mesenchymale Fettgewebstammzellen zu isolieren. So sollte ein autologes Modell von Tumorzellen und mesenchymalen Fettgewebstammzellen etabliert werden. Dazu wurden nach oben genannter Methode Primärkulturen angelegt.

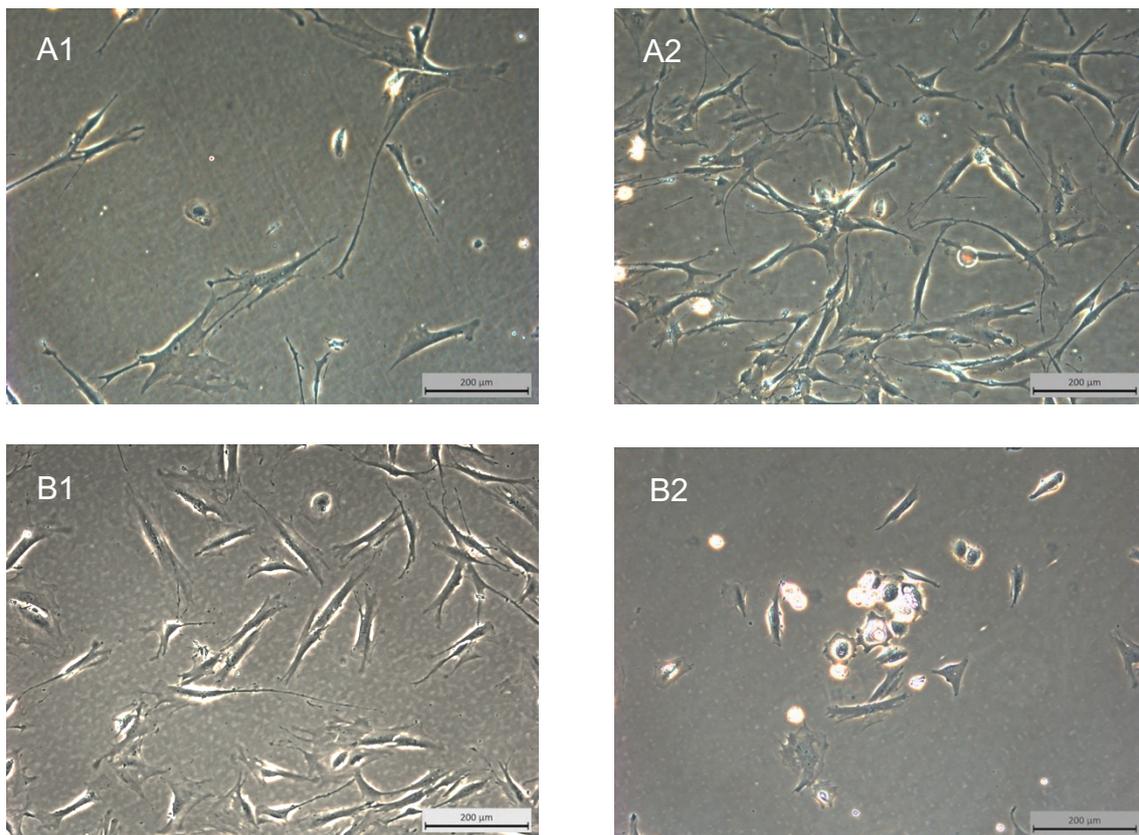


Abbildung 84: Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzell-Primärkulturen

A1: MTU-SCC-3 Passage 6

A2: MTU-SCC-7 Passage 6

B1: MTU-SCC-3 Passage 10

B2: MTU-SCC-10 Passage 10

Es zeigten sich früh adhärent wachsende Zellen. Die meisten Zellen ähnelten in ihrem Wachstumsmuster Fibroblasten. Es zeigten sich jedoch, wie in den oben

aufgeführten Bildern, einige Zellen, welche ein für Plattenepithelkarzinomzellen typisches, pflastersteinartiges Wachstum aufwiesen.

Unter der Annahme, dass die Karzinomzellen immortalisiert sind und die Fibroblasten nicht, wurden die Zellen über vier Monate mehrfach wöchentlich subkultiviert. Es wurden Kulturen in DMEM und in RPMI angelegt. Des Weiteren wurde selektive Trypsinierung angewandt, um die weniger adhärennten Tumorzellen von den Fibroblasten zu isolieren (Carey et al., 1994; Wong et al., 1990).

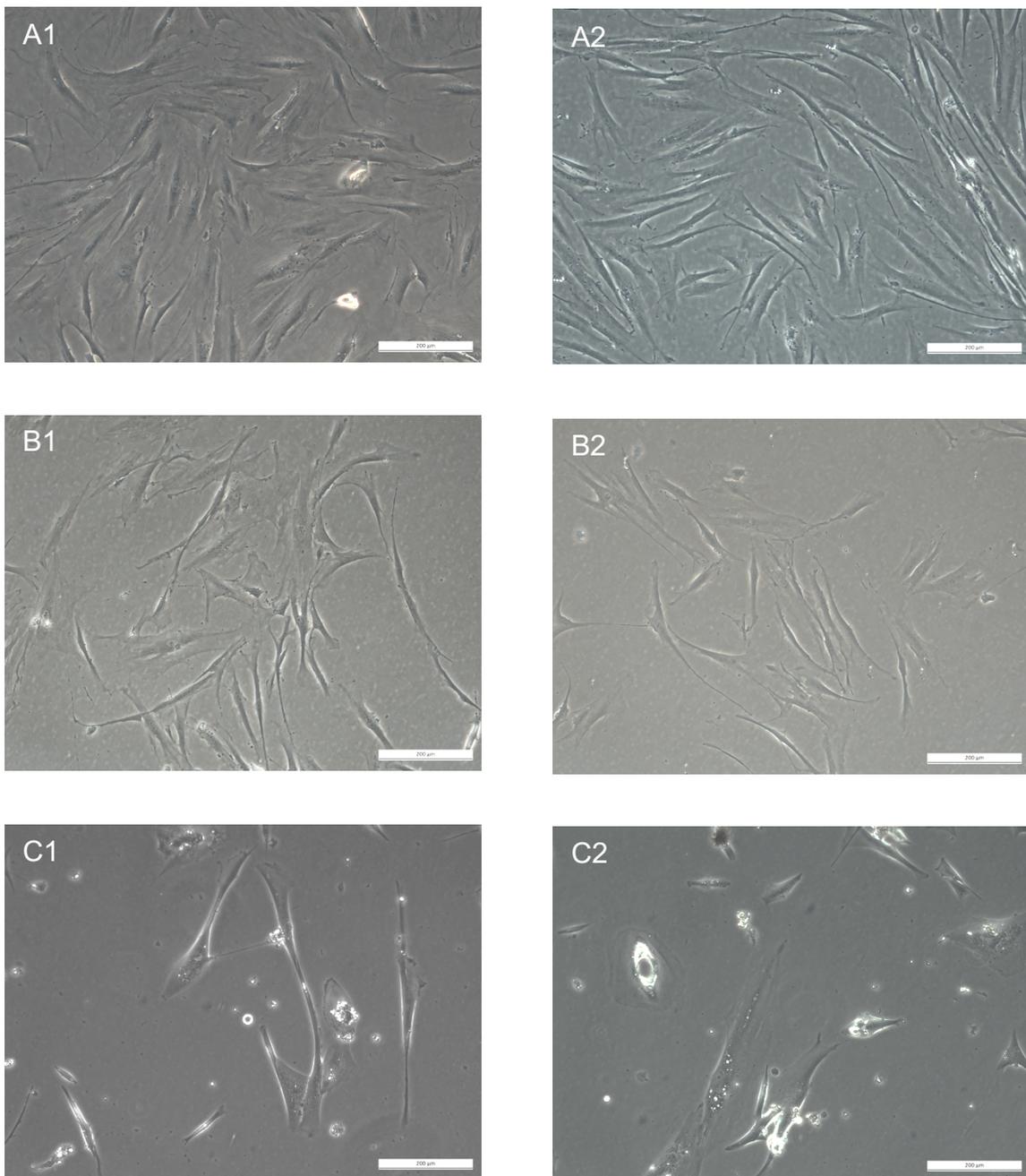


Abbildung 85: Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzell-Primärkulturen in hohen Passagen

A1: MTU-SCC-3 DMEM, selektive Subkultivierung, Passage 32

A2: MTU-SCC-3 RPMI, Passage 28

B1: MTU-SCC-3 DMEM, Passage 31; B2: MTU-SCC-3 DMEM, Passage 31

C1: MTU-SCC-8 RPMI selektive Subkultivierung, Passage 33

C2: MTU-SCC-8 RPMI, Passage 31

Das Wachstum der Zellen verlangsamte sich im Laufe der Zeit und mit zunehmender Passagezahl. Ab Passage 25-28 erfolgte lediglich eine Subkultivierung pro Woche. Eine Selektion von pflastersteinartigen Zellen war nicht möglich. Die Zellkörper der kultivierten Zellen wurden zunehmend größer und da sich vermehrt devitale und prä-apoptotische Zellen zeigten, wurde das Projekt der Etablierung von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen nach 19 Wochen und je nach Zelllinie ca. 30 Passagen erfolglos eingestellt.

Da die Etablierung von Tumorzellprimärkulturen nicht möglich war, konnte keine autologe Co-Kultur von ASCs und Tumorzellen erfolgen. Daher entschieden wir uns für eine allogene Co-Kultur mit bereits etablierten Tumorzelllinien.

## 9.2 Veröffentlichung

Teile dieser Dissertation wurden bereits als Poster mit dem Titel "Immunomodulatory Effects of Adipose-Derived Stem Cells on HPV Positive and Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma" auf dem Immuno-Oncology 2018 World Congress in Wien veröffentlicht.