

Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

**Untersuchung der Wechselwirkung zwischen
mesenchymalen Stammzellen und
plattenepithelialen Tumorzellen
des Kopf-Hals-Bereiches**

Antonia Helga Ilse Dierks

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Prüfer*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Anja Pickhard
2. apl. Prof. Dr. Robert Oostendorp

Die Dissertation wurde am 17.11.2021 bei der
Technischen Universität München eingereicht und durch die
Fakultät für Medizin am 12.07.2022 angenommen.

| | |
|--|-----------|
| 1. Abkürzungsverzeichnis | 4 |
| 2. Einleitung | 8 |
| 2.1 Problemstellung | 8 |
| 2.2 Grundlagen des Plattenepithelkarzinoms | 9 |
| 2.2.1 Epidemiologie | 10 |
| 2.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren | 11 |
| 2.2.3 Klassifikation | 12 |
| 2.2.4 Molekularpathologie | 17 |
| 2.2.5 Standardtherapie | 18 |
| 2.2.6 Neue zielorientierte Therapiemethoden | 19 |
| 2.2.7 Prognose | 20 |
| 2.3 Tumormikromilieu | 21 |
| 2.4 Grundlagen der mesenchymalen Stammzellen | 23 |
| 2.5 Grundlagen der adipogenen Stammzellen | 25 |
| 2.5.1 Therapeutischer Gebrauch | 26 |
| 2.5.2 Assoziation zu malignen Tumoren | 28 |
| 2.6 Zielsetzung | 29 |
| 3. Material und Methoden | 30 |
| 3.1 Material | 30 |
| 3.1.1 Zelllinien | 30 |
| 3.1.2 Medien und Supplemente für die Zellkultur | 31 |
| 3.1.3 Reagenzien und Chemikalien | 32 |
| 3.1.4 Geräte | 34 |
| 3.1.5 Verbrauchsmaterialien | 36 |
| 3.1.6 Computerprogramme | 37 |
| 3.2 Methoden | 38 |
| 3.2.1 Zellkultur | 38 |
| 3.2.2 Bestrahlung | 40 |
| 3.2.3 ASC-Isolation | 40 |
| 3.2.4 ASC-Differenzierung | 41 |
| 3.2.5 Durchflusszytometrie (FACS) | 45 |
| 3.2.6 Invasionstestung | 46 |
| 3.2.7 RNA-Isolation | 49 |
| 3.2.8 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren | 50 |
| 3.2.9 cDNA-Synthese | 51 |
| 3.2.10 Quantitative Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) | 52 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.11 Crystal-Violett-Proliferations-Assay | 53 |
| 3.2.12. Statistik | 55 |
| 4. Ergebnisse | 56 |
| 4.1. ASC-Charakterisierung | 56 |
| 4.1.1 ASC-Differenzierung | 56 |
| 4.1.2 Durchflusszytometrie (FACS) | 61 |
| 4.2 Invasionsverhalten der ASCs | 63 |
| 4.3 Interleukin-Genexpression der ASCs und HNSCCs | 73 |
| 4.4 Einfluss von IL-6 auf die Genexpression und Proliferation der HNSCCs | 77 |
| 5. Diskussion | 80 |
| 5.1 Diskussion der Materialien und Methoden | 80 |
| 5.2 Einfluss von Bestrahlung | 81 |
| 5.3 Invasionverhalten der ASCs | 83 |
| 5.4 Einfluss von IL-6 auf HNSCCs | 84 |
| 5.5 Einfluss von IL-20RB in HNSCCs | 85 |
| 5.6 Einfluss von IL-24 in HNSCCs | 86 |
| 5.7 Wechselseitiger Einfluss der ASCs und HNSCCs | 87 |
| 5.8 Ausblick | 88 |
| 6. Zusammenfassung | 90 |
| 7. Literaturverzeichnis | 91 |
| 8. Tabellenverzeichnis | 101 |
| 9. Abbildungsverzeichnis | 103 |
| 10. Danksagung | 105 |

1. Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Erklärung |
|-----------------|---------------------------------------|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celcius |
| <, > | Kleiner, größer |
| ≤, ≥ | Kleiner gleich, größer gleich |
| 5-FU | 5-Fluorouracil |
| A. | Arteria |
| Aqua dest. | Destilliertes Wasser |
| ASC | Adipogene Stammzellen |
| Bzw. | Beziehungsweise |
| CA | California |
| CAF | Tumor-assoziierte Fibroblasten |
| CD | Cluster of differentiation |
| CDK | Cyclin-Dependent Kinase |
| cDNA | Copy Desoxyribonucleinsäure |
| Cis | Carcinoma in situ |
| cm | Zentimeter |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CUP | Cancer of Unknown Primary |
| DMEM | Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| dNTP | Desocytiribonukleosidtriphosphat |
| DPBS | Dulbecco's phosphate-bufferes saline |
| DPEC | Diethylpyrocarbonat |
| Dr. | Doktor |
| E5, E6, E7 | Early region 5, 6, 7 |
| ebd. | Ebenda |
| ECM | Extrazellulärmatrix |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |

| | |
|---------------|--|
| ERK | Extrazellulär Signal Regulierte Kinase |
| Et al. | Et alii |
| FACS | Fluorescence activated cell sorting |
| FBS | Fetal bovine serum |
| FCS | Fetal calf serum |
| FGF-2 | Basic Fibroblast Growth Factor |
| G | Grading |
| Ggf. | Gegebenenfalls |
| GM-CSF | Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor |
| GmbH | Gesellschaft mit beschränkter Haftung |
| Gy | Gray |
| h | Stunde |
| HGF | Hepatocyte Growth Factor |
| HLA | Human Leukocyte Antigen |
| HNO | Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde |
| HNSCC | Head and Neck Squamous Cell Carcinoma |
| HPV | Humanes Papilloma Virus |
| IBMX | 1-Methyl-3-Isobutylxanthine |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| IL | Interleukin |
| ISCT | International Society of Cellular Therapy |
| JAK-STAT | Januskinase Signal Transducers and Activators of Transcription |
| M. | Musculus |
| MA | Massachusetts |
| MDA-7 | Melanom Differentiation Assoziiertes Gen-7 |
| mg | Milligramm |
| min. | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| MO | Missouri |
| MSC | Multipotente Mesenchymale Stromale Zellen |

| | |
|---------------|---|
| ns | Nicht signifikant |
| OD | Optische Dichte |
| OPSCC | Oropharyngeales Plattenepithelkarzinom |
| p16, p21, p27 | Protein 16, 21, 27 |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzsäure |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PD | Privat Dozent |
| PD-1 | Programmed death 1 |
| PI3-Kinase | Phosphatidylinositol-3 Kinase |
| PI3K-AKT-mTOR | Phosphatidylinositol-3-kinase-AKT mammalian target of rapamycin |
| PIK3CA-Gen | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha gene |
| R | Residualtumor |
| Rb | Retinoblastom |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| Rpm | Revolutions per minute |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute Medium |
| SDS | Sodium-Dolocyl-Sulfat |
| sek. | Sekunden |
| STAT3 | Signalwandler und Aktivator der Transkription 3 |
| SVF | Stromal Vascular Fraction |
| TAFs | Tumor-Associated Myofibroblasts |
| TGF- β | Transforming Growth Factor β |
| TME | Tumor Mikroenvironment |
| TNF- α | Tumor-Nekrosefaktor- α |
| TNM | Tumor-Klassifikation von Tumorgroße (T), Lymphknotenbefall (L) und Metastasen (M) |
| TP53 | Tumor protein 53 |
| UICC | International Union against Cancer |
| V. | Vena |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |

| | |
|---------------|--|
| WA | Washington |
| XF | Xeno-Free Mesenchymal Stem Cell Medium |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |

2. Einleitung

2.1 Problemstellung

Die bestehenden Forschungsergebnisse und Literatureinträge bezüglich des Einflusses von Mesenchymalen Stammzellen (MSC) bzw. Adipogenen Stammzellen (ASC) auf die Entwicklung maligner Tumore, im Sinne von Tumorinitiation, Tumorwachstum und Metastasierung sind bis dato kontrovers und widersprüchlich. Vielfach und in Bezug auf unterschiedliche Tumorentitäten, beispielweise Brustkrebs, Ovarialtumore und Kopf-Hals-Tumore wurde bereits bewiesen, dass ASCs Tumorwachstum und Metastasierung fördern (Dirat et al., 2011; Goldstone & Austen, 2015; Nowicka et al., 2013; Rowan et al., 2014). ASCs unterstützen Tumorescape, Progress, Wachstum, Migration sowie Angiogenese durch immunologische Mechanismen und Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren (Goldstone & Austen, 2015; Liotta et al., 2014). Andere Ergebnisse hingegen deuten darauf hin, dass ASCs das Tumorwachstum inhibieren und so einen potentiellen therapeutischen Nutzen besitzen (Danan et al., 2018; Klopp et al., 2010; Lee et al., 2015). Desweiteren zeigen ASCs auch einen positiven Effekt in Bezug auf entzündliche und autoimmune Erkrankungen, ischämische Zustände und Wundheilung (Danan et al., 2018; Schweizer et al., 2015).

ASCs besitzen die Fähigkeit zu Tumoren zu migrieren und dann vor Ort durch autokrine und parakrine Mechanismen Einfluss auf die Tumorentwicklung und das Tumorwachstum zu nehmen (Nowicka et al., 2013; Zimmerlin et al., 2011), indem funktionelle und morphologische Veränderungen der Tumorzellen initiiert werden (Anjanappa et al., 2016; Schweizer et al., 2015). Wahrscheinlich wird durch die Zellen des Tumormikromilieus, zu welchem unter anderem auch ASCs gehören, das Tumorwachstum aufrechterhalten (Balkwill et al., 2012). Außerdem wurde bereits mehrfach der fördernde Einfluss der ASCs auf das Migrations- und Invasionsverhalten von Tumorzellen untersucht (Goldstone & Austen, 2015).

In Tumoren, wie Prostata-Karzinomen und Kopf-Hals-Tumoren, werden Zellen, die als MSCs identifiziert werden konnten, gefunden, welche zu einer Inhibition der Produktion von Immunzellen führen und außerdem epitheliale Zellproliferation verhindern (Liotta et al., 2014; Santamaria-Martínez et al., 2009). Die Tumorgroße scheint zudem mit der Anzahl der im Tumor befindlichen MSCs zu korrelieren (Liotta et al., 2014). Bestrahlung kann Tumorzellen dahingehend beeinflussen, dass diese

zur Invasion von MSCs in den Tumor führen, welche dann vor Ort das Tumorwachstum hemmen und somit einen antitumorösen Einfluss haben (Klopp et al., 2010).

Außerdem wurden Adipozyten in Mamma-Karzinomen entdeckt, deren Phänotyp eventuell durch Tumorzellen dahingehend beeinflusst wurde, dass diese Adipozyten zu einem aggressiveren Tumorwachstum führen (Dirat et al., 2011).

Es zeigt sich, dass bis dato nicht bekannt ist, was die eigentliche Funktion der MSCs bzw. ASCs in Tumoren ist und welchen Einfluss sie auf die Entwicklung von Tumoren haben. Außerdem ist die tatsächliche Herkunft der im Tumor befindlichen MSCs noch gänzlich unerklärt; stammen sie aus dem Knochenmark und wandern über die Blutbahn in den Tumor ein oder migrieren sie aus dem lokalen, den Tumor umgebenden, Fettgewebe bzw. dem Tumormikromilieu in den Tumor. Auch die wechselseitige Beeinflussung zwischen Tumorzellen und MSCs ist nicht geklärt und verstanden.

Die folgende Arbeit untersucht die Wechselwirkung zwischen ASCs und Tumorzellen des Kopf-Hals-Bereichs und legt ein besonderes Augenmerk auf das Invasionsverhalten der ASCs.

2.2 Grundlagen des Plattenepithelkarzinoms

Kopf-Hals-Tumore umfassen Tumore der Mundhöhle, des Nasopharynx, des Oropharynx, des Hypopharynx, des Larynx, der paranasalen Sinus und der Speicheldrüsen. Die Malignome des Kopf-Hals-Bereichs gehen von epitheliale, mesenchymalem oder lymphatischem Gewebe aus und werden anhand dessen in ihre verschiedenen Entitäten eingeteilt.

90 % der Kopf-Hals-Tumore sind Plattenepithelkarzinome und werden im angloamerikanischen Bereich auch als Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) bezeichnet (Bose et al., 2013). Die WHO definiert diese als maligne epitheliale Tumore mit plattenepithelialer Differenzierung, charakterisiert durch Hornbildung und Vorhandensein von Interzellularbrücken (Mast et al., 2005). Sie gehen, wie dem Namen zu entnehmen ist, vom epithelialen Gewebe des oberen Aerodigestivtrakts aus und können somit alle Bereiche die von Epithel ausgekleidet sind betreffen. Dazu gehören Lippen, Mundhöhle, Oro-, Naso- und Hypopharynx, Larynx, Nase, Nasennebenhöhlen und Speicheldrüse (Argiris et al., 2008).

Diese Tumore ähneln sich verständlicher Weise in Epidemiologie, Ätiologie, Therapie und Prognose.

2.2.1 Epidemiologie

HNSCCs sind die weltweit sechst häufigsten Tumorerkrankungen (Bose et al., 2013) und damit für 6 % aller Krebserkrankungen verantwortlich (Argiris et al., 2008). Pro Jahr werden 630.000 neue Patienten mit einem HNSCC diagnostiziert und 350.000 Patienten versterben jährlich daran (Vigneswaran & Williams, 2014). In Deutschland erkrankten im Jahr 2013 13.000 Männer und 4.500 Frauen an bösartigen Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs, wobei bei 5.500 Männern und 1.700 Frauen die Erkrankung die Todesursache darstellte (Robert Koch-Institut, 2016).

Es gibt große geographische und geschlechtsspezifische Unterschiede in der Inzidenz und der anatomischen Lokalisation der HNSCCs (Vigneswaran & Williams, 2014). Diese Abweichungen sind vor allem durch die demographischen Ungleichheiten in Bezug auf den Konsum von Alkohol und Tabak, den beiden Hauptrisikofaktoren, zurückzuführen (ebd.).

Auch innerhalb Deutschlands sind geographische Unterschiede der Erkrankungswahrscheinlichkeit deutlich sichtbar. Bei Frauen ist die Sterblichkeit in Mecklenburg-Vorpommern, Berlin, Hamburg und Bremen am höchsten, dahingegen ist bei den Männern ein Ost-West-Gefälle mit einer 45 % höheren Sterblichkeit in den neuen Bundesländern zu erkennen (Robert Koch-Institut, 2016).

Die meisten Patienten des tabakassoziierten HNSCCs sind bei Diagnosestellung etwa 60 Jahre alt (Argiris et al., 2008). Es gibt jedoch noch eine jüngere Patientenkohorte, die an HPV (Humanes Papilloma Virus)-assoziierten HNSCC Formen erkrankt (Vigneswaran & Williams, 2014). Neben der Noxen assoziierten Onkogenese ist die virale Onkogenese die zweite große und wachsende Gruppe von HNSCCs (Michmerhuizen et al., 2016). Das mittlere Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei den Frauen bei 66,2 Jahren und bei den Männern, etwas jünger, bei 63,8 Jahren (Robert Koch-Institut, 2016). Das HNSCC kommt auf alle malignen Tumorerkrankungen gesehen häufiger bei Männern mit 5 % der Tumore im Kopf-Hals-Bereich, gegenüber 2,3 % bei Frauen vor (Mast et al., 2005). In den Ländern mit der höchsten Inzidenz, wie z.B. Indien, Sri Lanka, Bangladesh und Pakistan, stellen HNSCCs die häufigste Tumorerkrankung bei Männern und die

dritthäufigste bei Frauen dar (Vigneswaran & Williams, 2014). Das höhere Auftreten bei Männern, lässt sich, genau wie auch die geographischen Unterschiede, mit dem wahrscheinlich auch heute noch höheren Konsum von Tabak und Alkohol unter Männern erklären. Die Inzidenz und Sterblichkeit der Kopf-Hals-Tumore in Deutschland ist bei den Männern seit 1980 relativ stabil, wohingegen bei den Frauen ein Anstieg zu verzeichnen ist (Robert Koch-Institut, 2016).

In den vergangenen Jahren konnte eine generelle Zunahme der Inzidenz des HNSCCs beobachtet werden (Argiris et al., 2008). Hingegen wird in den über Gesundheitsrisiken des Rauchens aufgeklärten Ländern, hinsichtlich eines Wandels des Lebensstils mit zunehmender Reduzierung des Rauchen aufgrund von Anti-Raucher-Kampagnen, ein vermindertes Auftreten des HNSCCs in der Mundhöhle und des Larynx bekundet (Vigneswaran & Williams, 2014). Im Gegensatz dazu nimmt die Inzidenz der oropharyngealen HNSCCs, welche mit den high-risk HPV-Typen assoziiert sind, zu (ebd.).

Zwei Drittel der Patienten haben bei Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium mit Metastasen in den regionalen Lymphknoten erreicht (Argiris et al., 2008). Fernmetastasen hingegen sind bei Erstdiagnose, mit etwa 10 % der Patienten, deutlich seltener vorhanden (ebd.).

2.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die bedeutensten Risikofaktoren für das Auftreten des HNSCCs stellen der Konsum von Tabak und Alkohol dar. In 75 % der Diagnosestellungen wird ein Zusammenhang zu diesen gesehen (Argiris et al., 2008). Tabak-Konsum ist ein kausaler Faktor und bis zu 80 % der HNSCCs sind auf den Kontakt zu Tabak zurückzuführen (Bose et al., 2013). Ein hoher Alkohol-Konsum wird auch als unabhängiger Risikofaktor für die erhöhte Auftretenswahrscheinlichkeit eines HNSCCs ausgemacht (ebd.). Desweiteren wird ein synergistischer bzw. sogar multiplikativer Effekt von Tabak und Alkohol in Kombination beobachtet (Argiris et al., 2008). Der Konsum von Alkohol und Tabak führt im Gegensatz zu Abstinenzlern zu einem neunmal höheren Risiko an einem Malignom zu erkranken (Beck-Mannagetta et al., 2011).

Das in den asiatischen Ländern weit verbreitete Kauen von Betelnüssen ist für die vor allem in der Mundhöhle entstehenden HNSCCs ein zusätzlicher Risikofaktor

(Argiris et al., 2008), da die in den Kaupäckchen enthalten Areca Nüsse und der Tabak als karzinogen eingestuft werden (Vigneswaran & Williams, 2014).

Zudem wurde HPV als relativ neuer Risikofaktor für das HNSCC, vorwiegend den Oropharynx betreffend, identifiziert (Michmerhuizen et al., 2016). Im Jahr 1980 waren nur 16 % der oropharyngealen HNSCCs in den USA HPV-positiv, wohingegen es 2014 bereits über 75 % waren (Vigneswaran & Williams, 2014). In 25 % der HNSCCs konnte HPV-DNA isoliert werden und damit eine Korrelation identifiziert werden (Argiris et al., 2008). HPV-Assoziation ist insbesondere bei Patienten zwischen 40 und 55 Jahren zu beobachten und möglicherweise mit einem Wandel des Sexualverhaltens in Verbindung zu bringen (Bose et al., 2013). HPV-assoziierte HNSCCs werden aufgrund ihrer individuellen Ätiologie, Pathogenese, Klinik und ihres therapeutischen Ansprechens als eigene Entität benannt (Vigneswaran & Williams, 2014) und sind prognostisch anders zu bewerten (Husain & Neyaz, 2017). Der High-risk HPV-Typ HPV16 wird für über 90 % der HPV-positiven HNSCCs verantwortlich gemacht (Michmerhuizen et al., 2016).

2.2.3 Klassifikation

Die Klassifikation des Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereichs erfolgt, wie auch die der meisten anderen Tumore, nach der aktuellen TNM-Klassifikation entsprechend der neuesten Version der International Union against Cancer (UICC).

Die Einteilung nach TNM wird anhand von drei Hauptkriterien eingeteilt:

T – Tumorausdehnung,

N – Nodus bzw. Lymphknotenmetastasen und

M – Fernmetastasen.

Zudem werden in der Regel zusätzliche Vorsilben bezüglich des Tumorstadiums gebraucht:

c – klinisches bzw. bioptisches Stadium,

p – histopathologisches Stadium,

y – Stadium nach neoadjuvanter Therapie.

Die folgenden Tabellen stellen die 8. Version der TNM-Klassifikationen und damit die Klassifikation des Primärtumors, der regionalen Lymphknoten und der Fernmetastasierung dar (Brierley, Gospodarowicz, & Wittekind, 2016; Mast et al., 2005). In der neuesten TNM-Klassifikation von Dezember 2016 werden zusätzlich

p16-positive Oropharynxkarzinome (OPSCC) und p16-positive Cancer of Unknown Primary (CUP) einbezogen.

| Tumor – pT-Klassifikation | |
|---------------------------|--|
| pTX | Primärtumor kann histologisch nicht beurteilt werden |
| pT0 | Kein histologischer Anhalt für einen Primärtumor |
| pTis | Carcinoma in situ |
| pT1-4 | Zunehmende Größe und/oder lokale Ausdehnung des Primärtumors |

Tabelle 1: pT-Klassifikation

In der neuesten TNM-Klassifikation gilt die oben aufgeführte pT-Klassifikation ebenso für p16-positive OPSCC.

| Regionäre Lymphknoten – pN-Klassifikation | |
|---|---|
| pNX | Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden |
| pN0 | Keine regionären Lymphknotenmetastasen |
| pN1 | Metastasen in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, ≤ 3 cm |
| pN2a | Metastasen in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, > 3 cm, < 6 cm |
| pN2b | Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, ≤ 6 cm |
| pN2c | Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, ≤ 6 cm |
| pN3 | Metastase(n) in Lymphknoten $>$ als 6 cm |

Tabelle 2: pN-Klassifikation

| Regionäre Lymphknoten – pN-Klassifikation von p16-positiven OPSCC | |
|---|--|
| pNX | Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden |
| pN0 | Keine regionären Lymphknotenmetastasen |
| pN1 | Metastasen in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, < 3 cm |
| pN2 | Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, < 6 cm |
| pN3 | Metastase(n) in Lymphknoten > 6 cm |

Tabelle 3: pN-Klassifikation von p16-positiven OPSCC

| Fernmetastasen – pM-Klassifikation | |
|------------------------------------|--|
| pMX | Fernmetastasen können histologisch nicht beurteilt werden |
| pM0 | Histologisch keine Fernmetastasen |
| pM1 | Histologisch gesicherte Fernmetastase(n), kann ergänzt werden durch die Bezeichnung des Organs; Lymphknotenmetastasen jenseits der regionären Lymphknoten gelten als Fernmetastase |

Tabelle 4: pM-Klassifikation

Das Verbleiben eines Residualtumors wird mittels der R-Klassifikation beschrieben, hat einen wichtigen prognostischen Einfluss und ist dadurch auch für die weitere Therapieplanung entscheidend. Dies wird in der folgenden Tabelle dargestellt (Brierley et al., 2016; Mast et al., 2005).

| Residualtumor – R-Faktor | |
|--------------------------|---|
| RX | Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden |
| R0 | Kein Residualtumor |
| R1 | Mikroskopischer Residualtumor (laut histologischer Beurteilung) |
| R2 | Makroskopischer Residualtumor (laut intraoperativem, klinischem oder radiologischem Befund) |

Tabelle 5: R-Faktor

Anhand der TNM-Klassifikation erfolgt eine Stadieneinteilung, welche in folgenden Tabellen dargestellt werden (Brierley et al., 2016; Mast et al., 2005).

| Stadieneinteilung | | | |
|-------------------|----------|---------|----|
| Stadium 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stadium I | T1 | N0 | M0 |
| Stadium II | T2 | N0 | M0 |
| Stadium III | T3 | N0 | M0 |
| | T1 – T3 | N1 | M0 |
| Stadium IVA | T4a | N0 – N1 | M0 |
| | T1 – T4a | N2 | M0 |
| Stadium IVB | T4b | Alle N | M0 |
| | Alle T | N3 | M0 |
| Stadium IVC | Alle T | Alle N | M1 |

Tabelle 6: Stadieneinteilung

| Stadieneinteilung der p16-positiven OPSCC | | | |
|---|---------|---------|----|
| Stadium I | T1, T2 | N0, N1 | M0 |
| Stadium II | T1, T2 | N2 | M0 |
| Stadium III | T3 | N0 – N2 | M0 |
| | T1 – T4 | N3 | M0 |
| Stadium IV | T4 | N0 – N3 | M0 |
| | T1 – T4 | N0 – N3 | M1 |

Tabelle 7: Stadieneinteilung der p16-positiven OPSCC

Zusätzlich zur TNM-Klassifikation wird der resezierte Tumor nach histomorphologischen Kriterien einer Malignitätsgraduierung zugeteilt. Diese besitzt nur einen limitierten prognostischen Nutzen, wobei man tendenziell eine vermehrte lymphogene Metastasierung in höhergradigen Tumoren erkennen kann (Vigneswaran & Williams, 2014).

Die folgende Tabelle stellt diese Malignitätsgraduierung dar (Beck-Mannagetta et al., 2011; Brierley et al., 2016; Mast et al., 2005).

| Histopathologisches Grading – G-Klassifikation | |
|--|--|
| G1 | Hoch differenziert – das Karzinomgewebe zeigt Ähnlichkeit zu regulär ausdifferenzierter Plattenepithelschleimhaut mit häufiger Verhornung und leicht identifizierbaren Interzellularbrücken; die zelluläre Pleomorphie ist gering, manchmal völlig fehlend, Mitosen sind selten und atypische Mitosen fehlen |
| G2 | Mäßig differenziert – die Hornbildung ist geringer ausgebildet, Interzellularbrücken sind spärlich nachweisbar, es liegt eine höhere Kernpleomorphie und eine höhere Mitoserate vor |
| G3 | Niedrig differenziert – die Zeichen einer plattenepithelialen Differenzierung liegen nur spärlich oder nicht vor; die Kernpleomorphie ist hochgradig, die mitotische Aktivität hoch mit atypischen Mitosen |
| G4 | Undifferenziert – es liegt undifferenziertes anaplastisches Gewebe vor; der Tumor kann nicht bzw. nur aufgrund von immunhistochemischen Untersuchungen dem Ausgangsgewebe zugeordnet werden |

Tabelle 8: Grading

Die formalen Klassifikationskriterien der UICC sind entscheidend für die Therapieentscheidung und –planung, wobei jedoch das klinische Bild des Patienten sowie die histomorphologischen Kriterien des Tumors immer mit einzubeziehen sind, um ein individuelles und angepasstes Therpiekonzept erstellen zu können. Dieses wird in der Regel im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz diskutiert und festgelegt um dem Patienten die bestmögliche, multimodale Therapie ermöglichen zu können.

2.2.4 Molekularpathologie

Wie die meisten Tumorerkrankungen entwickelt sich auch das HNSCC in mehreren Schritten durch Inaktivierung von Tumorsuppressoren oder Aktivierung von Protoonkogenen (Argiris et al., 2008) aus Vorläuferläsionen, wie Leukoplakie und Erythroplakie (Vigneswaran & Williams, 2014).



Abbildung 1: Entstehungsmodell des HNSCC, modifiziert nach Argiris et al., 2008

Die veränderten Kontrollpunkte der Proliferation in HNSCCs sind der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), Phosphatidylinositol-3-Kinase-AKT-Mammalian Target von Rapamycin (PI3K-AKT-mTOR) und Janus Kinase-Signal Transducer und Aktivator der Transkription (JAK-STAT) (Bose et al., 2013).

In 90 % der HNSCCs wird EGFR, welcher in Zellproliferation, Angiogenese, Migration, Adhäsion und Invasion involviert ist, überexprimiert und gilt somit als Onkogen (Argiris et al., 2008; Vigneswaran & Williams, 2014). EGFR ist ein Transmembran-Rezeptor, welcher nach Ligandenbindung eine Tyrosinkinase aktiviert, wodurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird (Bose et al., 2013), welche Zellproliferation, Apoptose, Metastasierung und Angiogenese reguliert (Argiris et al., 2008).

Die PI3-AKT-mTOR-Signalkaskade ist eine der am häufigsten in Tumoren überaktivierte Signalkaskade und spielt eine bedeutende Rolle für Zellüberleben, -proliferation und -differenzierung (Bose et al., 2013). Die häufigste Mutation oder Amplifikation dieser Signalkaskade, stellt die vom PIK3CA-Gen dar, welches für die katalytische Untereinheit der PI3-Kinase kodiert (Michmerhuizen et al., 2016).

Die JAK-STAT-Kaskade führt über Transkriptionsinduktion zu Zellüberleben, Tumorwachstum, Angiogenese und einer Hemmung der Immunkontrolle (Bose et al., 2013).

Außerdem sind Mutationen des Tumorsuppressor Gens TP53, welches ein wichtiger Regulator von Zellzyklus und Apoptose ist (Michmerhuizen et al., 2016), eine der häufigsten und frühesten Alterationen des HNSCCs (Vigneswaran & Williams, 2014).

Der DNA-Virus HPV induziert die HNSCC-Onkogenese durch seine Produkte E5, E6 und E7 (Bose et al., 2013). Das Onkoprotein E6 fungiert als Ubiquitin Ligase und hemmt den Tumorsuppressor p53, wodurch Zellzyklus-Arrest und Apoptose inhibiert werden (ebd.). E7 führt über eine Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) Inhibitoren p21 und p27 zur Zellproliferation und inhibiert zusätzlich den Tumorsuppressor Retinoblastom (pRb), wodurch es zu einer erhöhten Transkription von p16 kommt (ebd.). Zudem hemmt E5 den Abbau von EGFR, wodurch es zu einer EGFR-vermittelten erhöhten Zellproliferation kommt.

2.2.5 Standardtherapie

Die operative Resektion mit dem Ziel der R0-Resektion ist eine der therapeutische Hauptsäulen des HNSCCs und sollte, wenn es entsprechend dem TNM-Stadium sinnvoll und möglich ist, vorgenommen werden (Husain & Neyaz, 2017). Häufig sind die operativen Optionen jedoch durch das große Ausmaß des Tumors und den Wunsch des Organerhalts limitiert (Argiris et al., 2008). Im Falle einer primär operativen Therapie wird häufig zusätzlich eine Neck-Dissection vorgenommen, bei welcher die Halslymphknoten elektiv, selektiv oder bei ausgeprägter Metastasierung in selbigen radikal entfernt werden, wodurch die Rezidivrate minimiert werden kann (ebd.). Im Falle von mehreren > 3 cm großen oder fixierten Lymphknoten wird eine radikale Neck-Dissection, mit Ausräumung der Halsweichteile inklusive der V. jugularis interna, des N. accessorius und des M. sternocleidomastoideus gewählt (Beck-Mannagetta et al., 2011). Bei kleineren oder beweglichen Lymphknoten kann hingegen die schonendere funktionelle Neck-Dissection vorgenommen werden (ebd.).

Die primäre Radiotherapie bei Frühstadien von Tumoren, wie beispielsweise der Glottis, sowie Radiatio bei inoperablen Primärtumoren in Kombination mit einer Chemotherapie und zugleich die adjuvante Radiotherapie, haben eine große Bedeutung und somit stellt die Radiotherapie die zweite therapeutische Hauptsäule dar (Argiris et al., 2008). Radiotherapie wird typischerweise an fünf Tagen der Woche in täglicher Fraktion von 1,8-2,2 Gy (Beck-Mannagetta et al., 2011), bei einer mittlere Wochendosis von 10 Gy bis zu einer Maximaldosis von 70 Gy in 7 Wochen angewandt (Argiris et al., 2008).

Eine weitere zentrale Säule der Therapie des HNSCCs stellt die Chemotherapie dar. Es werden platinhaltige Chemotherapeutika, Taxane und Antimetabolite eingesetzt (ebd.). Cisplatin gilt konstant als Chemotherapeutikum der Wahl in der Therapie des HNSCCs und sollte, soweit von Patienten toleriert, weiterhin vorgezogen werden (Benson et al., 2016). Die Chemotherapie wird jedoch hauptsächlich bei inoperablen Patienten als primäre Radiochemotherapie oder im adjuvanten Setting bei positivem Halslymphknotenbefall mit extrakapsulärem Wachstum sowie in der palliativen Situation angewandt. Ein neoadjuvanter Ansatz wird mancherort verfolgt, ist jedoch umstritten.

Etwa ein Drittel der Patienten befindet sich bei Diagnosestellung in Stadium I oder II und wird somit mit einem kurativen Therapiekonzept behandelt. Dieses umfasst die operative Resektion oder Radio(chemo)therapie, je nach Tumorlokalisierung, in Kombination mit einer funktionalen Neck-Dissection der ipsilateralen zervikalen Lymphknoten (Argiris et al., 2008).

In den fortgeschrittenen Stadien III oder IV werden die operative Resektion, Radiotherapie und Chemotherapie als potenziell kurative therapeutische Mittel in Kombination eingesetzt (ebd.). Nicht-operable Tumore werden vormerklich durch primäre Radiochemotherapie therapiert, dabei wird Radiatio mit 5-Fluorouracil (5-FU), Cisplatin, Carboplatin oder Mitomycin kombiniert (Husain & Neyaz, 2017).

2.2.6 Neue zielorientierte Therapiemethoden

Ver mehrt werden sogenannte „targeted therapies“ entwickelt, welche an spezifischen molekularen Strukturen angreifen. Es wird erwartet, dass diese Formen der Therapien in den nächsten Jahren einen größeren Stellenwert in der Therapie des HNSCCs einnehmen werden. Aktuell werden diese sogenannten Biologicals jedoch hauptsächlich im Rahmen von klinischen Studien oder der palliativen Therapie angewandt.

Das älteste und bekannteste Therapeutikum der „targeted therapy“ ist der monoklonale Antikörper Cetuximab, welcher am EGFR angreift. EGFR ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, welcher in über 90 % der HNSCCs überexprimiert wird und eine Signalkaskade aktiviert, die zur Zellproliferation führt (Husain & Neyaz, 2017). Cetuximab blockiert somit diese Signalkaskade und vermindert das Tumorwachstum. Seit 2006 wird Cetuximab in der Therapie des HNSCCs eingesetzt

(Bann et al., 2016). Bei refraktären oder metastasierten Formen des HNSCCs bietet die Kombination von Cetuximab mit Radiatio oder platinhaltigen Chemotherapeutika eine vielversprechende Option (Husain & Neyaz, 2017).

Inhibitoren des Programmierter-Zelltod-1 (PD-1) Signalwegs, wie der monoklonale Antikörper Pembrolizumab, werden zur Zeit in Studien in Bezug auf den therapeutischen Einsatz in der Therapie des HNSCCs getestet und sind ein erfolgversprechender neuer Angriffspunkt (Bauml et al., 2016).

Ein präventiver Ansatz für die vermehrt vorkommenden HPV-positiven HNSCCs wird in der HPV-Impfung gesehen. Diese enthält neutralisierende Antikörper kann dadurch einer Infektion mit dem HPV-Virus vorbeugen. Diese Impfung kann durch den bivalenten Impfstoff Cervarix (GlaxoSmithKline, Brentford, Middlesex, UK) gegen die hoch-Risiko Typen HPV 16 und 18, welche für die meisten HPV-positiven HNSCCs sowie andere HPV-vermittelte Karzinome verantwortlich sind, vorgenommen werden (Bauml et al., 2016). Außerdem gibt es den neun-valenten Impfstoff Gardasil-9 (Merck und Co., Kenilwort, NJ), der gegen die HPV Typen 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58 gerichtet ist (ebd.).

2.2.7 Prognose

In den letzten Jahren wurde die Therapie des HNSCCs durch anatomisch zielgerichtete Therapien, in Form von Operationen und Bestrahlungen wesentlich verbessert und somit konnte die therapiebezogene Patientensterblichkeit reduziert und die therapiebezogene Lebensqualität der Patienten erhöht werden (Bose et al., 2013). Nichtsdestotrotz hat sich das Gesamtüberleben, welches bei etwa 50 % liegt, seit 1960 nicht wirklich verändert (ebd.). Die negative Prognose des HNSCCs ist vor allem auf die oftmals erst späte Diagnosestellung zurückzuführen, da bis dato kein effektives Screeningverfahren vorhanden ist (Husain & Neyaz, 2017).

Der stärkste prognostische Faktor des HNSCCs wird durch die Anzahl der Lymphknotenmetastasen gebildet (Vigneswaran & Williams, 2014). Mit der Anzahl der befallenen Lymphknoten steigt auch die Rezidivrate und die Rate der Fernmetastasen, während die Überlebensrate abnimmt (Beck-Mannagetta et al., 2011). Vor allem eine bereits eingetretene Fernmetastasierung bei Diagnosestellung ist mit einer negativen Prognose assoziiert. Die Fernmetastasierung des HNSCCs

erfolgt als erstes in die Lunge, gefolgt von den mediastinalen Lymphknoten und den Knochen (Argiris et al., 2008).

Das HNSCC besitzt eine hohe Frührezidivrate. Bei mindestens 50 % der Patienten kommt es innerhalb der ersten zwei Jahren zu einem Rezidiv (Argiris et al., 2008). Deshalb sollten vor allem in den ersten Jahren nach Therapie regelmäßige Nachsorgen in 6-8 wöchigen Abständen durchgeführt werden (Beck-Mannagetta et al., 2011). Insgesamt gilt bisher eine mindestens 5-jährige Tumornachsorge als Goldstandard in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde (HNO), während die Empfehlung der Gesellschaft für Strahlentherapie bereits eine lebenslange Nachsorge vorsieht; nicht zuletzt aufgrund der möglichen Spätschäden der Radiatio.

Der HPV-Status der Patienten stellt einen wichtigen prognostischen Faktor dar. HPV-positive Tumore zeigen eine weitaus bessere Prognose, da sie ein besseres Ansprechen auf Strahlen- und Chemotherapie zeigen (Argiris et al., 2008). Das Drei-Jahres-Überleben liegt bei 82 % bei HPV-positiven Tumoren, im Vergleich zu 57 % bei den HPV-negativen Tumoren (Vigneswaran & Williams, 2014).

EGFR-Überexpression ist mit einer negativen Prognose assoziiert (Argiris et al., 2008). Außerdem sind Mutationen in der PI3-AKT-mTOR-Signalkaskade mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, erhöhter lymphogener Metastasierung und vaskulärer Invasion verbunden (Bose et al., 2013).

2.3 Tumormikromilieu

Das „tumor microenvironment“ bzw. Tumormikromilieu (TME), welches das komplexe Zusammenspiel zwischen malignen Tumorzellen und nicht-malignen Zellen des Tumorgebildes darstellt, spielt eine potentiell bedeutende Rolle in der Tumorgenese. Die nicht-malignen Zellen des TME tragen durch autokrine und parakrine Sekretion von Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Entzündungsfaktoren zur Initiation und Aufrechterhaltung der Karzinogenese bei (Balkwill et al., 2012).

Das TME besteht sowohl aus den malignen Tumorzellen als auch aus Extrazellulärmatrix (ECM), Makrophagen, Myofibroblasten, Fibroblasten, Perizyten, neuroendokrinen Zellen, Adipozyten, Immunzellen, Blutzellen und Zellen des lymphatischen Systems (Maonan Wang et al., 2017).

Die ECM bildet einerseits das Gerüst des Tumors aus Kollagen, Laminin, Fibronectin, Proteoglykanen und Hyaluron und hat andererseits eine dynamische

Rolle in der Tumorentwicklung, da es die von den ansässigen Zellen sezernierten Faktoren, wie Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Hormone enthält (ebd.).

Aktivierte Fibroblasten, Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAF) oder Myofibroblasten genannt, die sich normalerweise vor allem an Orten der Wundheilung formieren, initiieren und begünstigen das Tumorwachstum und nehmen durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen Einfluss auf den Tumorprogress, indem es zu einem Umbau der ECM, zur Angiogenese, zum Einwandern von Entzündungszellen und zur Tumorzellproliferation kommt (Balkwill et al., 2012). Zudem fördern sie auch das Invasionsverhalten und die Migration von Tumorzellen (Maonan Wang et al., 2017).

Immunzellen, bestehend aus dem adaptiven Immunsystem, repräsentiert durch B- und T-Zellen und dem angeborenen Immunsystem, beinhaltend dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen, versuchen entstehende Tumorzellen zu eliminieren, führen durch diesen Prozess jedoch zu einer Selektion von dominanten Zellen, welche letztendlich den Tumor bilden (Maonan Wang et al., 2017). Somit werden den verschiedenen Immunzellen heterogene Rollen zugewiesen; einerseits ist ihr Vorkommen mit einer guten Prognose, andererseits mit einer Begünstigung des Tumorwachstums assoziiert (Balkwill et al., 2012).

Tumore sind mit der Bildung eines komplexen Systems von Blutgefäßen assoziiert. Die Formierung von neuen Blutgefäßen ist auf die hypoxischen Bedingungen zurückzuführen und wird durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) hervorgerufen (Maonan Wang et al., 2017). Die Gefäße entstehen aus bereits bestehenden Blutgefäßen und sind chaotisch verwachsen und undicht (Balkwill et al., 2012). Durch die Undichtigkeit werden einerseits Medikamente wie Chemotherapeutika schlecht an den Ort des Tumors gebracht und andererseits die hypoxischen Bedingungen, welche zur Angiogenese führen, weiter begünstigt.

Auch die Formierung von lymphatischen Bahnen wird in Tumoren hochreguliert. Dadurch können maligne Zellen aus dem Tumor auswandern und zur Metastasierung führen. Außerdem wandern T-Zellen über das lymphatische System in den Tumor ein und tragen dazu bei, dass die malignen Zellen der Elimination des Immunsystems entgehen (Maonan Wang et al., 2017).

Fettgewebe und vor allem den darin enthaltenen Adipozyten wird eine Beteiligung an der Karzinogenese zugeordnet. In übergewichtigem adipösem Gewebe kommt es zur Hypoxie, wodurch Inflammation gefördert wird, welche wiederum die Tumorentstehung begünstigt (ebd.). Zudem werden von Adipozyten Zytokine, Chemokine und hormonähnliche Faktoren, beispielweise IL-6, IL-8, Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α) und VEGF, welche ebenfalls zur Tumorentstehung führen (ebd.), ebenso wie Fettsäuren, welche als Nährstoffe zum Tumorwachstum beitragen, sezerniert (Balkwill et al., 2012). Desweiteren werden die im Fettgewebe enthaltenen ASCs mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht. Sie spielen eine Hauptrolle im Tumorprogress, indem sie das TME beeinflussen, Angiogenese fördern und die Eigenschaft besitzen, sich in karzinomassoziierte Zellen zu differenzieren (Maonan Wang et al., 2017).

Die hypoxischen und entzündlichen Bedingungen in Tumoren führen, über eine Freisetzung von noch unbekanntem Faktoren des TME, außerdem zu einer Rekrutierung und Invasion von Stammzellen, die potentiell ASCs sind, welche dann wiederum den Tumorprogress fördern (Sun et al., 2014).

2.4 Grundlagen der mesenchymalen Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen oder auch Multipotente Mesenchymale Stromale Zellen (MSC) genannt, können aus dem Knochenmark, sowie aus Fettgewebe, Zahnpulpa (Wong et al., 2015), Sehnen (Baghaei et al., 2017), Plazenta, Synovial Membran, Blut, Endometrium und der Nabelschnur isoliert werden (Lv et al., 2014).

Friedstein et al. beschrieb erstmals in den 1960er und 1970er Jahren die Isolation von plastik-adhärenenten Stammzellen aus dem Knochenmark, welche die Fähigkeit zur Differenzierung in Osteoblasten und Bindegewebszellen besitzen (Wong et al., 2015). Gegen Ende der 1980er Jahre wurde letztendlich die Verbindung zur Entwicklung in mesenchymales Gewebe im Rahmen der Embryogenese entdeckt (Murphy et al., 2013).

Es ist wahrscheinlich, dass MSCs in allen durchbluteten Geweben des Körpers vorhanden sind (Lv et al., 2014). Zusätzlich wird eine Korrelation zwischen der MSC-Anzahl und der Dichte an Blutgefäßen in Geweben gesehen (Murphy et al., 2013), wodurch die Hypothese des perivaskulären Ursprungs in Form von Perizyten von MSCs bestätigt werden könnte (Wong et al., 2015).

MSCs müssen laut der International Society of Cellular Therapy (ISCT) bestimmte Kriterien erfüllen um bewiesenermaßen als MSCs bezeichnet werden zu dürfen. Sie müssen unter Standardkulturbedingungen plastik-adhärenent sein (Dominici et al., 2006; Wong et al., 2015). Die Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90 müssen exprimiert werden, während spezifische Antigene, die Marker für andere Zellpopulationen darstellen, fehlen müssen. CD45 als Leukozytenmarker, CD34 als Marker für hämatopoetische Progenitorzellen und endotheliale Zellen, CD14 oder CD11b als Monozyten und Makrophagen Marker, CD79 α oder CD19 als B-Zell-Marker werden nicht exprimiert und HLA-DR ist, es sei denn die Zellen wurden durch den Differenzierungsfaktor Interferon- γ (IFN- γ) stimuliert, nicht vorhanden (Baghaei et al., 2017). Des Weiteren müssen sie in der Lage sein sich *in vitro* unter Differenzierungskonditionen in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten zu differenzieren, was durch histologische Färbungen bewiesen werden kann (Dominici et al., 2006).

| | | |
|----|---|---|
| 1. | Adhärenent an Plastik unter Standard-Kulturbedingungen | |
| 2. | Positiv (≥ 95 %): CD105 CD73 CD90 | Negativ (≤ 2 %): CD45 CD34 CD14 oder CD11b CD79 α oder CD19 HLA Klasse II |
| 3. | <i>In vitro</i> Differenzierung zu Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten | |

Tabelle 9: Kriterien der MSCs, modifiziert nach Dominici et al., 2006

Im Falle von Gewebeverletzung werden Chemokine freigesetzt, welche zur Rekrutierung von MSCs führen (Wong et al., 2015). Die MSCs werden dafür aus dem Knochenmark freigesetzt und zirkulieren im Blutsystem zum Ort der Läsion (ebd.). Durch die Sekretion von Chemokinen und Wachstumsfaktoren tragen sie in Form von Zellproliferation und Angiogenese zur Gewebereparatur bei, zeigen anti-entzündliche und immunmodulierende Effekte und können apoptotische Zellen retten (Murphy et al., 2013).

Das Potential der MSCs sich zu differenzieren sowie ihre Rolle in der Gewebereparatur, machen sie für die Therapie von Autoimmunerkrankungen (Wu et

al., 2014), als auch für die regenerative Medizin und insbesondere für den Bereich des Tissue Engineerings interessant.

2.5 Grundlagen der adipogenen Stammzellen

Fettgewebe stellt ein unabhängiges Organ dar, welches aus Adipozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten, Mastzellen, Perizyten, Muskelzellen und Präadipozyten besteht, die durch gefäßenthaltendes Binde- und Stützgewebe zusammengehalten werden (Bellei et al., 2018; Scioli et al., 2014; Yamamoto et al., 2014). 2001 zeigte Zuk et al. erstmals die Möglichkeit multipotente mesenchymale Stammzellen aus Lipoaspirat zu isolieren (Zuk et al., 2001). Aufgrund ihres Ursprungs werden diese Form der Stammzellen Präadipozyten bzw. Adipogene Stammzellen (ASC) genannt. Fett besitzt im Gegensatz zu Knochenmark als Quelle von Stammzellen große Vorteile in der Gewinnung, da es reichlich im menschlichen Körper vorhanden ist und durch Liposuktion oder Exzision einfach zu erhalten ist, wodurch die Patientenmorbidity der Zellgewinnung reduziert wird (Feisst et al., 2015; Schweizer et al., 2015; Spencer et al., 2008). Außerdem verfügt Fettgewebe über eine höhere Konzentration an Stammzellen als viele andere stammzellhaltigen Gewebe (Bellei et al., 2018).

Durch enzymatische Verdauung des Fettes mittels Kollagenase kann die sogenannte Stromal Vascular Fraction (SVF), welche aus einer homogenen Masse der ansässigen Zellen besteht, gewonnen werden (Scioli et al., 2014). Nicht-adhärenz und nicht-proliferative Zellen können durch Kultivierung der SVF entfernt werden, wodurch eine gereinigte ASC-Kultur gewonnen wird (Feisst et al., 2015).

ASCs erfüllen die von der ISCT geforderten Stammzell-Kriterien und sind daher wie verlangt plastik-adhärenz und in der Lage sich zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren (Grottkau & Lin, 2013; Ritter et al., 2015). Des Weiteren lassen sie sich auch in andere mesenchymale Zelllinien, wie Myozyten, Kardiomyozyten, Hepatozyten, Melanozyten und Pankreaszellen differenzieren (Palumbo et al., 2018; Yamamoto et al., 2014). Zusätzlich besitzen sie die Eigenschaft zur Transdifferenzierung und demzufolge zur Differenzierung in endodermales und ektodermales Gewebe, wie z.B. Neurone und Keratinozyten (Feisst et al., 2015). ASCs besitzen mithin nicht nur eine höhere proliferative

Kapazität sondern auch ein erhöhtes Differenzierungspotential gegenüber anderen Stammzellen (Satish et al., 2015).

ASCs verändern im Laufe des Kultivierungsprozesses ihre Oberflächenmerkmale und erfüllen insofern anfangs nicht die der ISCT geforderten Kriterien für Stammzellen. Sie sind unkultiviert CD34 positiv und CD105 schwach positiv, werden jedoch nach Kultivierung CD34 negativ und CD105 stark positiv (Feisst et al., 2015). Nach ein bis zwei Passagen stimmen ihre Oberflächenmerkmale daher zu über 90 % mit denen von MSCs überein (Scioli et al., 2014). CD34 wird als nischen-spezifischer Marker von unreifen Zellen bzw. Vorläuferzellen vermutet, welcher zudem mit hypoxischen Bedingungen in Verbindung gebracht wird (Bora & Majumdar, 2017).

Die anatomische Ursprungsregion der ASCs kann Einfluss auf die Proliferation, Funktion und das Differenzierungspotential haben (Schweizer et al., 2015). Außerdem kann man Unterschiede zwischen den Eigenschaften von ASCs verschiedener Patienten beobachten (Feisst et al., 2015), wobei die Funktion und Proliferationsrate der ASCs mit steigendem Patientenalter und Gewicht abnimmt (Palumbo et al., 2018).

2.5.1 Therapeutischer Gebrauch

ASCs sind in der Lage sich in verschiedene Zelllinien zu differenzieren, Vaskularisation und Proliferation zu fördern und Apoptose zu hemmen, was ihnen einen therapeutischen Nutzen in der regenerativen Medizin und dem Tissue Engineering verleiht (Ritter et al., 2015). Außerdem sind ASCs generell sehr robuste Zellen und imstande unter ischämischen Bedingungen zu überleben und sich weiter zu differenzieren (Girandon et al., 2011).

Das anfängliche Augenmerk der Forschung in der regenerativen Medizin lag in der Herstellung von Knorpel und Knochen. In der Knochenregeneration wurden ASCs vor allem in Kombination mit traditionellen Knochentransplantaten verwendet, jedoch zeigten sich Limitationen in Bezug auf die Herstellung von großen 3D Transplantaten mit genügender Knochenstabilität (Feisst et al., 2015; Locke et al., 2011). Wahrscheinlich regen die von ASCs sezernierten Zytokine und Chemokine endogene Stammzellen und Progenitorzellen zur Migration an den Ort des

Knochendefektes an, welche dann die Osteosynthese ausmachen (Thesleff et al., 2011).

Des Weiteren wurden ASCs aufgrund ihres chondrogenen Potenzials intraartikulär in der Arthrose-Therapie eingesetzt und konnten die Schmerzsymptomatik und Patientenzufriedenheit verbessern (Feisst et al., 2015; Qomi & Sheykhhasan, 2017). Es ist jedoch nicht geklärt, ob tatsächlich die chondrogene Differenzierung der ASCs oder aber ihr anti-entzündliches Potential zur Verringerung der Schmerzsymptomatik beitragen (Locke et al., 2011).

Zudem wird in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie Eigenfett mit Zusatz von ASCs zum Aufbau von Geweben, wie z.B. der Brust, sowie zur Faltenbehandlung verwendet. Das Einbringen von ASCs in das aufgearbeitete Lipoaspirat minimiert das physiologische Zugrundegehen des eingebrachten Fettes durch körpereigene Resorption aufgrund von fehlender Neovaskularisation, indem die ASCs die Angiogenese fördern und die Mitoserate der Adipozyten sowie anderer ortsansässiger Zellen erhöhen (Bielli et al., 2015; Locke et al., 2011).

Im weiteren Verlauf der Forschung wurde der therapeutische Nutzen der ASCs in Bezug auf die Beeinflussung des Immunsystems durch Hemmung von lymphozytären Reaktionen und Bildung von inflammatorischen Zytokinen gesehen und der damit potentielle Gebrauch in der Therapie von Autoimmunerkrankungen, wie Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn und Multiple Sklerose, entdeckt (Feisst et al., 2015). Vermutlich migrieren ASCs durch Chemotaxis zum Ort der Entzündung, wo sie durch parakrine Sekretion anti-inflammatorisch wirken und zudem die Zellteilungsrate der ortsansässigen Zellen fördern.

Durch ihr Differenzierungspotential, ihre anti-entzündlichen Eigenschaften sowie die Förderung der Angiogenese und Neovaskularisation durch Sekretion von VEGF, Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) (Grottkau & Lin, 2013), Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF), Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF- β) und Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF-2) (Scioli et al., 2014) begünstigen ASCs die Epithelialisierung und Wundheilung (Feisst et al., 2015; Nie et al., 2011). Ferner haben ASCs das Potential sich in Keratinozyten zu differenzieren und ein epidermis-ähnliches System zu bilden (Chavez-Munoz et al., 2013). Zusammengefasst verleihen diese Eigenschaften ihnen einen potentiellen therapeutischen Einsatz in der Therapie von Brandnarben und anderen großen Epitheldefekten.

Auch in der Therapie von Nervenschäden könnten ASCs in der Zukunft eingesetzt werden, da sie das Potential besitzen sich in Schwann-Zellen zu differenzieren, welche die Myelinscheide des peripheren Nervensystems bilden und deswegen für die Regeneration von Nerven entscheidend sind (Feisst et al., 2015). Überdies sezernieren ASCs neurotrophe und neuroprotektive Faktoren, welche die Nervenregeneration induzieren und fördern können (Zhang & Rosen, 2018).

2.5.2 Assoziation zu malignen Tumoren

Der Einfluss von ASCs auf maligne Tumore wird bis dato noch sehr widersprüchlich diskutiert, da einige Studien zeigen, dass ASCs die Tumorprogression und Metastasierung fördern, wohingegen andere Studien das Gegenteil belegen.

Man findet in Tumoren vermehrt ASCs als Teil des TME, da die Tumorzellen diese durch die Sezernation von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren zur Migration zum Tumor und Invasion in den Tumor anregen (Nowicka et al., 2013; Sun et al., 2014; Yagi & Kitagawa, 2013).

ASCs sezernieren wiederum selbst verschiedene inflammatorische Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, welche eine potentielle Rolle in der Progression und Proliferation von Tumoren haben (Ritter et al., 2015; Scioli et al., 2014). Ferner fördern ASCs die Neovaskularisation, die Synthese von Extrazellulärmatrix und die Differenzierung von Myofibroblasten, wodurch das Wachstum von Tumoren zudem positiv beeinflusst wird (Bielli et al., 2015). Darüberhinaus führen ASCs zu einer Veränderung der Extrazellulärmatrix des Tumors, wodurch sie womöglich die Metastasierung initiieren (Rowan et al., 2014).

Insofern besteht eine gegenseitige Beeinflussung zwischen Tumorzellen und Stammzellen, ASCs, durch autokine und parakrine Mechanismen sowie durch direkten Zell-Zell-Kontakt.

Es wurden auch in HNSCCs bereits vermehrt Stammzellen gefunden und es zeigte sich, dass die Anzahl der sich im Tumor befindlichen Stammzellen mit der Tumorgroße korreliert (Liotta et al., 2014) und, dass die aus Tumoren isolierten Stammzellen das Wachstum von HNSCCs *in vivo* fördern können (Kansy et al., 2014).

2.6 Zielsetzung

Unter Annahme der Hypothese, dass die in Tumoren und speziell in HNSCCs gefundenen Stammzellen möglicherweise nicht ausschließlich, aber auch aus dem peritumoralen Fettgewebe stammen und somit ASCs darstellen, sollte im Folgenden die Wechselwirkungen zwischen den ASCs und den Tumorzellen untersucht werden. Es sollte versucht werden einen Einblick in die Rolle von Stammzellen im Tumormikromilieu und auf die Tumorzellen selbst zu bekommen.

Die aus Fettgewebe isolierten ASCs sollten zuerst auf ihre Stammzeleigenschaften getestet werden, um sie sicher als Stammzellen identifizieren und für die folgenden Versuche verwenden zu können.

Ziel war es vor allem die invasiven Eigenschaften der ASCs in Bezug auf etablierte HNSCC-Zelllinien zu untersuchen, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Hypothese, dass die sich im Tumor befindlichen Stammzellen tatsächlich aus Fettgewebe eingewandert sind, zutreffend sein könnte.

Des Weiteren sollten Veränderungen der ASCs auf molekularer Ebene während und nach Invasion bzw. Co-Kultivierung mit HNSCC-Zellen untersucht werden.

Durch die Erkenntnisse versprechen wir uns ein weiteres Puzzlestück für ein tieferes Verständnis der Wechselwirkungen des Tumormikromilieus zu erlangen, um in Zukunft neue potentielle Angriffspunkte für die Therapie des HNSCCs zu identifizieren.

3. Material und Methoden

Die folgenden Versuche wurden durch das Ethikvotum 1420/05 bewilligt.

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

In der folgenden Tabelle sind alle in der Arbeit verwendeten HNSCC-Zelllinien mit Lokalisation, Alter und Geschlecht aufgelistet.

| Name | Lokalisation | Alter | Geschlecht |
|---------|--|----------|------------|
| Cal27 | Zunge, niedrig differenziertes Plattenepithelkarzinom | 56 Jahre | Männlich |
| UD-SCC2 | Sinus piriformis, niedrig differenziertes Plattenepithelkarzinom | 58 Jahre | Männlich |

Tabelle 10: HNSCC-Zelllinien

Cal27 wurden vom Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig erworben. UD-SCC2 wurden durch Herrn Professor Dr. med. Henning Bier als Primärkultur des Universitätsklinikums Düsseldorf bezogen.

In der folgenden Tabelle sind alle in der Arbeit verwendeten ASC-Zelllinien mit Lokalisation, Alter, Geschlecht und BMI aufgelistet.

| Name | Lokalisation | Alter | Geschlecht | BMI |
|-------------|--------------------------|----------|------------|------|
| MTU-ASC-T10 | Hypopharynx Karzinom | 59 Jahre | Männlich | 18,3 |
| MTU-ASC-N11 | Benigne Raumforderung | 61 Jahre | Männlich | 28,1 |

Tabelle 11: ASC-Zelllinien

Die ASC-Zelllinien wurden aus zervikalem peritumoralem Fett isoliert. Die Zelllinie MTU-ASC-T10 stellt die ASC-Zelllinie eines Patienten mit malignem Tumorleiden dar, während MTU-ASC-N11 als ASC-Zelllinie eines tumorfreien Patienten mit benigner Raumforderung gewählt wurde.

3.1.2 Medien und Supplemente für die Zellkultur

In der folgenden Tabelle sind alle in der Arbeit verwendeten Medien und Supplemente für die Zellkultur mit dem jeweiligen Hersteller aufgelistet.

| Medien und Supplemente | Hersteller |
|--|---|
| DMEM – Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium | GIBCO®, Life Technologies Carlsbad, CA, USA |
| FBS – Fetal Bovine Serum | Biochrome AG, Berlin, Deutschland |
| L-Glutamine 200 mM | Biochrome AG, Berlin, Deutschland |
| Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Medium | PromoCell, Heidelberg, Deutschland |
| Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium | PromoCell, Heidelberg, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml Penicillin und 10 000 µg/ml Streptomycin) | Biochrome AG, Berlin, Deutschland |
| RPMI – Roswell Park Memorial Institute Medium | GIBCO®, Life Technologies Carlsbad, CA, USA |
| Xeno-Free Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (XF) | PeloBiotech, Plenegg/Martinsried, Deutschland |

Tabelle 12: Medien und Supplemente für die Zellkultur

3.1.3 Reagenzien und Chemikalien

In der folgenden Tabelle sind alle in der Arbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien mit dem jeweiligen Hersteller aufgelistet.

| Reagenzien und Chemikalien | Hersteller |
|---|--|
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| AA | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| Alcian-Blau-Färbelösung | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Alexa Fluor® 700 anti-human CD90 Antikörper | BioLegend, San Diego, CA, USA |
| Alexa Fluor® 700 Mouse IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper | BioLegend, San Diego, CA, USA |
| Alizarin-Rot-S | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Ammonium Hydroxid Lösung NH ₄ OH | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| APC anti-human CD73 Antikörper | BioLegend, San Diego, CA, USA |
| Brilliant Violet™ 510 anti-human HLA-DR Antikörper | BioLegend, San Diego, CA, USA |
| BSA – Bovines Albumin | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Calciumchlorid-Dihydrat | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Collagenase NB 4 | Serva, Heidelberg, Deutschland |
| Crystal-Violett | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP's) | GE-Healthcare, München, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| DPBS – Duplecco's Phosphate Buffered Saline | GIBCO®, Life Technologies Carlsbad, CA, USA |
| Ethanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| FKS | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| Formaldehyd | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Glucose-Monohydrat | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Hepes | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |

| | |
|--------------------------------|--|
| Hexnukleotid Mix 10x conc. | Roche, Mannheim, Deutschland |
| Hoechst 33342 Farbstoff | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Hydrocortison | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| IBMX | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Indomethacin | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Insulin | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Interleukin 6 | Biomol, Hamburg, Deutschland |
| Isopropanol | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Kaliumchlorid | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Kollagenase | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| LSR Fortessa Cell Analyzer | Becton, Dickinson & Company, San Jose, CA, USA |
| Methanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| Öl-Rot-O | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| PE anti-human CD105 Antikörper | BioLegend, San Diego, CA, USA |
| Primer IL-20RB | Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland |
| Primer IL-22RA1 | Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland |
| Primer IL-24 | Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland |
| Primer IL-6 | Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland |
| Primer-IL20RA | Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland |
| Reverse Transkriptase | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| RLT-Puffer | Qiagen, Düsseldorf, Deutschland |
| RNase-free Water – DPEC-Wasser | Qiagen, Düsseldorf, Deutschland |
| RPE-Puffer | Qiagen, Düsseldorf, Deutschland |
| RT-Puffer | Thermo Scientifix, Waltham, MA, USA |
| RW1-Puffer | Qiagen, Düsseldorf, Deutschland |

| | |
|-----------------------|--|
| Sodium-Dolocyl-Sulfat | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| SYBR Master Mix | PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Taq-Polymerase | PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Triton-X100 | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland |
| α -MEM | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

Tabelle 13: Reagenzien und Chemikalien

3.1.4 Geräte

In der folgenden Tabelle sind alle in der Arbeit verwendeten Geräte mit dem jeweiligen Hersteller aufgelistet.

| Gerät | Hersteller |
|---|---|
| Absaugpumpe Vacuumbrand ME2 | Vacuumbrand GmbH, Wertheim, Deutschland |
| BD LSRFortessa™ Cell Analyzer | BD Life Sciences – Biosciences, San Jose, CA, USA |
| Bestrahlungsgerät Gulmay Medical LTD RS 225 X-Ray Research System | Gulmay Medical LTD, Surrey, England |
| Bio-Rad C1000™ Thermal Cycler | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| Bio-Rad CFX96™ Real-Time System | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| Brutschrank HeraCell 150i CO ₂ Inkubator | Therma Scientific, Waltham, MA, USA |
| Cellometer™ Auto T4 | PeqLab Biotechnologie GmbH, München, Deutschland |
| ELISA Reader Multiscan FC | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| Eppendorf Research Pipetten 1 000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 20 μ l, 10 μ l | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Gerierschrank Premium No frost | Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland |
| Kühlschrank comfort | Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland |

| | |
|--|---|
| Laborabzug | Köttemann GmbH & Co. KG, Uetze, Deutschland |
| Leica Mikroskop DMI6000 B | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Leica Mikroskop DMIL, Objektiv Objektiv 10/0.20 PHACO 1a 160/- | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Leica Mikroskopkamera DFC425 C | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Magnetrührer RCT basec | IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland |
| Minishaker MS2 | IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland |
| Mr. Frosty™ Gefrierbehälter | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometer und -Fluorometer | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| pH-Meter 766 Calimatic | Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland |
| Präzisionswaage SBC 32 | Scaltec, Heiligenstadt, Deutschland |
| Rüttler Vibrax VXR | IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland |
| Sterilbank HeraSafe KS | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| Stickstofftank LS 4800 | Taylor-Wharton Germany GmbH, Husum, Deutschland |
| Thermal Cycler C1000 Real-Time System CFX96™ | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Thermomoxer comfort 1,5 ml | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Wasserbad Tyo 1003 | GFL, Burgwedel, Deutschland |
| Zellzähler Cellometer™ Auto T4 | PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland |
| Zentrifuge 5430R | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Zentrifuge PerfectSpin Mini | PeqLap Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland |

Tabelle 14: Geräte

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

In der folgenden Tabelle sind alle in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien mit dem jeweiligen Hersteller aufgelistet.

| Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|---|---|
| 50 ml Reaktionsgefäße | Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland |
| 1,5 ml Collection Tubes | Qiagen, Düsseldorf, Deutschland |
| 15 ml Reaktionsgefäße | Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland |
| 2 ml Collection Tubes | Qiagen, Düsseldorf, Deutschland |
| Corning® BioCote™ Matrigel® Invasion Chamber | Corning, Bedford, MA, USA |
| Kryoröhrchen | Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland |
| Objektträger Superfrost Plus | Termo Scientific, Waltham, USA |
| Parafilm® | Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland |
| Pasteurpipetten aus Glas | Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland |
| Pipetten-Spitzen 1 000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl | PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland |
| Spin Columns | Qiagen, Düsseldorf, Deutschland |
| Tissue Culture Dish 100 x 20 mm | Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland |
| Tissue Culture Plate 6-well | Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland |
| Tissue Culture Plate 96-well | Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland |
| Tissue Culture Plate 96-well U-Bottom | Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland |
| Toppits Alufolie | Cofresco Frischhalteprodukte, Minden, Deutschland |

| | |
|----------------|--|
| Wattestäbchen | DM, Karlsruhe, Deutschland |
| Zellschaber | Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, Deutschland |

Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien

3.1.6 Computerprogramme

In der folgenden Tabelle sind alle in der Arbeit verwendeten Computerprogramme mit dem jeweiligen Hersteller aufgelistet.

| Computerprogramme | Hersteller |
|----------------------------------|--|
| Microsoft Office für Mac 2011 | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA |
| Software Cellometer Auto T4 | PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland |
| Prism GraphPad 7 for Mac | GraphPad Software Inc., La Jolla, CA USA |
| NanoDrop software | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| Image Lab Software 5.2.1 | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Bio-Rad CFX Manager 3.1 | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| FlowJo v 10.4 | FlowJo™, Becton, Dickinson & Company, San Jose, CA, USA |
| Leica Application Suite LAS V3.8 | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland |

Tabelle 16: Computerprogramme

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten werden unter sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow Hood durchgeführt.

Die Arbeit mit den Zelllinien erfolgt unter Standardkultivierungsmethoden. Dazu werden alle verwendeten Medien und Supplemente im vorgeheizten 37 °C Wasserbad aufgewärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Die Kultivierung der ASC-Linien erfolgt Serum- bzw. FCS-frei. Da die HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 für die Adhäsion an der Kulturschale Serum benötigen, wird am Tag vor den eigentlichen Versuchen das Medium jeweils in ein Serum- bzw. FCS-freies Medium gewechselt.

3.2.1.1 Medienherstellung

Für die Kultivierung von Cal27 wird Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) als Medium verwendet. Dieses wird mit 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin gemischt. Für die Kultivierung von UD-SCC2 wird Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) mit 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin ergänzt. Außerdem wird für die Versuche mit den HNSCC-Zelllinien jeweils ein Medium in der wie oben aufgeführten Zusammensetzung, jedoch ohne Serum/ FCS, hergestellt. Für die Kultivierung der ASC-Linien wird PloBiotech Xeno-Free Mesenchymal Stem Cell Growth Medium verwendet.

3.2.1.2 Auftauen der Zellen

Es wird ein Auftaumedium aus DMEM mit 20 % FCS hergestellt und davon werden 5 ml in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Danach wird das Kryoröhrchen aus dem -196 °C Stickstofftank geholt. Dieses wird durch Schwenken im 37 °C Wasserbad langsam angetaut bis noch ein kleiner Teil gefroren bleibt. Es wird 1 ml des Auftaumediums mit einer Pasteurpipette in das Kryoröhrchen pipettiert, wodurch auch der letzte Rest auftaut. Die Zellsuspension wird tropfenweise in das 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das Zentrifugenröhrchen wird bei 1500 rpm für

5 Minuten zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgesaugt. Das Zell-Pellet wird nun in einem geeigneten Volumen vom jeweiligen Medium aufgenommen und in eine geeignete Kulturschale überführt.

3.2.1.3 Splitten der Zellen und Mediumwechsel

Die Zellen sollten vorzugsweise bei 80 % Konfluenz gesplittet werden, da es sonst zu einer Eigeninhibition des Wachstums und der Proliferation kommt.

Das Medium in der Kulturschale wird vorsichtig vom Rand abgesaugt und dann werden die am Boden haftenden Zellen durch eine langsame Zugabe von 5 ml DPBS und vorsichtiges Schwenken gewaschen. Danach wird das DPBS wiederum vom Rand abgesaugt. Es wird 1 ml Triple E (Trypsin) zu den Zellen gegeben und die Kulturschale wird für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert, wodurch die Zellen aus ihrem Zellverband gelöst werden. Nach der Inkubationszeit werden 10 ml des jeweiligen Kulturmediums in die Kulturschale gegeben und durch mehrmaliges Einziehen in die Pipette werden die Zellen optimal getrennt und durchmischt. Die Zellsuspension wird in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals gut gemischt. 1 ml der Zellsuspension wird in eine Kulturschale gegeben und dazu werden 9 ml des jeweiligen Kulturmediums hinzugegeben.

Nach 2 Tagen sollte das Medium gewechselt werden, indem dieses vom Rand der Kulturschale abgesaugt wird und durch 10 ml frisches Medium ersetzt wird.

3.2.1.4 Einfrieren der Zellen

Es wird ein Einfriermedium aus FCS und 5 % Dimethylsulfoxid hergestellt. Zum Einfrieren von Zellen werden die Zellen wie beim Splitten behandelt und vom Boden der Kulturschale gelöst. Die Zellsuspension wird dann jedoch bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das erhaltene Zell-Pellet wird mit dem zuvor hergestellten Einfriermedium resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wird in 1 ml Kryogefäße abgefüllt und bei -80 °C im Mr. Frosty eingefroren. Nach 5 Tagen werden die Kryogefäße in den -196 °C Stickstofftank überführt.

3.2.2 Bestrahlung

Für die Versuche wird das Bestrahlungsgerät RS 225 X-Ray Research System der Firma Gulmay Medical Systems, Klinikum Rechts der Isar, Institut für Strahlentherapie, Universitätsprofessorin Dr. med. Stephanie E. Combs, verwendet.

Es werden folgende Standardeinstellungen vorgenommen:

| | |
|----------------------|--------|
| Elektrische Spannung | 70 kV |
| Stromstärke | 10 mA |
| Tischhöhe | 466 cm |
| Filter | Nr. 3 |

Tabelle 17: Standardeinstellungen der Bestrahlungseinheit

Um eine Strahlendosis von 1 Gy (Gray) zu erreichen, müssen die Zellen für eine Minute bestrahlt werden.

Für die Experimente wird eine Dosis von 2 Gy gewählt, da diese den einzelnen Fraktionen der Patientenbestrahlung in der Therapie des HNSCC entspricht.

3.2.3 ASC-Isolation

Die Isolation der ASCs wird nach dem etablierten Protokoll vom Patricia Zuk et al. durchgeführt (Zhu, Heydarkhan-Hagvall, Hedrick, Benhaim, & Zuk, 2013; Zuk et al., 2001).

Als erstes wird die Fettprobe mit Hilfe eines Skalpells zu einem homogenen Gewebeprei zerkleinert. Der Brei wird mit PBS in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 1500 rpm für 10 Minute zentrifugiert. Danach wird das PBS vorsichtig vom Rand abgesaugt. Dieser Waschschrift wird mehrmals wiederholt, damit Blutzellen und andere unerwünschten Bestandteile aus der Masse eliminiert werden.

Es wird ein Kollagen-Verdau-Puffer hergestellt. Dazu wird ein Kollagen Puffer aus 47,6 g Hepes, 14 g Natriumchlorid, 7,2 g Kaliumchlorid, 0,3 g Calciumchlorid-Dihydrat, 1,98 g Glucose-Monohydrat und 2000 ml Aqua dest. gemischt. Anschließend wird 1 g Kollagenase mit 7,5 g BSA gemixt und danach in 500 ml des zuvor hergestellten Kollagen Puffers aufgelöst.

Nachfolgend wird etwa die doppelte Menge an Kollagen-Verdau-Puffer im Vergleich zur Zellmasse zu dem Gewebeprei gegeben. Die Probe wird für 30 Minuten im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert, wodurch die Zellen aus ihrem Verband gelöst werden und eine feine Masse ohne feste Bestandteile entsteht. Um den Verdauvorgang zu stoppen, wird FCS-haltiges Medium hinzugefügt.

Das Zentrifugenröhrchen wird nun bei 2000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, wodurch sich am Boden des Röhrchens die Stromal Vascular Fraction (SVF) als Pellet sammelt. Die SVF besteht aus Immunzellen, endothelialen Progenitor Zellen und ASCs.

Der Überstand wird mittels Pasteurpipette abgesaugt, wodurch man die SVF im Pellet am Grund des Zentrifugenröhrchens erhält. Das SVF-Pellet wird dann in PelloBiotech Xeno-free Mesenchymal Stem Cell Growth Medium resuspendiert und in ein Well einer 6-Well Kulturschale gegeben.

Die Zellen werden für 24 bis 48 Stunden kultiviert. Nach dieser Zeit wird die Kulturschale vorsichtig mit PBS gewaschen, um alle nicht-adhärenenten Zellen zu eliminieren. Somit erhält man die ASCs für die weitere Kultur und nachfolgende Experimente.

3.2.4 ASC-Differenzierung

Um die Stammzeleigenschaften der ASCs zu untermauern, werden die isolierten ASC-Zelllinien zu Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten differenziert.

Die adipogene und osteogene Differenzierungen werden in einer 6-Well-Kulturschale ausgeführt. Pro Zelllinie werden jeweils drei Wells belegt, sodass zwei Wells zur Differenzierung und ein Well als Negativkontrolle verwendet wird.

Die chondrogene Differenzierung wird in einer 96-Well-U-Bottom-Kulturschale ausgeführt. Auch hier werden jeweils drei Wells belegt und somit dienen zwei Wells der Differenzierung und eines als Kontrolle.

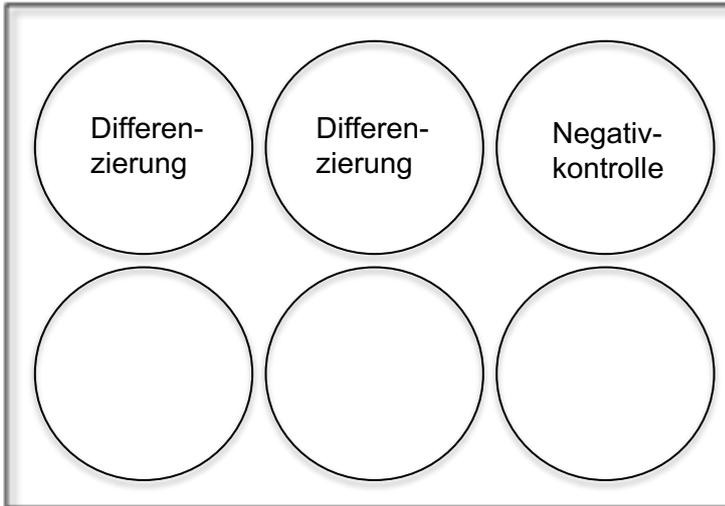


Abbildung 2: Plattenbelegung der adipogenen und osteogenen Differenzierung

3.2.4.1 Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung werden zuerst ein Induktionsmedium und ein Differenzierungsmedium hergestellt.

Ein Induktionsmedium wird hergestellt aus:

| | |
|---------------|---------|
| DMEM | 500ml |
| FCS | 5 % |
| AA | 1 % |
| Insulin | 500 µl |
| Hydrocortison | 0,02 mg |
| IBMX | 0,05 g |
| Indomethacin | 0,01 g |

Tabelle 18: Induktionsmedium der adipogenen Differenzierung

Ein Differenzierungsmedium wird hergestellt aus:

| | |
|---------|--------|
| DMEM | 500 ml |
| FCS | 5 % |
| AA | 1 % |
| Insulin | 500 µl |

Tabelle 19: Differenzierungsmedium der adipogenen Differenzierung

4 x 10⁴ Zellen der ASC-Zelllinien werden pro Well einer 6-Well-Kulturschale ausgesät. Wenn die Zellen zu 80-90 % konfluent sind, wird ihr Kulturmedium abgesaugt und durch Induktionsmedium ersetzt; ein Well wird wiederum mit Kulturmedium befüllt, da dieses als Kontrolle dient. Am dritten Tag des Differenzierungs-Prozesses wird das Induktionsmedium abgesaugt und durch Differenzierungsmedium ersetzt. Dieses wird im weiteren Verlauf jeden dritten Tag gewechselt.

Nach 14 Tagen ist die Differenzierung beendet.

3.2.4.2 Öl-Rot-Färbung

Die Öl-Rot-Färbung dient dazu, die erfolgreiche adipogene Differenzierung zu beweisen. Öl-Rot färbt die Triglyzeride der Adipozyten leuchtend rot an.

Dazu werden 2,5 g Öl-Rot-O in 400 ml Isopropanol unter ständigem Rühren auf der Magnetplatte für zwei Stunden aufgelöst. 1,5 Teile dieser Stocklösung werden mit einem Teil Aqua dest. in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und für eine Stunde im Kühlschrank gelagert, wodurch sich ungelöste Bestandteile am Grund absetzen. Der Überstand dieser Lösung wird durch einen Spritzenfilter filtriert und die dabei erhaltene Lösung dient als Färbelösung.

Die Zellen werden mit einer 10 % Formalin-Lösung fixiert, indem 1 ml zu dem Medium der Kulturschale dazugegeben wird und die Kulturschale für 15 Minuten im 37 °C Brutschrank inkubiert werden. Danach wird das Medium mit dem Formalin wieder abgesaugt und abermals 3 ml der 10 % Formalin-Lösung zu jedem Well gegeben. Die Kulturschale wird dann für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das Formalin abgesaugt und folgend werden einige Tropfen der Öl-Rot-Färbelösung in das Well gegeben, bis der Boden bedeckt ist. Dieses wird für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird die Öl-Rot-Lösung abgesaugt und die Zellen mehrmals mit DPBS gewaschen. Nach dem letzten Schritt wird das DPBS auf den Zellen belassen und die Zellen können so mithilfe des Mikroskops analysiert werden.

3.2.4.3 Osteogene Differenzierung

Es werden 5×10^3 Zellen der ASC-Zelllinien pro Well einer 6-Well-Kulturschale ausgesät. Wenn die Zellen über 100 % konfluent sind, wird das Kulturmedium abgesaugt und PromoCell Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium hinzugegeben; ein Well wird wiederum mit Kulturmedium befüllt, da dieses als Kontrolle dient. Das Medium wird dann jeden dritten Tag gewechselt.

Nach 21 Tagen ist die Differenzierung beendet.

3.2.4.4 Alizarin-Rot-Färbung

Die Alizarin-Rot-Färbung dient zum Beweis der erfolgreichen osteogenen Differenzierung der ASCs. Durch die Alizarin-Rot-Färbung werden Calcium-Ablagerungen leuchtend rot-orange unter dem Mikroskop sichtbar.

Es werden 2 g Alizarin-Rot-S in 100 ml Aqua dest. aufgelöst. Dann wird der pH-Wert der Lösung mithilfe von 0,1 % NH_4OH an einen pH 4,1-4,3 angeglichen. Somit erhält man die Alizarin-Rot-Färbelösung.

Die Zellen werden mit einer 10 % Formalin-Lösung fixiert, indem man 1 ml zu dem Medium der Kulturschale gibt und die Kulturschale dann für 15 Minuten im 37 °C Brutschrank inkubiert. Anschließend wird das Formalin-Medium-Gemisch abgesaugt und weitere 3 ml der 10 % Formalin-Lösung zu jedem Well gegeben. Die Kulturschale wird danach für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Formalin wird nach Ablauf der Inkubationszeit vorsichtig abgesaugt und die Zellen werden mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wird tropfenweise die Alizarin-Rot-Färbelösung in die Wells gegeben bis alle Zellen bedeckt sind. Die Kulturschale wird folgend in Alufolie eingewickelt, damit sie komplett abgedunkelt für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden kann. Anschließend wird die Alizarin-Rot-Lösung abgesaugt und die Zellen werden viermal mit Aqua dest. gewaschen. Abschließend wird etwas DPBS zu jedem Well gegeben und die Zellen können unter dem Mikroskop analysiert werden.

3.2.4.5 Chondrogene Differenzierung

Es werden 1×10^5 Zellen der ASC-Zelllinien pro Well in eine 96-Well-U-Bottom-Kulturschale ausgesät. Durch die Form des U-Bottoms bilden sich am Grund Spheroide. Nach zwei Tagen wird das Medium vorsichtig abgesaugt und durch PromoCell Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Medium ersetzt; ein Well wird wieder mit dem Kulturmedium befüllt und dient als negative Kontrolle. Das Differenzierungsmedium wird jeden dritten Tag gewechselt. Nach 21 Tagen ist die Differenzierung beendet.

3.2.4.6 Alcian-Blau-Färbung

Alcian-Blau färbt die Proteoglykane der Chondrozyten blau an und gilt somit als Beweis der erfolgreichen chondrogenen Differenzierung.

Das Medium wird vorsichtig abgesaugt und die Spheroide werden mit DPBS gewaschen. Anschließend werden die Spheroide mit einer 10 % Formalin-Lösung fixiert, indem 200 μ l der Lösung zu jedem Well hinzugegeben werden. Die Kulturschale wird für 20 Minuten im 37 °C Brutschrank inkubiert. Danach wird die Formalin-Lösung abgesaugt und die Spheroide zweimalig mit DPBS vorsichtig gewaschen. Die Alcian-Blau-Färbelösung wird auf die Spheroide gegeben und für 20 Minuten inkubiert. Nachfolgend wird die Färbelösung wiederum abgesaugt und die Spheroide werden mit Aqua dest. gewaschen.

3.2.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Es werden jeweils 100 μ l einer Zellsuspension in die Wells einer 96-Well-Platte pipetiert und diese für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und verworfen. FC-Rezeptor Block Human TruStain FcX™ wird 1:20 in PBS verdünnt und davon werden jeweils 50 μ l in die Wells pipetiert und dieses für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden jeweils 200 μ l PBS hinzugegeben und für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und folgend der Überstand abgesaugt und verworfen.

Fixable Viability Stain wird 1:1.000 in PBS verdünnt und die Zellen in 50 μ l dieser Lösung resuspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert, um die Zellen für die

Färbung vorzubereiten. Die Negativkontrollen werden stattdessen in 50 µl PBS resuspendiert. Im Anschluß werden jeweils 200 µl PBS hinzugegeben und für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt und verworfen. Danach werden 50 µl der Oberflächenantikörper zu den Zellen pipettiert und diese so resuspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden nochmals jeweils 200 µl PBS hinzugegeben und für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und folgend der Überstand abgesaugt und verworfen, wodurch überschüssige Antikörper entfernt werden.

Das Fixation/Permeabilization Konzentrat wird 1:4 mit Fixation/Permeabilization Diluent verdünnt und 100 µl dieses zu den Zellen hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die intrazellulären Antikörper fixiert und permeabilisiert werden. In der Zwischenzeit wird ein Permeabilization Buffer durch eine 1:9 Verdünnung mit Milipore H₂O hergestellt. Davon werden jeweils 100 µl hinzugegeben und die Platte wird über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wird die 96-Well-Platte für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt und verworfen. Es werden jeweils 50 µl der Antikörperlösung zur Resuspension der Zellen hinzugegeben und diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert; die Negativkontrollen werden mit 50 µl PBS resuspendiert. Danach werden jeweils 100 µl des Permeabilization Buffer hinzugegeben und die Platte für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt und verworfen.

Zuletzt wird ein FACS Puffer hergestellt, indem PBS mit 10 % FBS und 0,02 % Natriumazid versetzt wird. Die Zellen werden in 100 µl dieses resuspendiert und in der Folge werden die durchflusszytometrischen Analysen durchgeführt.

3.2.6 Invasionstestung

Um die Invasivität der ASC- und HNSCC-Zelllinien zu untersuchen, werden verschiedene Konstellationen des Invasionsversuchs gewählt. In der folgenden Abbildung sind die verschiedenen Versuchsanordnungen dargestellt. In den vertikalen Kästen sind die Zellen genannt, welche auf ihr invasives Verhalten getestet werden und somit in die Invasions Kammer gesät werden. In den horizontalen Kästen sind die Zellen beschrieben, welche in das Well der Kulturschale ausgesät werden und somit als Attraktion dienen.

Zuerst wird die Invasivität von den ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 in Bezug auf die verschiedenen Kulturmedien, DMEM, RPMI und Xeno-Free Mesenchymal Stem Cell Medium untersucht. Anschließend wird die Invasivität der ASC-Zelllinien in Verbindung mit den Überständen der HNSCC-Zelllinien getestet. Des Weiteren in Kombination mit den HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2. Außerdem wird noch das invasive Verhalten der ASCs in Kombination mit Überständen der gleichen als auch der anderen ASC-Linie getestet; im Anschluß noch mit der gleichen als auch der anderen ASC-Zelllinie. In allen Versuchsanordnungen wird zudem der Einfluss von Bestrahlung untersucht. Schließlich wird noch die Invasivität von den HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 in einem Aufbau mit den ASC-Zelllinien getestet.

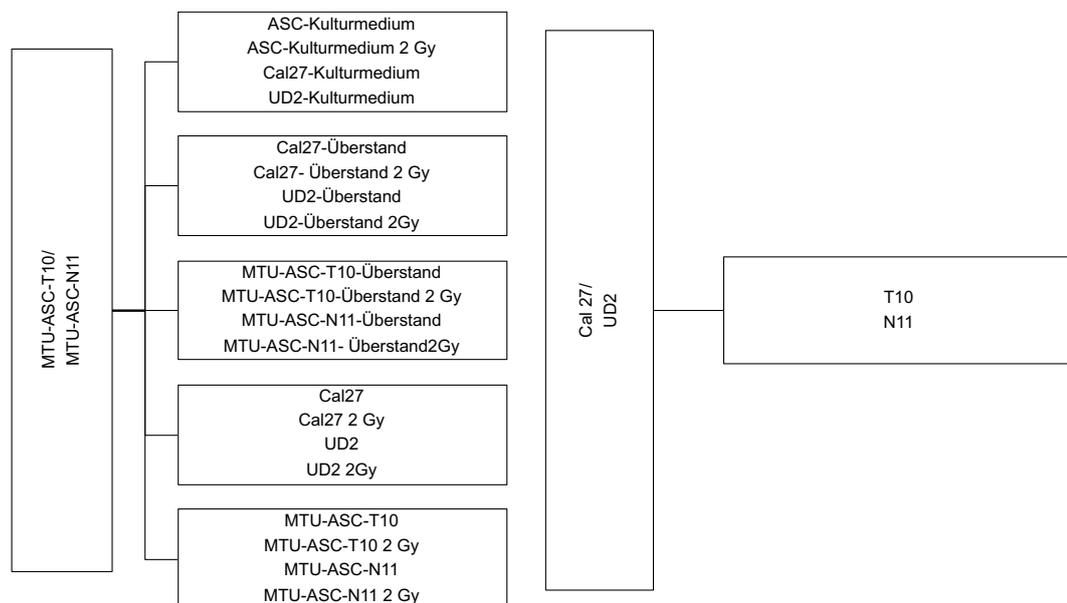


Abbildung 3: Übersicht der Kombination der Invasionstestung

Die Invasionstestungen wird anhand der Versuchs-Leitlinien von Corning durchgeführt (Corning, 2013).

Die Corning BioCoat Matrigel Invasion-Chamber wird bei -20 °C gelagert. Zuerst werden die benötigten Kammern aus dem Gefrierfach genommen und für etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend werden sowohl in das Well als auch in die Kammer jeweils 0,5 ml Medium gegeben, damit die Matrigel Membran der Invasions Kammer rehydriert wird. Dies wird für eine Stunde inkubiert. Danach wird das Medium aus dem Well und der Kammer vorsichtig abgesaugt. Je nach Versuchsaufbau wird in das Well entweder 0,5 ml von Medium, Überstand oder

einer Zellsuspension gegeben. In manchen Versuchsaufbauten werden die Zellen bereits 2 Tage vor dem eigentlichen Einsetzen der Invasionskammer in ein Well der Kulturschale ausgesät und nach einem Tag mit 2 Gy bestrahlt.

Schließlich werden die Invasionskammern vorsichtig mit einer Pinzette in ihre jeweiligen Wells eingesetzt. Eine Zellsuspension mit 5.000 Zellen pro ml wird hergestellt und 0,5 ml der Suspension werden in die Kammer pipettiert. Die Kulturschalen werden für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

In der Folge wird die Invasionskammer mit einer Pinzette entfernt und umgedreht, um das Medium aus der Kammer zu entleeren. Die nicht-invasiven Zellen auf der Oberseite der Membran werden durch vorsichtiges Reiben mit einem Wattestäbchen entfernt. Danach wird die Membran mit einem kleinen Skalpell am Rand ausgeschnitten. Die Zellen werden für 2 Minuten in 100 % Methanol fixiert. Dann werden die Zellen für 2 Minuten mit Hoechst gefärbt. Dazu werden 100 µl DPBS mit 20 µl Hoechst versetzt. Zuletzt wird die Membran in DPBS gewaschen. Die Membran wird anschließend auf einen Objektträger überführt. Durch Fluoreszenz können die Zellen nun mithilfe des Mikroskops ausgezählt werden.

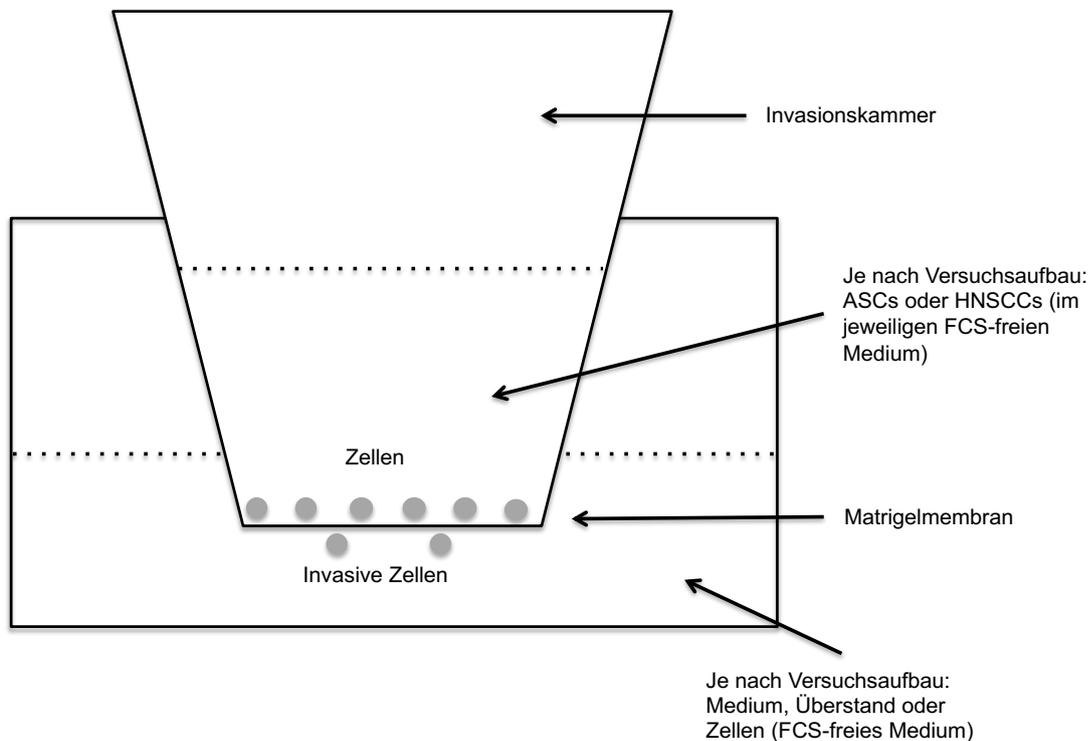


Abbildung 4: Aufbau der Invasionstestung

3.2.7 RNA-Isolation

Aus den folgenden Zellen wird RNA isoliert:

| |
|---|
| Cal27 |
| Cal27 2 Gy |
| Cal27 in Co-Kultur mit MTU-ASC-T10 |
| Cal27 2 Gy in Co-Kultur mit MTU-ASC-T10 |
| UD-SCC2 |
| UD-SCC2 2 Gy |
| UD-SCC2 in Co-Kultur mit MTU-ASC-T10 |
| UD-SCC2 2 Gy in Co-Kultur mit MTU-ASC-T10 |
| MTU-ASC-T10 |
| MTU-ASC-T10 2 Gy |
| MTU-ASC-N11 |
| MTU-ASC-N11 2 Gy |
| Cal 27 IL6 stimuliert für 12 Stunden |
| Cal 27 IL6 stimuliert für 24 Stunden |
| UD-SCC2 IL6 stimuliert für 12 Stunden |
| UD-SCC2 IL6 stimuliert für 24 Stunden |
| MTU-ASC-T10 in Co-Kultur mit Cal27 |
| MTU-ASC-T10 in Co-Kultur mit UD-SCC2 |

Tabelle 20: RNA-Isolation

Für die angegebenen Co-Kulturen wird der Versuchsaufbau der Invasionskammer gewählt, jedoch die RNA der im Well ausgesäten Zellen nach den 24 Stunden Inkubationszeit isoliert.

Die RNA-Isolation wird nach dem Qiagen RNeasy-Kit Leitfaden durchgeführt (QIAGEN, 2012).

Zuerst wird der RPE-Puffer im Verhältnis 1:5 mit 100 % Ethanol gemischt und außerdem der RLT-Puffer mit 1 % β -Mercaptoethanol versetzt um einen Lyse Puffer zu erhalten. Das Medium wird vorsichtig abgesaugt und die Zellen werden einmalig mit DPBS gewaschen. Anschließend wird der Lyse Puffer hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert; pro 6-Well werden 350 μ l und pro 24-Well 50 μ l des Lyse Puffers hinzugegeben. Je nach Well Größe werden die Zellen

entweder mithilfe eines kleinen Zellschabers oder der Rückseite einer Pipettenspitze vom Schalenboden gelöst, wodurch man ein schleimiges Lysat erhält. Dieses wird in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit einem Volumen 70 % Ethanol gut durchmischt, bis keine Schlieren mehr erkennbar sind. Maximal 700 µl des Lysat-Ethanol-Gemischs werden auf eine Spin Column pipettiert und für 15 Sekunden bei 1200 rpm zentrifugiert. Der abzentrifugierte Überstand wird verworfen. Anschließend werden 700 µl des RW1-Puffers auf die Spin Column pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auch dieses wird für 15 Sekunden bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Danach werden 500 µl RPE Puffer auf die Spin Column pipettiert, dieses wieder für 15 Sekunden bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand ebenso verworfen. Nun wird ein zweites Mal 500 µl RPE Puffer auf die Spin Column pipettiert und dieses für 1 Minute bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand auch verworfen. Zuletzt werden 100 µl bei RNA-Isolation aus einem 6-Well bzw. 28 µl bei Isolation aus einem 24-Well, DPEC-Wasser auf die Spin Column pipettiert und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Mal wird für 1 Minute bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Eluat erhält die isolierte RNA und wird bei -20 °C gelagert.

3.2.8 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Mit Hilfe des PeqLab NanoDrop Geräts kann die Konzentration und die Qualität der isolierten Nukleinsäuren in Form von RNA bestimmt werden.

Das Gerät wird mit 1 µl Aqua dest. initialisiert und folgend wird nach der Geräteanleitung die RNA-Menge pro Mililiter bestimmt. Außerdem wird der Reinheitsgrad der Probe mittels OD ermittelt, welcher im Verhältnis von OD260/OD280 angegeben wird.

3.2.9 cDNA-Sythese

Um cDNA aus der isolierten RNA zu synthetisieren, wird als erstes ein RNA-Mix hergestellt, indem die Bestandteile zusammen auf Eis pipettiert werden.

Der RNA-Mix besteht aus Folgendem:

| Reagenz | Volumen | Konzentration |
|--------------|-----------|---------------|
| RNA | x μ l | 250 ng |
| 10x Hexamere | 1 μ l | 1x |
| 10 mM dNTP's | 1 μ | 0,2 mM |
| Aqua dest. | x μ l | |

Tabelle 21: RNA-Mix

Der fertige RNA-Mix, mit einem Gesamtvolumen von 14,5 μ l, wird für 5 Minuten bei 65 °C im Heizblock inkubiert. In der Zwischenzeit wird ein Enzym-Mix hergestellt.

Der Enzym-Mix besteht aus Folgendem:

| Reagenz | Volumen | Konzentration |
|--------------|-------------|---------------|
| Enzym | 1 μ l | 200 Unit |
| 5x RT Puffer | 4 μ l | 1x |
| Aqua dest. | 0,5 μ l | |

Tabelle 22: Enzym-Mix

Der fertige Enzym-Mix, mit einem Gesamtvolumen von 5,5 μ l, wird zum RNA-Mix pipettiert. Dieser wird erst für 10 Minuten bei 25 °C und dann für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert. Anschließend wird eine Enzymaktivierung für 5 Minuten bei 85 °C durchgeführt. Das Eluat enthält die cDNA und wird entweder bei -20 °C gelagert oder unmittelbar für die PCR verwendet.

3.2.10 Quantitative Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR dient zur Vervielfältigung bestimmter Genabschnitte und Bestimmung der Expression der RNA.

Für die Amplifikation werden folgende Primer verwendet:

| Name | Primersequenz | |
|----------|---------------|-----------------------|
| IL-6 | Forward | GTCAGGGGTGGTTATTGCAT |
| | Reverse | AGTGAGGAACAAGCCAGAGC |
| IL-24 | Forward | TAACAGCTCTCAGCATCCGA |
| | Reverse | GCCCTCAAGCATCACTTCCAG |
| IL-20RB | Forward | ACTGGGCTCCACACTAAGAG |
| | Reverse | TTCATGTGGTTTTTCTACGCA |
| IL-20RA | Forward | GGTTTAGGCAAACCACCAGA |
| | Reverse | CGACATGTGACCCAGCC |
| IL-22RA1 | Forward | CAAATCATGATGGTGCCAAG |
| | Reverse | GTCAACCGCACCTACCAAAT |

Tabelle 23: Primer für die PCR

Zuerst wird ein PCR-Master-Mix hergestellt, der aus Folgendem besteht hergestellt:

| Reagenz | Volumen | Endkonzentration |
|------------------------|---------|------------------|
| Aqua dest. | 9,5 µl | |
| 2x SYBR Master Mix | 12,5 µl | 1x |
| Primer forward 20 pmol | 0,5 µl | 0,4 pmol |
| Primer reverse 20 pmol | 0,5 µl | 0,4 pmol |
| Template 50 ng | 2 µl | 100 ng |

Tabelle 24: PCR-Master-Mix

Der fertige PCR-Master-Mix, mit einem Gesamtvolumen von 23 µl, wird in ein Well einer 96-Well-Kulturschale pipettiert. Dazu werden 100 ng der cDNA pipettiert und beides gut durchgemischt. Die Platte wird mit Folie verklebt und zum nochmaligen Durchmischen im Programm „short run“ zentrifugiert.

Anschließend wird folgendes PCR-Programm im Thermocycler CFX96 von BioRad zur Amplifikation verwendet:

| Temperatur | Zeit |
|--------------------------|--------------------------|
| 95 °C | 15 Minuten |
| 95 °C | 30 Sekunden |
| Annealing (60 °C) | 30 Sekunden |
| 72 °C | 30 Sekunden + Plate read |
| GOTO 2 44 mal | |
| Melt curve 75 °C – 95 °C | 5 Sekunden + Plate read |

Tabelle 25: PCR-Programm

3.2.11 Crystal-Violett-Proliferations-Assay

Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 wird der Crystal-Violett Proliferations Assay gewählt. In diesem Versuch wird zusätzlich der Einfluss des Interleukins 6 (IL-6) auf die Proliferation der HNSCCs getestet.

Durch Zugabe von 5 µl bzw. 12,5 µl IL-6 zu 50 ml der Kulturmedien der HNSCC-Zelllinien, DMEM und RPMI, erhält man 10 pg- bzw. 25 pg-haltiges IL-6-Kulturmedium zur Stimulation der HNSCC-Zelllinien UD-SCC2 und Cal27.

Die UD-SCC2- und Cal27-Zellen werden aus einer 80 % konfluenten Zellkulturschale abgelöst, die Zellzahl ermittelt und eine Zellsuspension unter Gebrauch von IL-6-Kulturmedium hergestellt, sodass 5.000 Zellen UD-SCC2 pro ml bzw. 1.000 Zellen Cal27 pro ml erhalten werden. Je 0,5 ml dieser Lösung werden in ein Well einer 24-Well-Kulturschale in Duplets in einem doppelten Ansatz pipettiert.

Der folgende Versuchsablauf wird zu den Zeitpunkten 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 Stunden wiederholt, damit eine Verlaufsbeobachtung bezüglich des Proliferationsverhaltens getroffen werden kann.

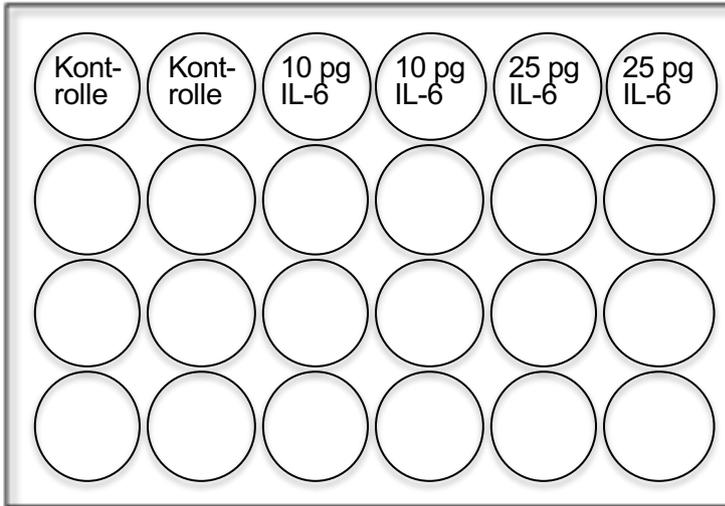


Abbildung 5: Plattenbelegung des Crystal-Violet-Proliferationsessays unter IL-6-Stimulation

Das Medium wird abgesaugt und 500 µl einer 4 %-igen Formaldehydlösung pro Well hinzugegeben. Dies wird für 5 Minuten inkubiert und dann vorsichtig abgesaugt. Anschließend werden 500 µl einer 0,1 %-igen Triton-X100 Lösung pro Well pipettiert, die Zellkulturplatte geschwenkt und dieses vorsichtig abgesaugt. Danach werden 500 µl einer 0,04 %-igen Crystal-Violett-Lösung pro Well hinzugegeben, für 10 Minuten inkubiert und vorsichtig abgesaugt; Crystal-Violett färbt als Lebendfarbstoff alle vitalen Zellen in der Zellkulturplatte an. Es folgen zwei Waschschriffe, in welchen 500 µl Aqua dest. pro Well pipettiert werden, die Zellkulturplatte geschwenkt wird und dieses wieder abgesaugt wird. Anschließend werden 500 µl einer 1 %-igen SDS-Lösung pro Well gegeben und die Zellkulturplatte wird für 20 Minuten auf dem Plattenrüttler inkubiert; SDS führt zu einer Lysierung der Zellen.

Die erhaltene Lösung wird für die Extinktionsmessung im ELISA in eine 96-Well-Zellkulturplatte umpipettiert. Dazu werden jeweils 100 µl nebeneinander, in Form von Triplets, in die Wells der 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert. Der Farbumschlag im Vergleich zu einer Referenzmessung ergibt die Extinktionswerte, wodurch eine Aussage zur Proliferation getroffen werden kann.

3.2.12. Statistik

Die Auswertung und Darstellung der Versuchsergebnisse sowie die Berechnung des p-Wertes wird mittel Graph Pad Prism 7 durchgeführt. Zudem wird ebenfalls mit Graph Pas Prism 7 die Ermittlung der statistischen Signifikanz durchgeführt.

Die statistische Auswertung basiert bei allen Versuchen auf paarigen Ansätzen in doppelter Durchführung; zudem werden die Auszählungen der Invasionsversuche doppelt gezählt. In Rücksprache mit PD Dr. Haller des Instituts für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TUM wird sich für die Anwendung des t-Testes für Mittelwerte unabhängiger Stichproben entschieden. Aufgrund des explorativen Charakters der Versuche wird kein multiples Testen verwendet (Bender, Lange, & Ziegler, 2007). Mit Hilfe des ungepaarten t-Tests mit einem 95 % Konfidenzintervall wird die Signifikanz errechnet. In folgender Tabelle werden die Definitionen der einzelnen Signifikanzniveaus dargestellt.

| p-Wert | Signifikanzniveau |
|--------------|--------------------------|
| $p > 0,05$ | Nicht signifikant, ns |
| $p < 0,05$ | Signifikant, * |
| $p < 0,01$ | Sehr signifikant, ** |
| $p < 0,001$ | Hoch signifikant, *** |
| $p < 0,0001$ | Höchst signifikant, **** |

Tabelle 26: Definition des Signifikanzniveaus

4. Ergebnisse

4.1. ASC-Charakterisierung

Zum Untermauern der Stammzeleigenschaften der isolierten ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 werden diese mittels Differenzierungsverfahren sowie Durchflusszytometrie charakterisiert.

4.1.1 ASC-Differenzierung

Mit den zuvor beschriebenen ASC-Differenzierungsverfahren werden die ASC-Zelllinien entsprechend der Kriterien der ISCT in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten differenziert. Im Anschluss an den Differenzierungsprozess werden die Zellen mithilfe der entsprechenden histologischen Färbungen dargestellt. Zum Beweis der erfolgten adipogenen Differenzierung wird die Öl-Rot-Färbung ausgewählt, die osteogene Differenzierung wird mittels der Alizarin-Rot-Färbung bewiesen und im Anschluss an die abgeschlossene chondrogene Differenzierung wird eine Alcian-Blau-Färbung der Spheroide durchgeführt.

Zur objektiven Beurteilung der histologischen Färbungen wird zusätzlich zu den mit Differenzierungsmedium behandelten Zellen in doppeltem Ansatz eine Negativkontrolle angefärbt, welche während des Differenzierungsprozesses nicht mit Differenzierungsmedium behandelt wird.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Differenzierungen sowie der Negativkontrollen visuell dargestellt.

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen die erfolgte Öl-Rot-Färbung nach abgeschlossener adipogener Differenzierung der zwei ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 in zwanzigfacher Vergrößerung. Im Laufe des Differenzierungsprozesses wandeln sich die spindelförmigen Präadipozyten, wie in Abbildung 6 zu erkennen, in multilokuläre Zellen mit Lipidtropfen um. Diese stellen sich in der Öl-Rot-Färbung als leuchtend rot-orange gefärbte kugelige Tropfen innerhalb der ausgereiften Adipozyten dar, deren Inhalt aus Triglyceriden besteht. In der Zellkulturschale erkennt man Bereiche mit vielen konzentrierten ausgereiften lipidhaltigen Adipozyten, wohingegen dazwischen bzw. in anderen Bereichen der Zellkulturschale mehr undifferenzierte Präadipozyten oder untergegangene Zellen enthalten sind.

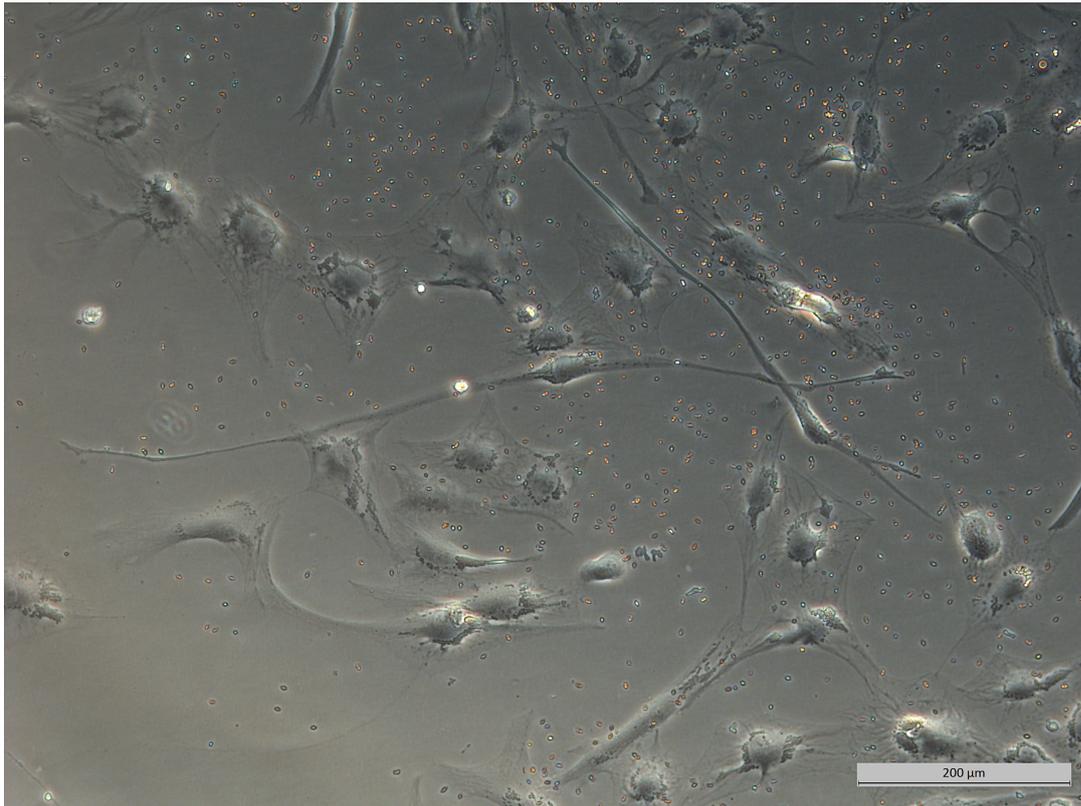


Abbildung 6: MTU-ASC-T10 am 6. Tag der adipogenen Differenzierung in zehnfacher Vergrößerung

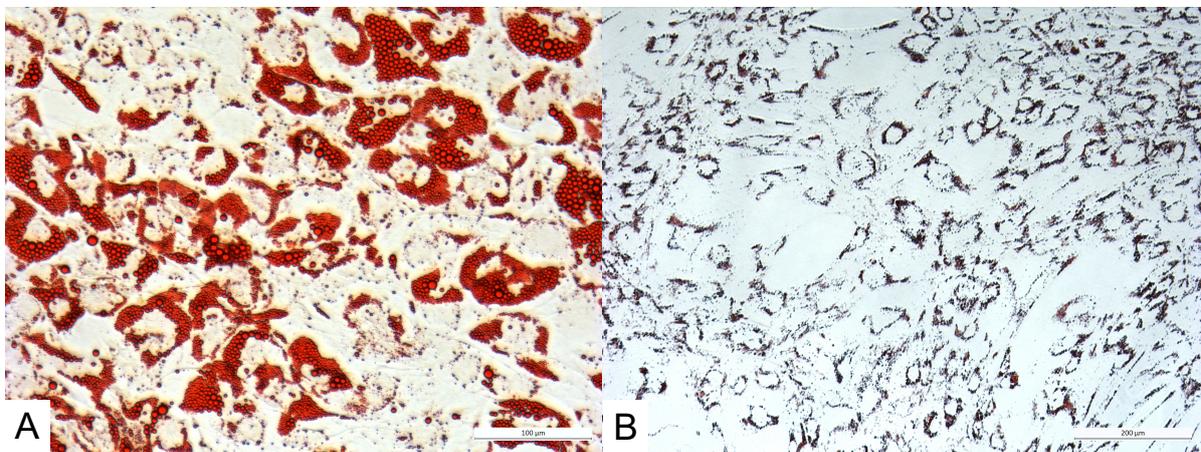


Abbildung 7: Öl-Rot-Färbung von MTU-ASC-T10 nach adipogener Differenzierung
 A: zwanzigfache Vergrößerung; B: negative Versuchskontrolle

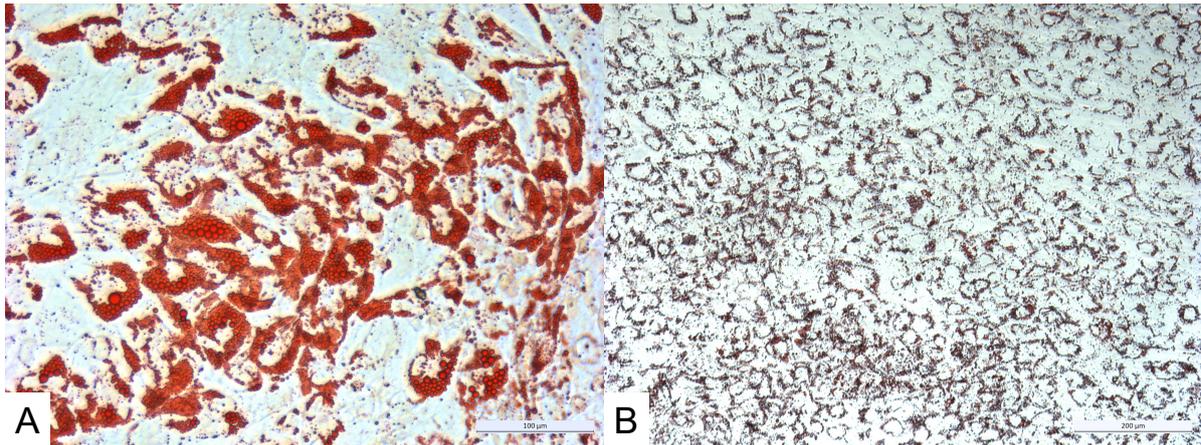


Abbildung 8: Öl-Rot-Färbung von MTU-ASC-N11 nach adipogener Differenzierung
 A: zwanzigfache Vergrößerung; B: negative Versuchskontrolle

Durch die Alizarin-Rot-Färbung wird die Mineralisationsfähigkeit, im Sinne von gebildeten Kalziumphosphateinlagerungen der ausdifferenzierten Osteoblasten dargestellt. Die Abbildungen 9 und 10 zeigen, die durch die Osteoblasten großflächig gebildeten Auflagerungen, welche durch Alizarin-Rot rot sichtbar angefärbt werden. Diese Auflagerungen breiten sich im Sinne eines 3D-förmigen Konstruktes mit zunehmenden Verbindungen und Auflagerungen aus, welche unter dem Mikroskop deutlich sichtbar werden. Es zeigen sich anfangs Bereiche mit netzartig angeordnetem Mineral, welche sich mit der Zeit in ein dicht gepacktes Gebilde umbauen.

In der osteogenen Differenzierung von MTU-ASC-T10, dargestellt in Abbildung 9, zeigt sich ein netzartiges Gebilde aus Mineral, welches konstant miteinander verwoben ist. Dahingegen zeigt die Differenzierung von MTU-ASC-N11, dargestellt in Abbildung 10, ein eher dicht miteinander verschmolzenes Mineral. Dies weist einerseits daraufhin, dass die Differenzierung von MTU-ASC-N11 am gleichen Tag bereits weiter fortgeschritten ist und andererseits, dass die Matrix differenzierter Osteoblasten, welche aus MTU-ASC-N11 differenziert wurden, einen höheren Kalziumgehalt besitzt.

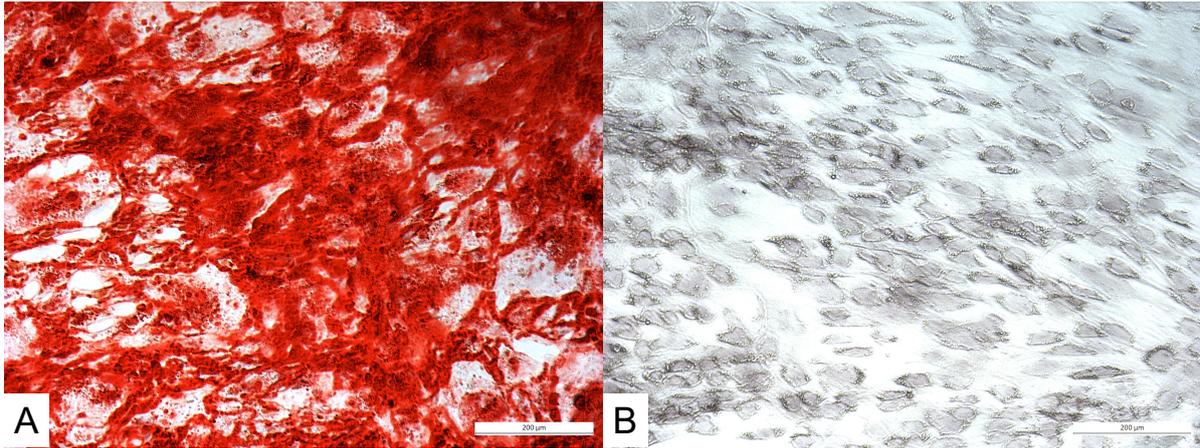


Abbildung 9: Alizarin-Rot-Färbung von MTU-ASC-T10 nach osteogener Differenzierung
 A: zehnfache Vergrößerung; B: negative Versuchskontrolle

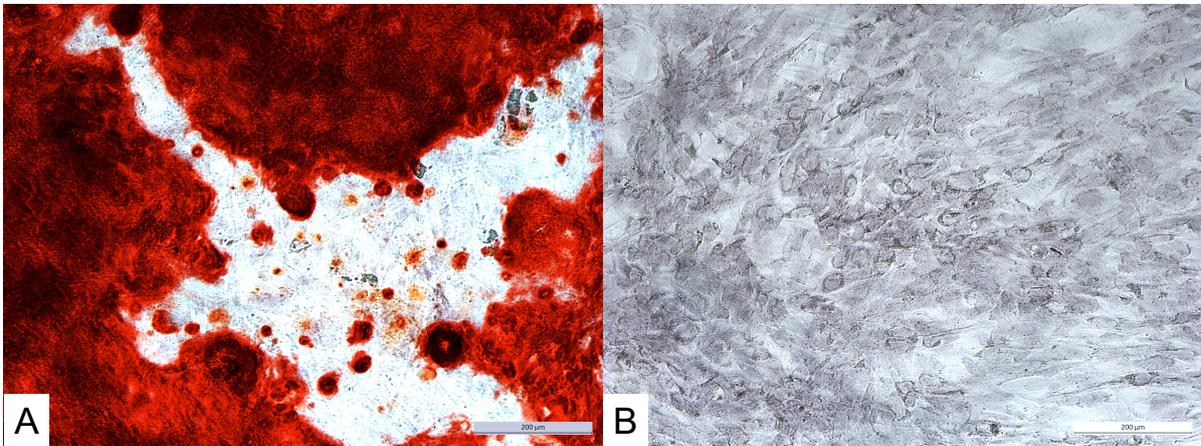


Abbildung 10: Alizarin-Rot-Färbung von MTU-ASC-N11 nach osteogener Differenzierung
 A: zehnfache Vergrößerung; B: negative Versuchskontrolle

Für die chondrogene Differenzierung der ASC-Zelllinien werden Spheroide der ASCs gebildet, welche sich durch den Zusatz von Differenzierungsmedium in chondrozytenhaltige Spheroide differenzieren. Die Spheroide der negativen Versuchskontrolle, welche ausschließlich mit ASC-Kulturmedium XF behandelt werden, zerfallen im Laufe des Differenzierungsprozesses der anderen Spheroide, wodurch zum Zeitpunkt der Alcian-Blau-Färbung nur vereinzelte Präadipozyten im Well adhären sind.

Die ausdifferenzierten Chondrozyten-Spheroide werden mit Alcian-Blau eingefärbt, um die eingelagerten Proteoglykane sichtbar zu machen. Die Spheroide färben sich stark blau an, wie in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt ist.

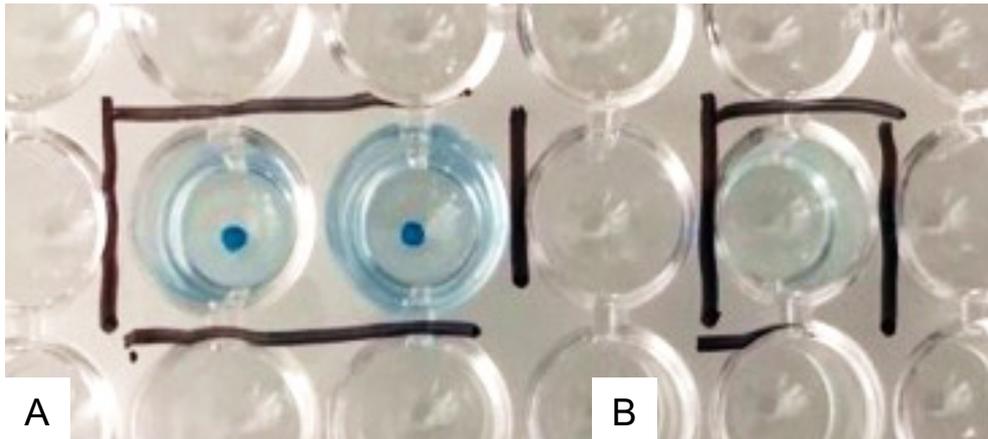


Abbildung 11: Alcian-Blau-Färbung von MTU-ASC-T10 nach chondrogener Differenzierung
 A: positives Versuchsergebnis; B: negative Versuchskontrolle

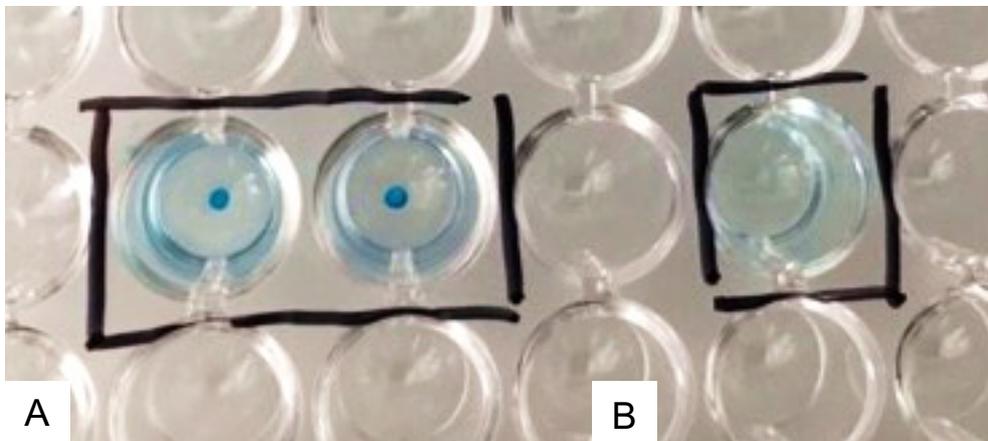


Abbildung 12: Alcian-Blau-Färbung von MTU-ASC-N11 nach chondrogener Differenzierung
 A: positives Versuchsergebnis; B: negative Versuchskontrolle

Die ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 sind beide in der Lage sich in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten zu differenzieren, womit sie die geforderten Differenzierungskriterien für Stammzellen der ISCT erfüllen. Die zwei untersuchten Zelllinien zeigen zueinander keine Unterschiede in ihren Differenzierungseigenschaften sowie ihrer Kultivierbarkeit, weshalb sie für eine Vergleichbarkeit mittels der folgenden Versuche geeignet sind.

4.1.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Vervollständigung der Charakterisierung der isolierten ASCs, werden diese mittels FACS (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung bzw. Durchflusszytometrie) auf die Expression der geforderten Stammzellmarker, CD90, CD105, CD73 und Negativität von HLA-DR untersucht.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 13, 14, 15 und 16 dargestellt und zeigen, dass die ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10 CD90 positiv, CD73 positiv, CD105 positiv und HLA-DR negativ ist.

In Abbildung 13 zeigt sich, dass sich zwei Populationen der MTU-ASC-T10 bilden, wovon lediglich 43,2 % der Events eine Positivität für CD90 aufweisen. Die Positivität für CD73 ist mit 92,5 % der Events in Abbildung 14 und die Positivität für CD105 mit 99,3 % der Events in Abbildung 15 ist dagegen eindeutiger. Auch die Negativität für HLA-DR ist mit 98,5 % der Events in Abbildung 16 deutlich zu erkennen.

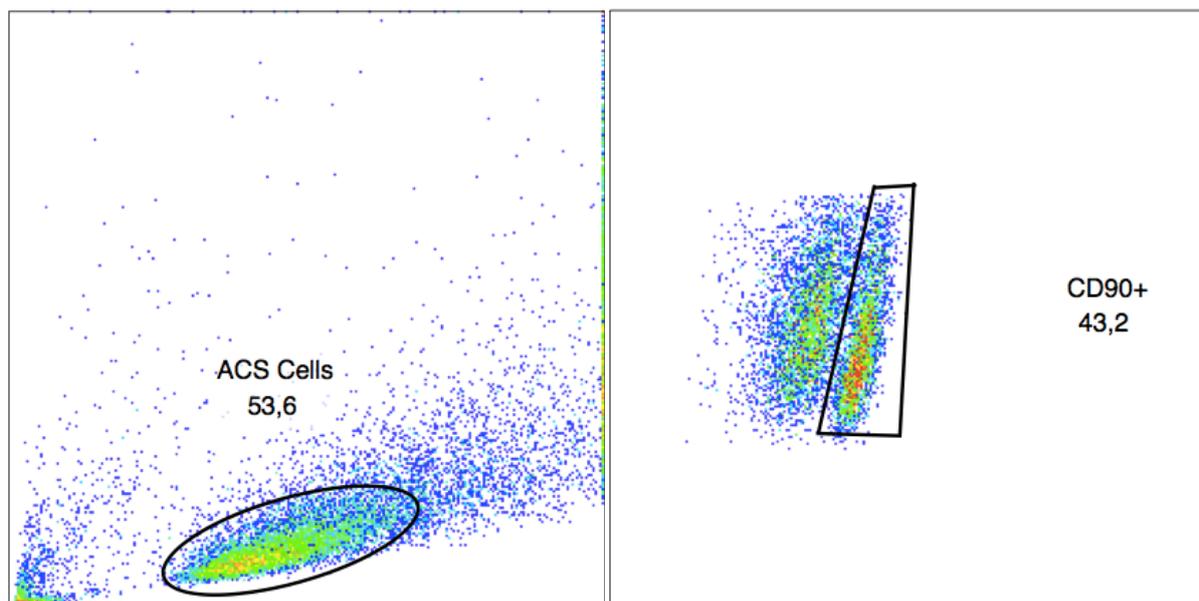


Abbildung 13: FACS der ASCS-Zelllinie MTU-ASC-T10 für CD90

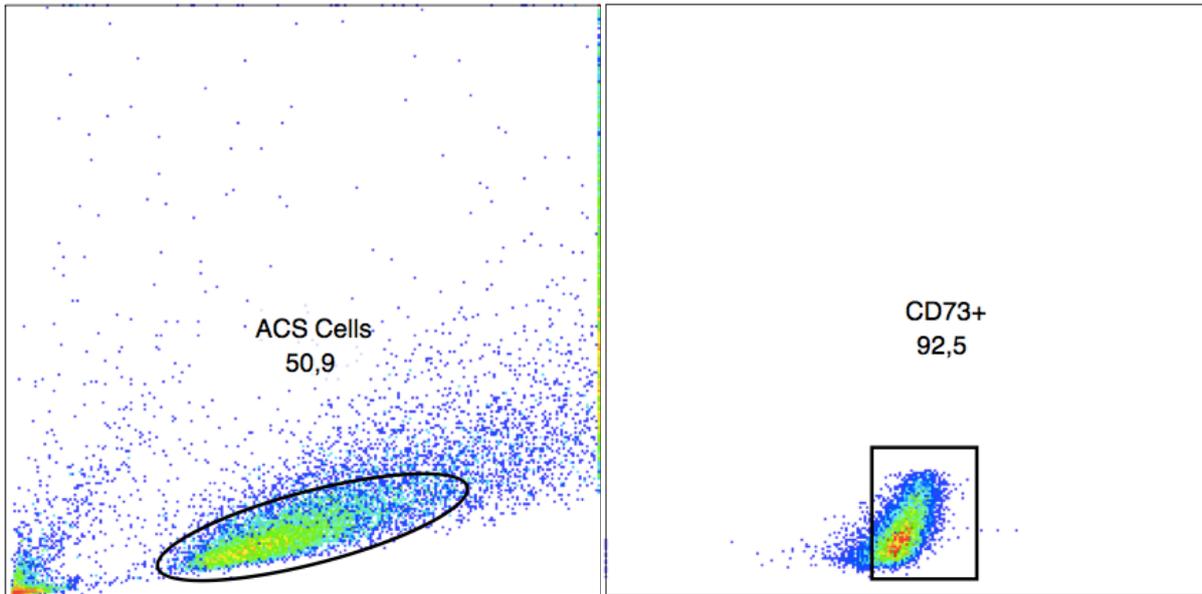


Abbildung 14: FACS der ASCS-Zelllinie MTU-ASC-T10 für CD73

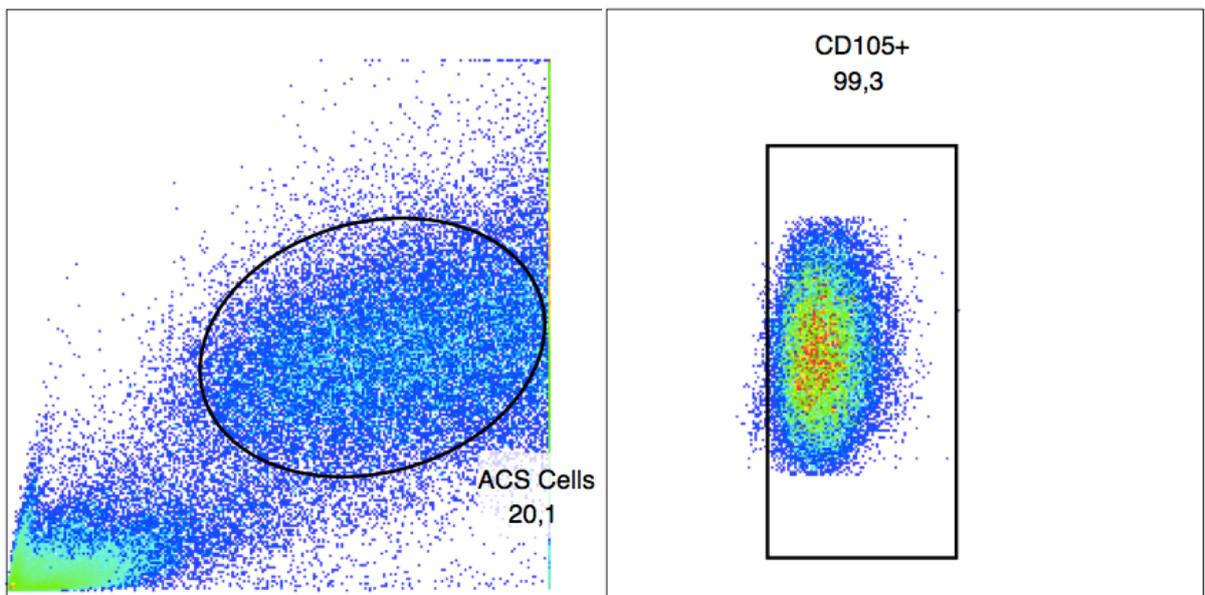


Abbildung 15: FACS der ASCS-Zelllinie MTU-ASC-T10 für CD105

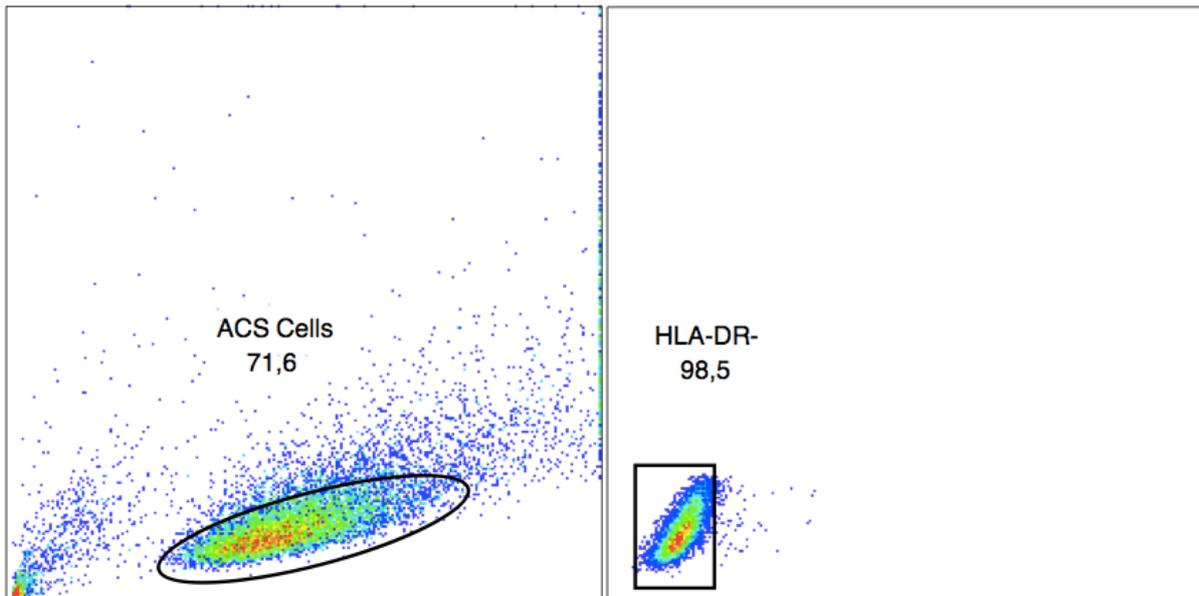


Abbildung 16: FACS der ASCS-Zelllinie MTU-ASC-T10 für HLA-DR

Es zeigt sich, dass die isolierten ASC-Zelllinien die Kriterien der MSCs erfüllen: sie sind unter Standard-Kulturbedingungen adhärent an Plastik, zeigen sich in der FACS CD90+, CD73+, CD105+, HLA-DR- und lassen sich zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenzieren.

4.2 Invasionsverhalten der ASCs

Zur Testung des Invasionsverhaltens der ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 sowie zuletzt auch der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2, werden unterschiedlichste Kombinationen des Invasionsaufbaus gewählt. Die Versuche werden jeweils in einem doppelten Ansatz durchgeführt und zudem werden die am Schluss erfolgten Auszählungen der invadierten Zellen doppelt durchgeführt. Der Zeitraum der Invasionstestungen beträgt 24 Stunden. Die Invasionstestungen werden ausschließlich mit Serum-freien Supplementen durchgeführt.

Zunächst wird das Invasionsverhalten der ASC-Zelllinien in Bezug auf ihr eigenes Medium XF sowie die Medien der HNSCC-Zelllinien DMEM und RPMI getestet, um eine mögliche Beeinflussung des Invasionsverhaltens durch die Medien selbst zu evaluieren. Zudem wird der Versuch mit XF durchgeführt, welches mit 2 Gy bestrahlt wird, da in den späteren Versuchsaufbauten auch Bestrahlung der verschiedenen Zelllinien eingesetzt wird. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 und Tabelle 27

dargestellt. Durch diesen Versuchsaufbau soll eine starke Invasion der ASCs durch die Medien ausgeschlossen werden, um in den späteren Versuchsaufbauten die Invasivität der ASCs in Bezug auf Überstände bzw. Zelllinien klar beurteilen zu können.

Es zeigt sich, dass XF zu der höchsten Invasivität der ASCs unter den Kulturmedien führt und sowohl bei MTU-ASC-T10 als auch MTU-ASC-N11 gegenüber der Invasivität in Bezug auf DMEM und RPMI signifikant erhöht ist. Die Unterschiede der verstärkten Invasivität in Bezug auf XF gegenüber DMEM und RPMI sind bei MTU-ASC-T10 hoch bzw. höchst signifikant, wohingegen sie bei MTU-ASC-N11 lediglich signifikant sind. Zudem zeigt sich bei MTU-ASC-T10 interessanterweise eine hoch signifikant verminderte Invasivität bei XF, welches mit 2 Gy bestrahlt wurde.

| | | MTU-ASC-T10 | MTU-ASC-N11 |
|------|---------|--------------------|----------------|
| XF | XF 2 Gy | p = 0,004 (***) | p = 0,0822 |
| DMEM | RPMI | p = 0,1436 | p = 0,1154 |
| XF | DMEM | p = 0,0003 (***) | p = 0,0249 (*) |
| XF | RPMI | p = <0,0001 (****) | p = 0,0412 (*) |

Tabelle 27: Mittels t-Test für unabhängige Stichproben errechnete p-Werte der Invasionstestung der ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 in einem Versuchsaufbau mit den Kulturmedien XF, XF bestrahlt mit 2 Gy, DMEM und RPMI

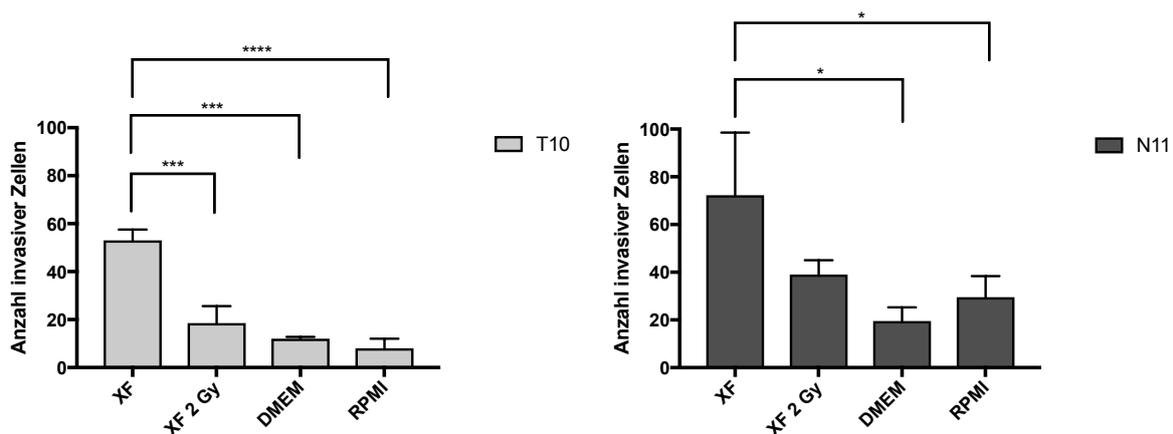


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Invasionstestungen der ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 in einem Versuchsaufbau mit den Kulturmedien XF, XF bestrahlt mit 2 Gy, DMEM und RPMI; die p-Wert-Berechnung erfolgt mittels t-Test für unabhängige Stichproben

Es folgen die Invasivitätstestungen der ASCs in Bezug auf die Überstände der HNSCC-Zelllinien sowie in Bezug auf die HNSCC-Zelllinien selbst. Zudem derselbigen in Kombination mit einer Bestrahlung von 2 Gy. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 sowie den Abbildungen 18 und 19 dargestellt.

| | | MTU-ASC-T10 | MTU-ASC-N11 |
|-------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
| Cal27-Überstand | Cal27-Überstand 2 Gy | p = 0,1441 | p = 0,0079 (**) |
| UD-SCC2-Überstand | UD-SCC2-Überstand 2 Gy | p = <0,0001 (****) | p = 0,1407 |
| Cal27 | Cal27 2 Gy | p = 0,0670 | p = 0,0001 (***) |
| UD-SCC2 | UD-SCC2 2 Gy | p = 0,3542 | p = 0,0032 (**) |
| Cal27 | Cal27-Überstand | p = 0,0521 | p = <0,0001 (****) |
| UD-SCC2 | UD-SCC2-Überstand | p = 0,0002 (***) | p = <0,0001 (****) |
| Cal27 2 Gy | Cal27-Überstand 2 Gy | p = 0,0002 (***) | p = 0,0005 (***) |
| UD-SCC2 2 Gy | UD-SCC2-Überstand 2 Gy | p = 0,0020 (**) | p = 0,0003 (***) |
| UD-SCC2 | Cal27 | p = <0,0001 (****) | p = 0,0737 |
| UD-SCC2 2 Gy | Cal27 2 Gy | p = 0,0042 (**) | p = 0,0031 (**) |

Tabelle 28: Mittels t-Test für unabhängige Stichproben errechnete p-Werte der Invasionstestung der ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 in einem Versuchsaufbau mit den Überständen der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 sowie der Zelllinien Cal27 und UD-SCC2, zudem in Kombination mit Bestrahlung der selbigen mit 2 Gy

Es zeigt sich, dass die Invasivität von MTU-ASC-T10 in Bezug auf die Überstände der HNSCC-Zelllinien weit niedriger ist als in Bezug auf die HNSCC-Zellen. Dies leitet zu der Annahme, dass die Zellen Lockstoffe sezernieren, welche entweder in den Überständen zugrunde gehen oder nur von HNSCCs gebildet werden, während diese sich in der Co-Kultur mit den ASC-Zelllinien befinden. Die Invasivität von

MTU-ASC-T10 gegenüber UD-SCC2 sowie UD-SCC2 bestrahlt mit 2 Gy ist hoch bzw. stark signifikant erhöht gegenüber dem gleichen Aufbau in Bezug auf die Überstände von UD-SCC2.

Die Bestrahlung der Überstände mit 2 Gy führt zu einer verminderten Invasivität von MTU-ASC-T10. Bestrahlung der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 scheint hingegen keinen eindeutigen Effekt zu haben, da die Invasivität von MTU-ASC-T10 durch eine Bestrahlung von Cal27 erniedrigt wird, wohingegen sie durch eine Bestrahlung von UD-SCC2 erhöht wird.

Die Invasivität von MTU-ASC-T10 ist in Bezug auf UD-SCC2 gegenüber der Invasivität zu Cal27 höchst signifikant erhöht und in Bezug auf UD-SCC2 mit 2 Gy bestrahlt gegenüber Cal27 mit 2 Gy bestrahlt sehr signifikant erhöht.

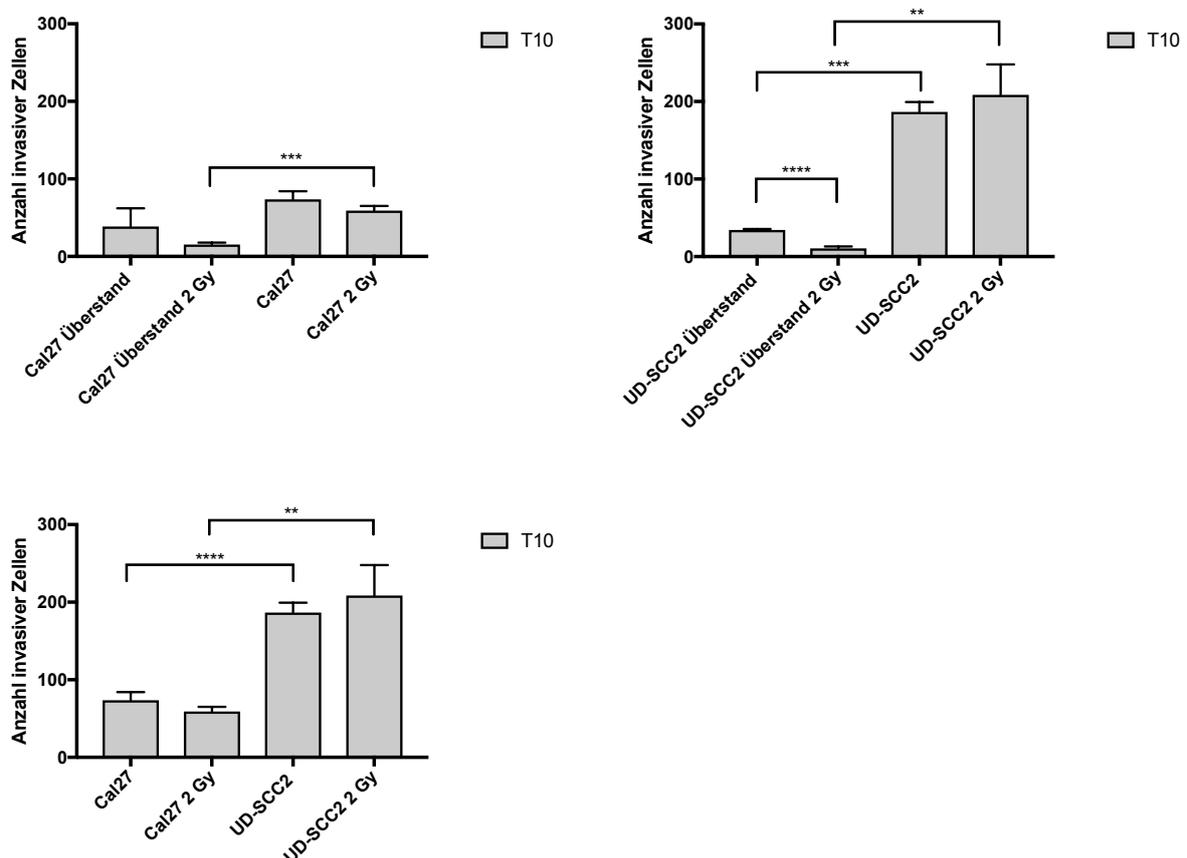


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Invasionstestungen der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10 in einem Versuchsaufbau mit den Überständen der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 sowie den Zelllinien Cal27 und UD-SCC2, zudem in Kombination mit Bestrahlung derselben mit 2 Gy; die p-Wert-Berechnung erfolgt mittels t-Test für unabhängige Stichproben

Wie zuvor schon bei MTU-ASC-T10 illustriert, zeigt sich ebenso bei MTU-ASC-N11 eine hoch bis höchst signifikant erhöhte Invasivität in einem Versuchsaufbau der HNSCC-Zellen im Gegensatz zu den HNSCC-Überständen. Es wird vermutet, dass die HNSCC-Zelllinien einen invasions- bzw. migrationsfördernden Effekt auf die ASCs haben, indem sie noch ungeklärte parakrine Mechanismen besitzen bzw. noch unbekannte Stoffe sezernieren.

Der Effekt der Bestrahlung der Zellen sowie der Überstände mit 2 Gy lässt sich nicht eindeutig ermitteln. Die Bestrahlung der Überstände von Cal27 führt zu einer sehr signifikant erhöhten Invasivität von MTU-ASC-N11, während die Bestrahlung der Überstände von UD-SCC2 zu einer nicht signifikant verminderten Invasivität führt. Die mit 2 Gy bestrahlten Cal27 führen zu einer hoch signifikant verminderten Invasivität von MTU-ASC-N11, wohingegen die Bestrahlung von UD-SCC2 mit 2 Gy zu einer sehr signifikant erhöhten Invasivität führt.

Das unterschiedliche Invasionsverhalten von MTU-ASC-N11 in Bezug auf die zwei HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 zeigt keinen so deutlichen Unterschied wie das Verhalten von MTU-ASC-T10 zuvor. Lediglich die Invasivität von MTU-ASC-N11 im Versuchsaufbau mit 2 Gy bestrahlten UD-SCC2 ist stark signifikant erhöht gegenüber den mit 2 Gy bestrahlten Cal27.

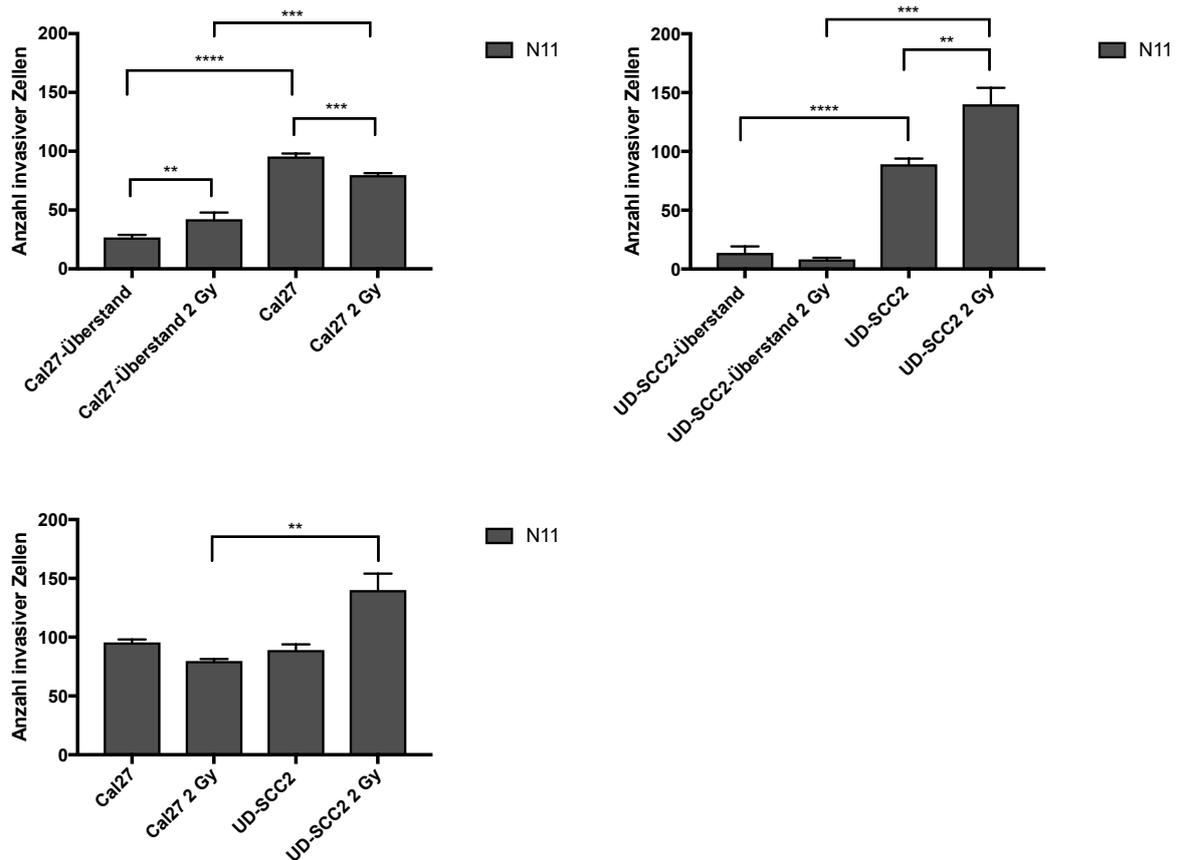


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Invasionstestung der ASC-Zelllinie MTU-ASC-N11 in einem Versuchsaufbau mit den Überständen der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 sowie den Zelllinien Cal27 und UD-SCC2, zudem in Kombination mit Bestrahlung derselbigen mit 2 Gy; die p-Wert-Berechnung erfolgt mittels t-Test für unabhängige Stichproben

Folgend wurde das Invasionsverhalten der ASC-Zelllinien in einem Versuchsaufbau mit dergleichen sowie der anderen ASC-Zelllinie und deren Überständen ermittelt. Abermals wurden diese zusätzlich mit 2 Gy bestrahlt. Tabelle 29 und die Abbildungen 20 und 21 illustrieren die Ergebnisse.

| | | MTU-ASC-T10 | MTU-ASC-N11 |
|-----------------------|----------------------------|------------------|---------------------|
| MTU-ASC-T10-Überstand | MTU-ASC-T10-Überstand 2 Gy | p = 0,0060 (**) | p = 0,0119 (*) |
| MTU-ASC-N11-Überstand | MTU-ASC-N11-Überstand 2 Gy | p = 0,0465 (*) | p = 0,0009 (***) |
| MTU-ASC-T10 | MTU-ASC-T10 2 Gy | p = 0,0135 (*) | p = 0,7032 |
| MTU-ASC-N11 | MTU-ASC-N11 2 Gy | p = 0,3852 | p = 0,0343 (*) |
| MTU-ASC-T10 | MTU-ASC-T10-Überstand | p = 0,0063 (**) | p = < 0,0001 (****) |
| MTU-ASC-N11 | MTU-ASC-N11-Überstand | p = 0,0006 (***) | p = 0,1009 |
| MTU-ASC-T10 2 Gy | MTU-ASC-T10-Überstand 2 Gy | p = 0,0768 | p = 0,2016 |
| MTU-ASC-N11 2 Gy | MTU-ASC-N11-Überstand 2 Gy | p = 0,0291 (*) | p = 0,0239 (*) |
| MTU-ASC-T10 | MTU-ASC-N11 | p = 0,0125 (*) | p = 0,0597 |
| MTU-ASC-T10 2 Gy | MTU-ASC-N11 2 Gy | p = 0,3628 | p = 0,0972 |

Tabelle 29: Mittels t-Test für unabhängige Stichproben errechnete p-Werte der Invasionstestung der ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 in einem Versuchsaufbau mit den Überständen der zwei ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 sowie dieser selbst, zudem in Kombination mit Bestrahlung derselbigen mit 2 Gy

Die Invasivität von MTU-ASC-T10 in Bezug auf die Überstände der ASC-Zelllinien ist weniger stark als in Bezug auf die Zelllinien selbst. Der Versuchsaufbau mit MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 zeigt eine stark bis hoch signifikant erhöhte Invasivität im Gegensatz zu dem Aufbau mit deren Überständen. Zudem ist die Invasivität in Bezug auf MTU-ASC-N11 bestrahlt mit 2 Gy signifikant erhöht im Gegensatz zu dem Versuchsaufbau mit dem Überstand von MTU-ASC-N11 mit 2 Gy bestrahlt.

Werden die Überstände der ASCs mit 2 Gy bestrahlt, wird die Invasivität von MTU-ASC-T10 signifikant bis stark erhöht. Die Bestrahlung der ASCs mit

2 Gy führt hingegen zu einer verminderten Invasivität; in Bezug auf MTU-ASC-T10 ist diese Verminderung signifikant.

MTU-ASC-T10 zeigt eine signifikant erhöhte Invasivität im Versuchsaufbau mit sich selbst im Gegensatz zu einem Aufbau mit MTU-ASC-N11. Dies weist daraufhin, dass peritumorale Adipozyten möglicherweise andere Eigenschaften bzw. ein anderes Sekretionsverhalten als Adipozyten aus tumorfreiem Gewebe besitzen könnten und somit einen invasionsfördernden Einfluss auf ASCs haben könnten.

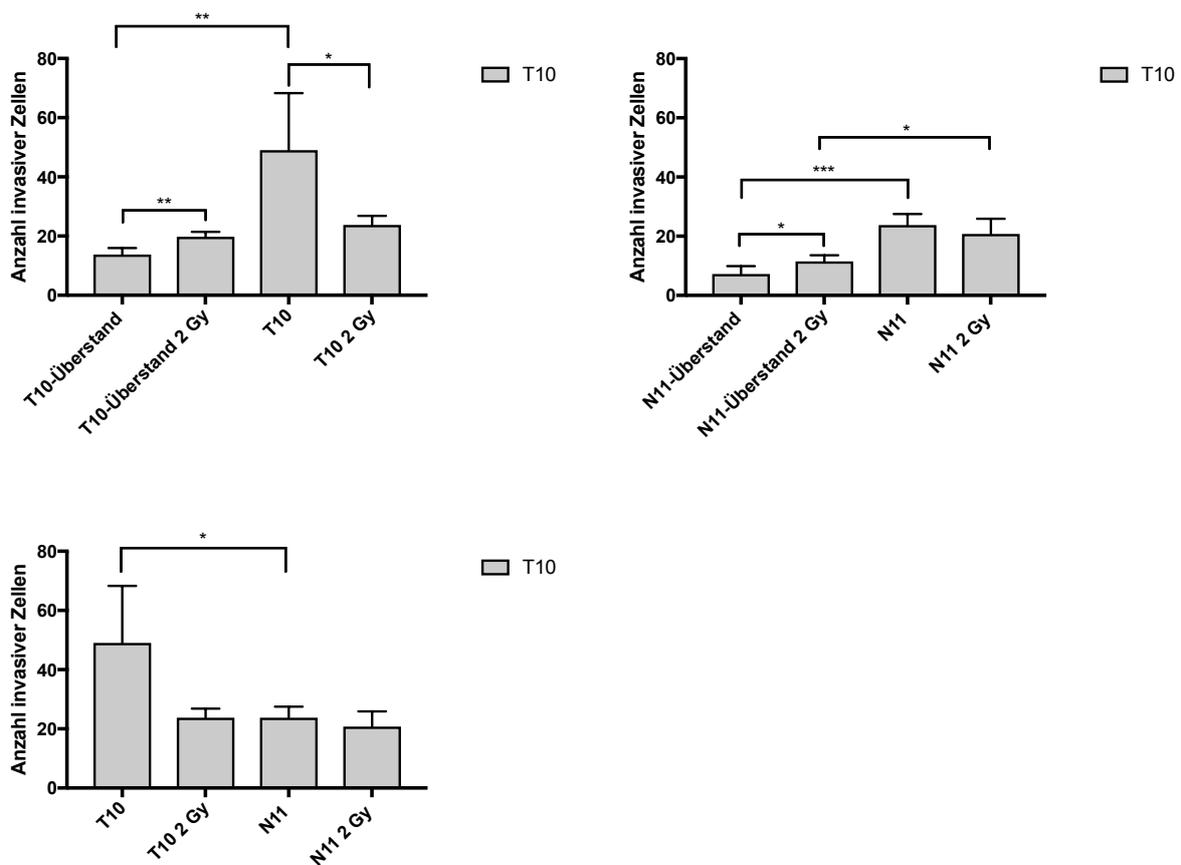


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Invasionstestungen der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10 in einem Versuchsaufbau mit den Überständen der zwei ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 sowie dieser selbst, zudem in Kombination mit Bestrahlung derselbigen mit 2 Gy; die p-Wert-Berechnung erfolgt mittels t-Test für unabhängige Stichproben

Die Versuchsaufbauten wie oben bereits beschrieben, jedoch mit Testung der Invasivität von MTU-ASC-N11, zeigen sehr ähnliche Ergebnisse.

Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Invasivität der MTU-ASC-N11 in Bezug auf mit 2 Gy bestrahlte MTU-ASC-N11 verglichen mit dem bestrahlten Überstand von

MTU-ASC-N11. Die Invasivität von MTU-ASC-N11 in Bezug auf MTU-ASC-T10 verglichen mit dem Überstand dieser ist sogar höchst signifikant erhöht.

Wie oben bereits zu erkennen war, führt die Bestrahlung der ASCs mit 2 Gy zu einer verminderten Invasivität der ASCs.

Der Effekt der Bestrahlung mit 2 Gy bezogen auf die Überstände ist jedoch ein anderer als in den Versuchen zuvor mit MTU-ASC-T10. Die Bestrahlung mit 2 Gy des Überstandes von MTU-ASC-T10 führt zur signifikanten Erhöhung der Invasivität von MTU-ASC-N11. Dahingegen führt die Bestrahlung des Überstandes von MTU-ASC-N11 zu einer hoch signifikanten Verminderung der Invasivität von MTU-ASC-N11.

Auch MTU-ASC-N11 zeigt eine, jedoch nicht signifikant erhöhte, Invasivität im Versuchsaufbau mit MTU-ASC-T10 verglichen mit sich selbst.

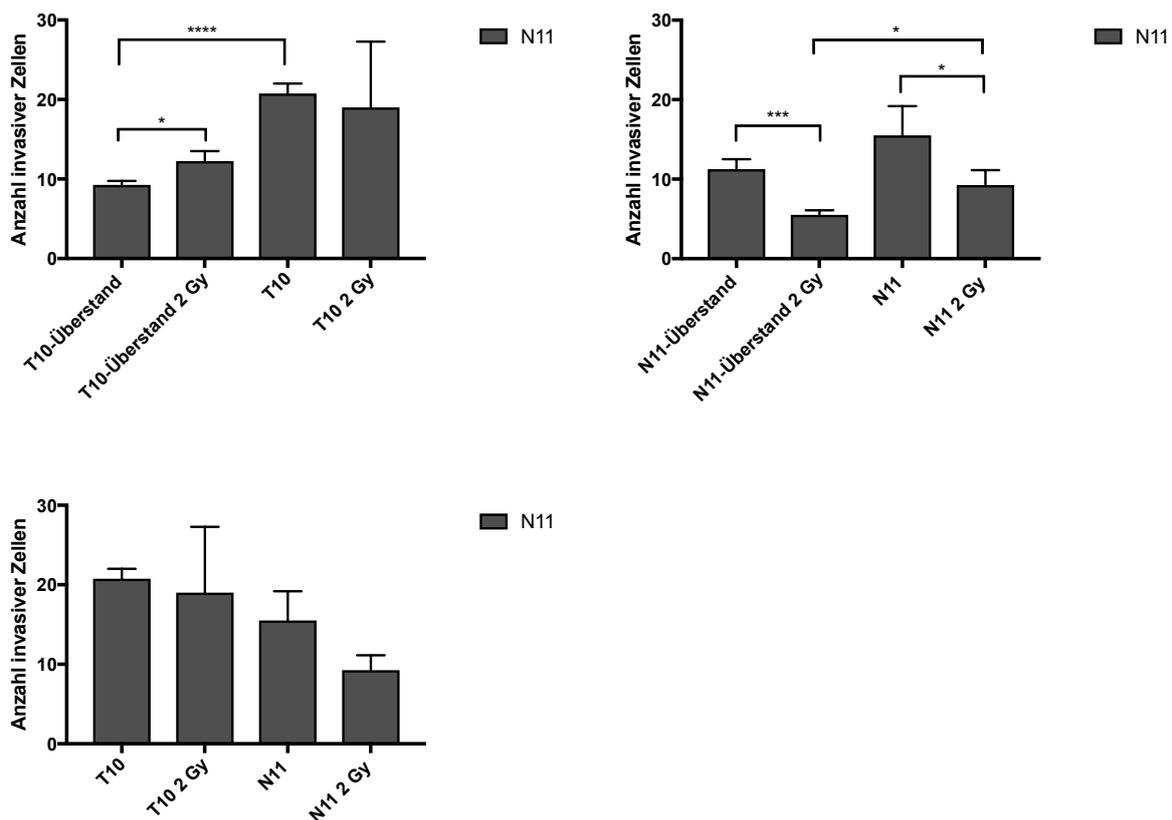


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Invasionstestungen der ASC-Zelllinie MTU-ASC-N11 in einem Versuchsaufbau mit den Überständen der zwei ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 sowie dieser selbst, zudem in Kombination mit Bestrahlung derselben mit 2 Gy; die p-Wert-Berechnung erfolgt mittels t-Test für unabhängige Stichproben

Abbildung 22 zeigt einen Gesamtüberblick über das Invasionsverhalten der ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 in den oben bereits dargestellten und analysierten Versuchsaufbauten.

Generell zeigt sich eine erhöhte Invasivität von MTU-ASC-T10 verglichen mit MTU-ASC-N11, was die Annahme einer gesteigerten Invasivität von peritumoralen Adipozyten unterstützt.

Zudem ist zu erkennen, dass die ASC-Zelllinien, vormerklich MTU-ASC-T10, die höchste Invasivität in der Co-Kultur mit den HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 erfahren. Die Hypothese, dass die Tumore selbst die Invasion bzw. Migration der Stammzellen und vor allem der ASCs initiieren und fördern, wird somit erhärtet.

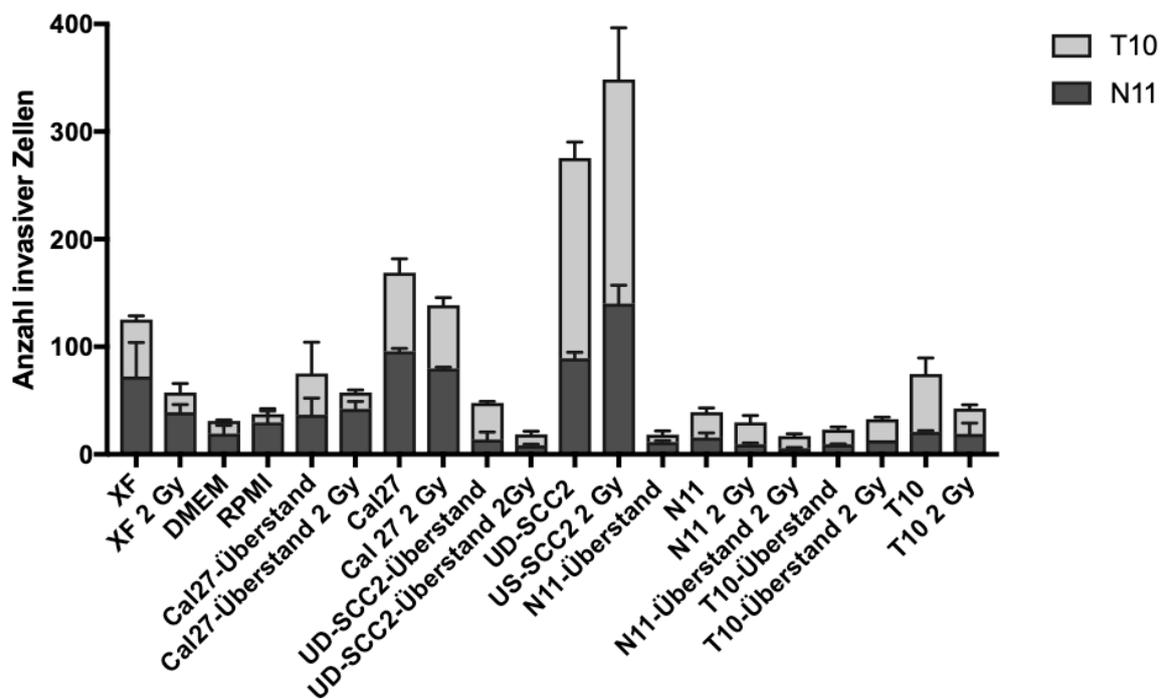


Abbildung 22: Vergleichsdarstellung der Invasionstestungen der ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 in den oben bereits aufgezeigten Versuchsaufbauten

Nach Beendigung der Invasionstestungen der ASC-Zelllinien wird zudem die Invasivität der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 in Bezug auf die ASCs getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 und Abbildung 23 dargestellt.

| | | Cal27 | UD-SCC2 |
|-------------|-------------|------------|----------------|
| MTU-ASC-T10 | MTU-ASC-N11 | p = 0,5641 | p = 0,0499 (*) |

Tabelle 30: Mittels t-Test für unabhängige Stichproben errechnete p-Werte der Invasionstestung der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 in einem Versuchsaufbau mit den ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11

Generell zeigt sich kein stark invasives Verhalten der zwei HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 in einem Versuchsaufbau mit den ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11. Jedoch ist eine vermehrte Invasivität in Bezug auf MTU-ASC-T10 im Vergleich zu MTU-ASC-N11 zu sehen; der gleiche Effekt war bereits in den oben durchgeführten und beschriebenen Versuchsaufbauten der Invasionstestung der ASCs im Bezug auf dieselbige ASC-Zelllinie und die andere ASC-Zelllinie aufgefallen.

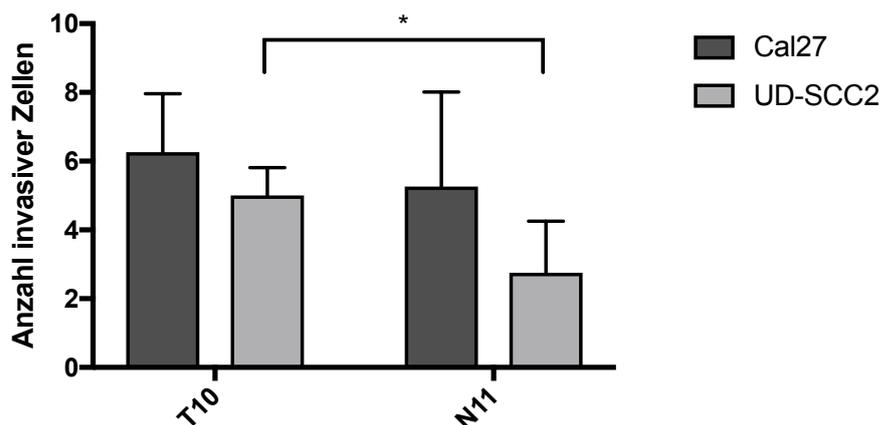


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Invasionstestungen der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 in einem Versuchsaufbau mit den ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11; die p-Wert-Berechnung erfolgt mittels t-Test für unabhängige Stichproben

4.3 Interleukin-Genexpression der ASCs und HNSCCs

Um ein Verständnis für die genetischen Mechanismen hinter dem unterschiedlichen Invasionsverhalten der ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 in Verbindung mit den verschiedenen HNSCC-Zelllinien und deren Überständen zu erlangen, wird eine Analyse der Interleukin-Genexpression der ASCs und HNSCCs und der HNSCCs nach Co-Kultur mit der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10 durchgeführt. Zudem wird, wie in den vorherigen Versuchen bereits, eine Bestrahlung von 2 Gy

angewandt. Die folgenden Ergebnisse sind auf die Genexpression von Cal27 normalisiert.

In Abbildung 24 ist zu erkennen, dass die Bestrahlung von Cal27 mit 2 Gy zu einer vermehrten Expression von IL-6, IL-20RB und IL-24 führt. Außerdem ist eine vermehrte Expression von IL-24 von unbestrahlten und mit 2 Gy bestrahlten Cal27 nach einer 24-stündigen Co-Kultur mit der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10 zu erkennen. Die Bestrahlung mit 2 Gy der Cal27 in Kombination mit einer Co-Kultur mit MTU-ASC-T10 zeigt eine zusätzlich erhöhte Expression von IL-24 im Gegensatz zu den unbestrahlten, sich in Co-Kultur mit ASCs befindlichen Cal27. Des Weiteren führt die Co-Kultur von Cal27 mit MTU-ASC-T10 zu einer verminderten Expression von IL-20RB und dieser Effekt wird wiederum minimal durch die Kombination der Bestrahlung mit 2 Gy und er Co-Kultur mit MTU-ASC-T10 verstärkt.

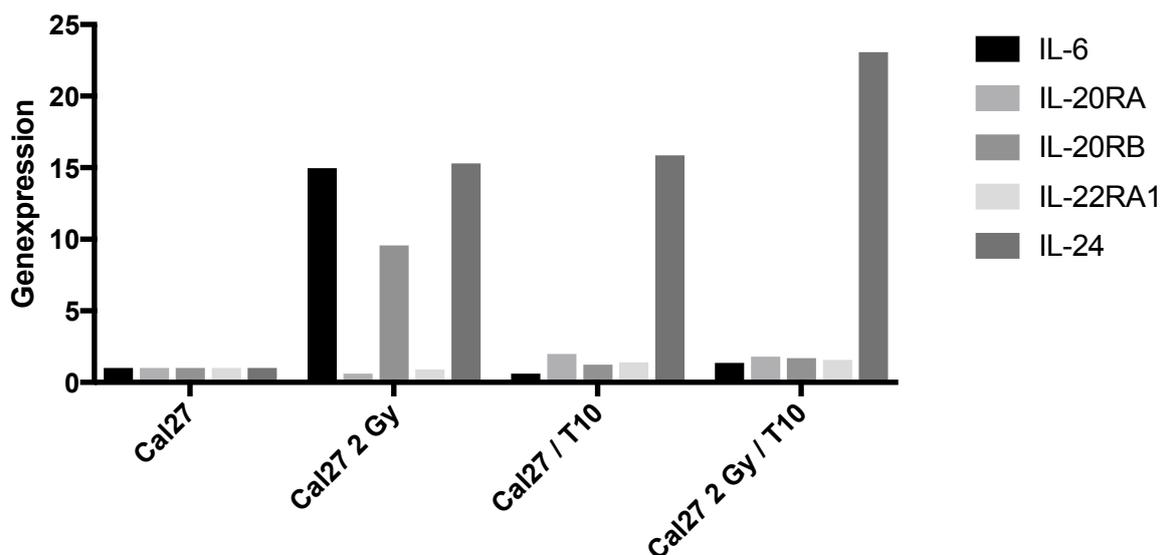


Abbildung 24: Graphische Darstellung Genexpression von Cal27 und Cal27 nach Bestrahlung mit 2 Gy. Des Weiteren Cal27 sowie Cal27 nach Bestrahlung mit 2 Gy, nach einer 24-stündigen Co-Kultur mit der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10; Normalisierung auf Cal27

Abbildung 25 zeigt, dass ebenfalls die Co-Kultur von UD-SCC2 unbestrahlt und bestrahlt mit 2 Gy zu einer stark erhöhten Expression von IL-24 führt, wie zuvor bereits bei Cal27 erkennbar. Darüber hinaus resultiert die Bestrahlung der HNSCC-Zellen UD-SCC2 mit 2 Gy, jedoch in keiner Verstärkung der Expression von IL-24, wie zuvor bei Cal27 erkennbar. Die Co-Kultur von UD-SCC2 mit

MTU-ASC-T10 führt jedoch zu einer starken Expression von IL-24 und die Kombination der Bestrahlung von UD-SCC2 mit 2 Gy und der Co-Kultivierung mit MTU-ASC-T10 erbringt, wie bereits zuvor bei Cal27 zu erkennen, eine weitere Verstärkung dieses Effektes.

Die Co-Kultur von UD-SCC2 mit MTU-ASC-T10 resultiert jedoch, wie bereits bei Cal27 ersichtlich ist, in einer verminderten Expression von IL-20RB. Ebenfalls, wie bereits zuvor zu erkennen, führt die Kombination der Bestrahlung mit 2 Gy und der Co-Kultivierung zu einer verstärkten Verminderung der IL-20RB-Expression.

IL-24 ist generell als Tumorsuppressor bekannt, welcher Apoptose in Tumorzellen initiiert. Die vermehrte Expression von einem Tumorsuppressor in den HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 aufgrund einer Co-Kultur mit der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10, welche aus peritumoralem Gewebe entstammt, stellt somit eine interessante Entdeckung dar.

IL-20RB ist Teil des Rezeptordimers, über den IL-19, IL-20 und IL-24 wirken.

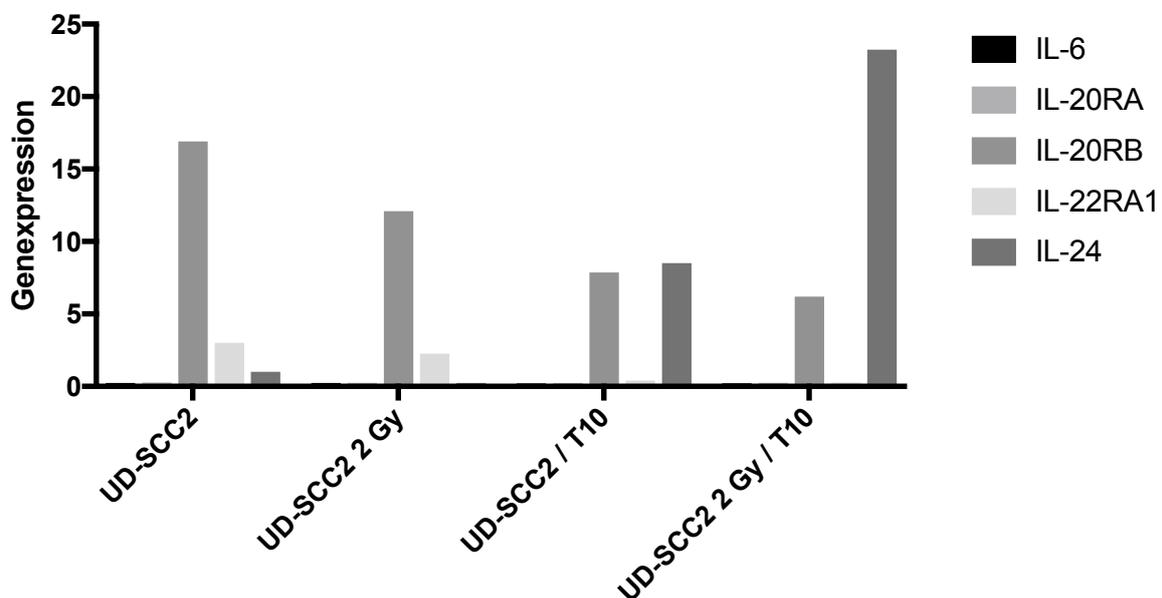


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Genexpression von UD-SCC2 und UD-SCC2 nach Bestrahlung mit 2 Gy. Des Weiteren UD-SCC2 sowie UD-SCC2 nach Bestrahlung mit 2 Gy, nach einer 24-stündigen Co-Kultur mit der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10; Normalisierung auf Cal27

In Abbildung 26 ist zu erkennen, dass die ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 vornehmlich IL-6 exprimieren. MTU-ASC-T10 zeigt eine höhere Expression von IL-6 als MTU-ASC-N11. Des Weiteren führt die Bestrahlung der ASC-Zelllinien mit 2 Gy zu einer verstärkten Expression von IL-6.

IL-6 ist generell als Interleukin des Immunsystems bekannt, welches eine Rolle in Entzündungsprozessen und Immunreaktionen hat.

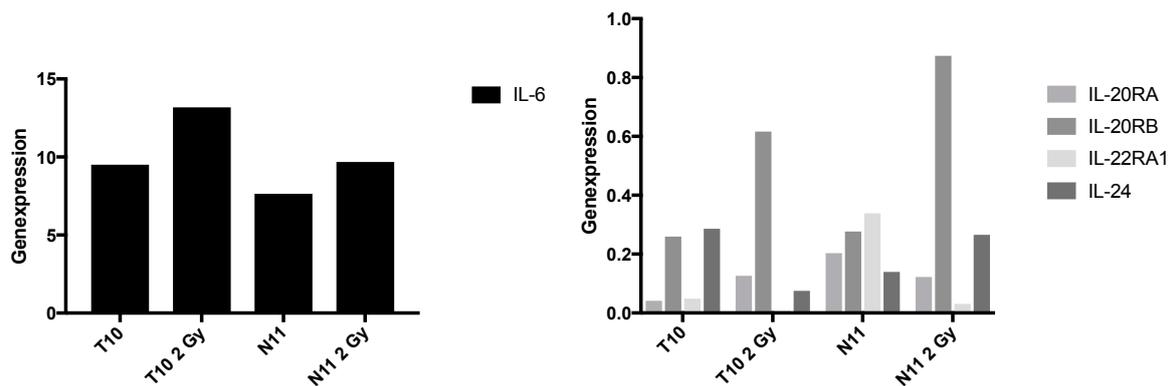


Abbildung 26: Graphische Darstellung der Genexpression von MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11, sowie MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 nach Bestrahlung mit 2 Gy; Normalisierung auf Cal27

In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass die Co-Kultivierung der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10 mit den HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 keine starken Veränderungen im Bezug auf die Genexpression zeigt. Es zeigt sich weiterhin eine starke IL-6-Expression, welche jedoch durch eine Co-Kultivierung mit UD-SCC2 vermindert ist.

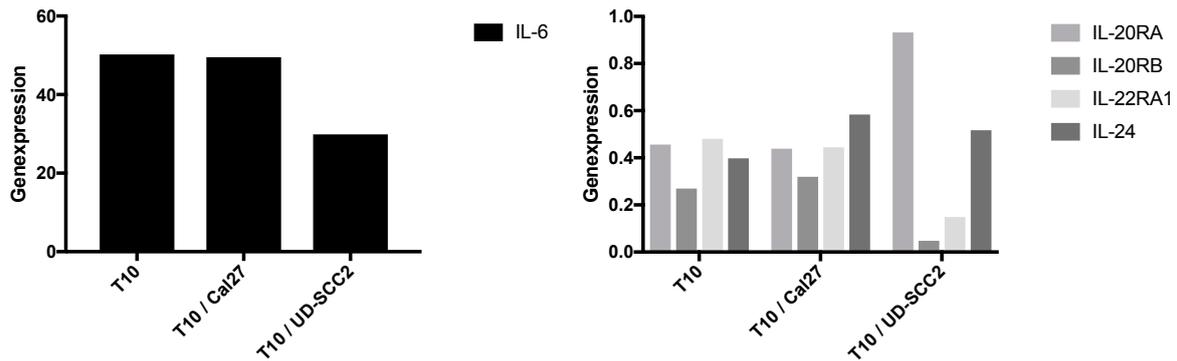


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Genexpression von MTU-ASC-T10 nach einer 24-stündigen Co-Kultur mit den HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2; Normalisierung auf Cal27

4.4 Einfluss von IL-6 auf die Genexpression und Proliferation der HNSCCs

Da die ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 eine starke Expression von IL-6 zeigen, wird als nächster Schritt der Einfluss von IL-6 auf die Genexpression und das Proliferationsverhalten der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 getestet.

Um den Einfluss von IL-6 auf die Genexpression der HNSCC-Zelllinien zu beurteilen, werden die HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 12 bzw. 24 Stunden mit IL-6 stimuliert.

In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass die IL-6-Stimulation auf Cal27 lediglich einen geringen Effekt hat; es wird minimal vermehrt IL-20RB exprimiert. Die IL-6-Stimulation von UD-SCC2 zeigt einen wesentlich stärkeren Effekt; es ist eine starke Expression von IL-20RB zu erkennen.

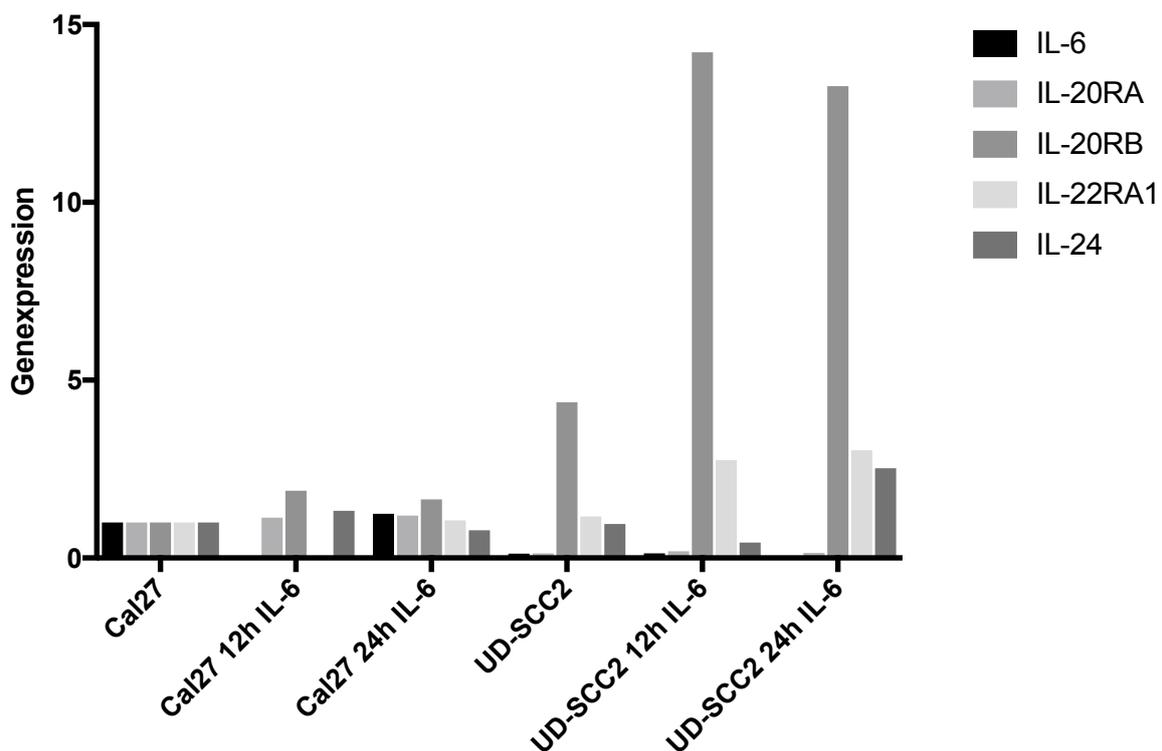


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Genexpression der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 nach 12- bzw. 24-stündiger IL-6-Stimulation; Normalisierung auf Cal27

Zur Testung des Proliferationsverhaltens der HNSCCs wird der Crystal-Violett-Proliferations-Assay gewählt. Es werden dafür jeweils 2.500 Zellen UD-SCC2 bzw. 500 Zellen Cal27 ausgesät. Der Versuch wird jeweils in einem doppelten Ansatz durchgeführt und die Proliferationsmessung zu den Zeitpunkten 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden wiederholt.

Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, führt die Stimulation von Cal27 mit IL-6 zu einer Verminderung der Proliferation. Während die Proliferation in den ersten 120 Stunden keine eindeutigen Unterschiede zeigt, steigt die Proliferation der unbehandelten Cal27 ab Stunde 120 an, wohingegen die Proliferation der mit IL-6 stimulierten Cal27 lediglich minimal steigt.

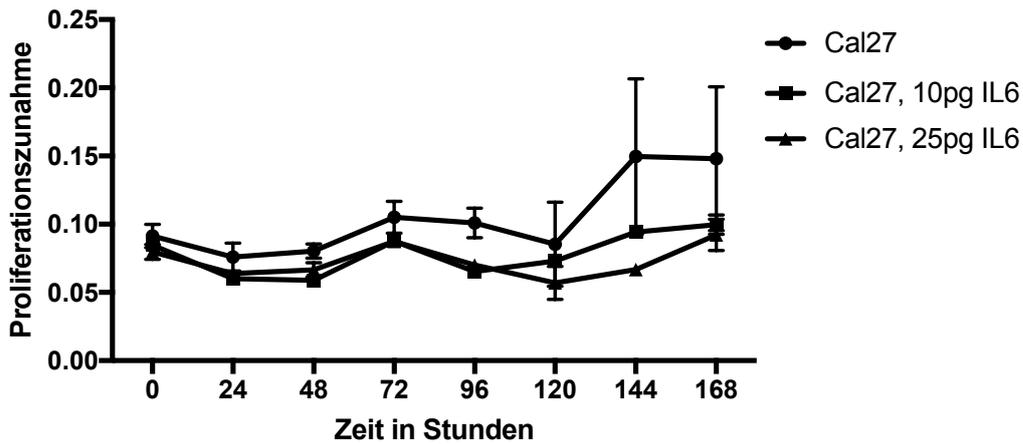


Abbildung 29: Proliferation von Cal27 unter Stimulation von 10pg und 25pg IL-6

In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass die Proliferation von UD-SCC2 im Gegensatz zu Cal27 grundsätzlich vermindert ist. In den ersten 48 Stunden nimmt die Proliferation der UD-SCC2 unbehandelt sowie unter IL-6-Stimulation ab. Danach kommt es zu einer verstärkten Proliferation. Der Einfluss der IL-6-Stimulation ist, verglichen mit dem Einfluss auf Cal27, jedoch deutlich vermindert.

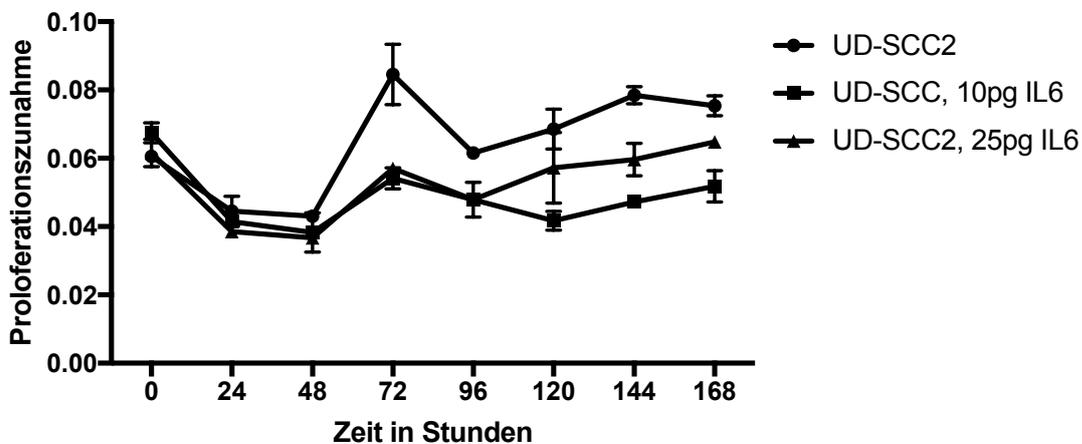


Abbildung 30: Proliferation von UD-SCC2 unter Stimultation von 10pg und 25pg IL-6

Die Ergebnisse der Proliferationsanalyse der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 lassen vermuten, dass die IL-6 Expression und womöglich IL-6-Sezernation der ASCs zumindest keinen proliferationsfördernden Einfluss auf die HNSCCs hat, eventuell sogar zu einer verminderten Proliferation dieser führt und somit einen antiproliferativen Einfluss auf Tumore haben könnte.

5. Diskussion

Die Rolle von mesenchymalen bzw. adipogenen Stammzellen in Bezug auf ihren Einfluss auf maligne Tumore ist bis dato noch nicht eindeutig geklärt, da die Literatur sehr kontroverse Aspekte diskutiert. Einige Autoren haben bereits gezeigt, dass MSCs Tumorinitiation, -wachstum und -metastasierung fördern (Nowicka et al., 2013), wohingegen andere Verfasser eine potentielle Rolle der MSCs in der Therapie von malignen Tumoren vermuten (Schweizer et al., 2015).

In dieser Arbeit sollten die Wechselwirkungen zwischen ASCs und Tumorzellen untersucht werden. Es wurde ein Augenmerk auf die unterschiedlichen Eigenschaften von ASCs aus peritumoralem Fettgewebe, verglichen mit ASCs aus nicht-tumorassoziertem Fettgewebe stammend gesetzt, um einen Einblick zu bekommen, ob die ASCs des TME veränderte Eigenschaften verglichen zu ASCs, die nicht mit Tumorzellen in Verbindung stehen, haben. Das Hauptaugenmerk sollte der invasiven Kapazität der ASCs gelten und es sollte versucht werden, neue Erkenntnisse bezüglich des invasiven Verhaltens von ASCs zu bzw. in maligne Tumore zu gewinnen. Das Ziel war der Erwerb eines grundlegenden Verständnisses der Interaktionen zwischen HNSCCs und ASCs in Bezug auf Tumore und ihr Wachstum.

5.1 Diskussion der Materialien und Methoden

Die *in vitro* Kultivierung von Zellen stellt lediglich Grundlagenforschung dar, da sie keine vollständige Repräsentation der *in vivo* Bedingungen bieten kann. *In vivo* sind weitaus mehr Zelltypen präsent, welche miteinander agieren und auf ASCs sowie HNSCCs Einfluss nehmen, als in den vorliegenden Versuchsaufbauten miteinander in Verbindung gebracht werden konnten. Jegliche Ergebnisse der *in vitro* Versuche sind deshalb differenziert zu betrachten und sollten für weitere Fragestellungen auf komplexere Versuchsansätze oder *in vivo* Versuche übertragen bzw. ausgeweitet werden.

Es ist bereits bekannt, dass die Eigenschaften von ASCs, gewonnen aus unterschiedlichen Lokalisationen und Personen stark differieren (Kansy et al., 2014). Um die spenderspezifischen Einflüsse wie Lokalisation, Geschlecht, Alter und Gewicht möglichst zu minimieren, wurde versucht diese Eigenschaften der Spender aneinander anzupassen. Es ist jedoch zu bedenken, dass Patienten mit einem

malignen Tumorleiden einen oftmals, durch Tumorkachexie bedingten, geringeren BMI aufweisen, wie auch bei unserem Spender der Zelllinien MTU-ASC-T10 zu beobachten ist.

Die Isolation der ASCs nach dem Protokoll von Zuk et. al. ist ein gut etabliertes Protokoll, welches kaum Limitationen darstellt. Die Methodik wurde gewissenhaft erlernt und konnte reproduzierbar angewandt werden. Es ist zu berücksichtigen, dass die bei der Isolation gewonnenen Zellen einerseits aus undifferenzierten und differenzierten Stammzellen bestehen und der Anteil der undifferenzierten Zellen, ASCs, unterschiedliche Differenzierungseigenschaften besitzt (Desai et al., 2012).

Die adipogene Differenzierung der ASCs wurde mit einem selbst hergestellten Differenzierungsmedium durchgeführt. Dieses Medium war bereits in der Arbeitsgruppe etabliert und zeigte nur geringe Einschränkungen sowie eine gute Reliabilität in der Anwendung. Für die chondrogene und osteogene Differenzierung der ASCs wurden hingegen Fertigmedien von PromoCell verwendet, wodurch die genauen Konzentrationen der Bestandteile nicht nachzuvollziehen sind. Eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war jedoch gegeben.

Um Serum-Einflüsse auf die Zellen zu vermeiden, wurde weitestgehend unter serumfreien Kulturbedingungen gearbeitet, was jedoch eine Stresssituation für die Zellen darstellt und damit einen nicht nachvollziehbaren Einfluss auf das Verhalten der Zellen haben könnte (Bellei et al., 2018). Da die HNSCC-Zelllinien lediglich bei Kultivierung mit serumhaltigem Medium adhärent an die Zellkulturschale sind, wurde das Medium der HNSCCs jeweils im Verlauf der Versuche gewechselt, wodurch jedoch keine strikt serumfreien Bedingungen erlangt werden konnten. Für die Kultur der ASCs wurde nur das serumfreie Xeno-Free Mesenchymal Stem Cell Medium verwendet.

Es handelt sich um eine explorative Studie, welche zur Verifizierung der Ergebnisse einen größeren Versuchsaufbau sowie weitere tieferegreifende Versuche benötigt.

5.2 Einfluss von Bestrahlung

Da Bestrahlung eine der therapeutischen Hauptsäulen der Tumore im Kopf-Hals-Bereich darstellt, wurden die Versuchsaufbauten jeweils mit einer Bestrahlung von 2 Gy kombiniert.

Die Bestrahlung der „anlockenden“ ASCs und deren Überstände in den Invasionstestungen zeigte keinen eindeutigen Effekt. Während die Bestrahlung der Überstände eher zu einer Anregung der Invasion der ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 führte, bewirkte die Bestrahlung der ASCs selbst eher eine Verminderung der Invasion. Die Genexpression wies auf eine verstärkte Expression von IL-6 der ASCs unter Bestrahlung hin.

Die Bestrahlung der HNSCCs und deren Überstände, in den Versuchsaufbauten zur Testung der Invasion, offenbarte ebenfalls keine wegweisenden Ergebnisse. Die Bestrahlung der UD-SCC2-Überstände mit 2 Gy führte zu einer verminderten Invasion von MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11, wohingegen die Bestrahlung von Überständen von Cal27 mit 2 Gy zu einer verminderten Invasion von MTU-ASC-T10, jedoch zu einer erhöhten Invasion von MTU-ASC-N11 führte. Bezogen auf die Bestrahlung der HNSCCs selbst sind die Versuche ebenfalls uneindeutig. Die Bestrahlung von UD-SCC2 resultierte in einer erhöhten Invasion von MTU-ASC-T10 und einer verminderten Invasion von MTU-ASC-N11. Die Bestrahlung von Cal27 führte zu einer erhöhten Invasion von MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11.

Auf Genebene zeigte sich, dass Bestrahlung zu einer vermehrten Expression von IL-6, IL-20RB und IL-24 bei Cal27 führt, wohingegen im Falle von UD-SCC2, IL-20RB vermindert exprimiert wird. Die Co-Kultur mit der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10 bewirkte in beiden Fällen der HNSCCs eine verminderte Expression von IL-20RB und eine vermehrte Expression von IL-24. Interessanterweise führt eine Kombination von Bestrahlung der HNSCCs mit 2 Gy sowie Co-Kultivierung mit MTU-ASC-T10 zu einer Aggravierung der Reduktion der IL-20RB-Expression und Verstärkung der IL-24-Expression.

Ionisierende Strahlung führt zu DNA-Schädigung innerhalb von Tumorzellen und auf diesem Wege zu deren Zelltod (Feng et al., 2018; Stefani et al., 2018). MSCs hingegen sind resistent gegen die Effekte von Bestrahlung, da sie sich in einen Zellzyklus-Arrest begeben, wodurch ihre Differenzierungseigenschaften und ihre Proliferationskapazität ungestört bestehen bleibt (Stefani et al., 2018). Bestrahlung führt vermutlich zu vielfältigen Interaktionen zwischen den Zellen des TME, vormerklich MSCs bzw. ASCs, und den Tumorzellen, wodurch potentiell antitumoröse Effekte eintreten können.

Eine Bestrahlung von Co-Kulturen von MSCs und Tumorzellen führt zu einer verminderten Phosphorylierung von PI3K-Akt und Extrazellulärer Signal Regulierter

Kinase (ERK), wodurch es zu einer vermehrten Apoptose der Tumorzellen kommt (Feng et al., 2018). Zudem hemmen bestrahlte MSCs die Angiogenese in Tumoren (Stefani et al., 2018).

Es wird außerdem vermutet, dass MSCs bzw. deren Überstände die Radiosensitivität von Tumoren erhöhen könnten, indem es zu einer Inhibierung des Signalwandler und Aktivator der Transkription 3 (STAT3) kommt (He et al., 2018). Die Versuchsergebnisse zeigten ebenfalls, dass die Bestrahlung der HNSCC-Zelllinien mit 2 Gy und Kombination dieser mit einer Co-Kultivierung mit der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10 additive Effekte bezüglich der vermehrten IL-24-Expression und verminderten IL-20RB-Expression haben. Ob dies jedoch über die STAT3-Signalkaskade vermittelt wird, ist bis dato unklar.

Die Ergebnisse zeigen, dass die ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 nach Bestrahlung mit 2 Gy vermehrt IL-6 exprimieren. IL-6 wirkt über die Aktivierung von JAK-PI3K-STAT proliferations- und differenzierungsfördernd, was somit allerdings einen positiven Einfluss auf den Tumorprogress hat (Browning et al., 2018; Kitamura et al., 2017). Es wurden jedoch bereits auch antitumoröse Effekte von IL-6 nachgewiesen (Fisher et al., 2014).

5.3 Invasionverhalten der ASCs

Die oben bereits detailliert beschriebenen Versuchsergebnisse zeigen, dass die HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 zu einer starken Invasion der ASC-Zelllinien führen. Es wurde bereits früh gezeigt, dass ASCs die Kapazität besitzen zu Tumoren zu migrieren und in diese einzuwandern (Nowicka et al., 2013). Die weiteren Interaktionen und Beeinflussungen der ASCs und Tumorzellen sind allerdings nach wie vor Gebiet der Forschung.

Es wurde bereits mehrfach vermutet, dass ASCs zur Tumorinitiation beitragen, das Tumorwachstum fördern, sowie die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen positiv beeinflussen (Goldstone & Austen, 2015; Nowicka et al., 2013; Rowan et al., 2014). Andererseits werden ASCs jedoch aufgrund ihrer invasiven Eigenschaften als potentielle Vektoren für Chemotherapeutika gesehen (Klopp et al., 2010; Schweizer et al., 2015). Einige Studien belegen, dass ASCs die Proliferation und Metastasierung von Tumorzellen hemmen und zur Apoptose der Tumorzellen führen (J. H. Lee et al., 2015; Sun et al., 2014). Die genauen molekularen Mechanismen

sind in den meisten Fällen nicht verstanden; jedoch werden die vielfältigen Eigenschaften der ASCs wahrscheinlich über die Sekretion von Zytokinen bestimmt. Zudem ist zu erkennen, dass die ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10, welche aus peritumoralem Fettgewebe gewonnen wurde, eine höhere Invasivität, verglichen mit der Zelllinie MTU-ASC-N11, besitzt. Es wäre denkbar, dass es zu einer wechselseitigen Beeinflussung von ASCs des TME und der Tumorzellen selbst kommt, wodurch die peritumoralen ASCs eine erhöhte Invasivität erlangen. In den Tumoren erfüllen die ASCs dann eventuell eigenständige Funktionen, wie Unterstützung der weiteren Tumorinitiierung bzw. des Tumorprogresses, des Tumorwachstums und der Vaskularisation (Nowicka et al., 2013). Andererseits sind sie durch ihre hohe invasive Kapazität ebenso in der Lage antitumorös wirkende Stoffe in die Tumore zu transportieren und den Körper so bei der Bekämpfung der Tumore zu unterstützen (Klopp et al., 2010).

5.4 Einfluss von IL-6 auf HNSCCs

Die oben beschriebenen Versuche haben gezeigt, dass ASCs, welche sowohl aus Fettgewebe in Beziehung zu malignen Tumoren stehend gewonnen wurden, wie die Zelllinie MTU-ASC-T10, als auch aus nicht-tumorassoziertem Fettgewebe stammend, wie die Zelllinie MTU-ASC-N11, hohe Konzentrationen des Interleukins IL-6 exprimieren und somit höchstwahrscheinlich auch sezernieren. Es wurde ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben, dass die in Fettgewebe enthaltenen ASCs, Endothelzellen und Fibroblasten IL-6 sezernieren (Dirat et al., 2011).

Zudem zeigte die ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 eine vermehrte Expression von IL-6 verglichen mit MTU-ASC-N11. Die Literatur bestätigt diese Ergebnisse ebenfalls, da die Expressionlevel von IL-6 in Adipozyten eine Korrelation zu Tumorgröße und Lymphknotenmetastasen zeigen (Dirat et al., 2011).

Die Rolle von IL-6 in Bezug auf maligne Tumore ist bis dato nicht endgültig geklärt und weiterhin Gebiet der Forschung und Diskussion, da die Ergebnisse sehr widersprüchlich und konträr sind. IL-6 wird einerseits eine tumorunterstützende Funktion zugesprochen, andererseits werden auch antitumoröse Effekte in der Literatur beschrieben.

Das proinflammatorischen Zytokin IL-6 soll eine zentrale Rolle in der Tumorinitiierung, dem Tumorwachstum und der Metastasierung von Tumoren haben (Fisher et

al., 2014), indem es die JAK-STAT- und PI3K-Akt-mTOR-Kaskaden aktiviert (Browning et al., 2018; Kitamura et al., 2017; H. H. Lee, Jung, Moon, Kang, & Cho, 2019; Sun et al., 2014). IL-6 führt zu einer Verstärkung von Entzündungen und Immunität und regt zudem Tumorzellen zur Proliferation und Invasion an (Fisher et al., 2014; Zhao et al., 2016). Hohe IL-6-Serumkonzentrationen sollen außerdem im Zusammenhang mit einem verminderten Überleben bei Patienten mit malignem Tumorleiden stehen (Zhao et al., 2016).

Andererseits soll IL-6 hingegen die Immunität gegenüber Tumoren erhöhen, indem T-Zellen aktiviert und mobilisiert werden und die T-Zell-Proliferation erhöht wird (Fisher et al., 2014; Lee et al., 2019). Des Weiteren unterstützt IL-6 die Aktivierung von Lymphozyten in Lymphknoten und damit ihre Funktion des adaptiven Immunsystems in der Bekämpfung von Pathogenen und Tumorzellen, wodurch es zu einer Inhibition des Größenwachstums kommt (ebd.).

Die Ergebnisse der Crystal-Violett-Proliferationsanalyse zeigen, dass die Stimulation der HNSCC-Zelllinien UD-SCC2 und Cal27 mit IL-6 womöglich zu einer verminderten Proliferation, auf jeden Fall jedoch zu keiner Verstärkung der Proliferation führt. Diese Ergebnisse könnten einen antitumorösen Effekt von IL-6 bestätigen. Jedoch stehen sie damit entgegen der bis dato in der Literatur gezeigten Ergebnisse bezüglich der proliferationsunterstützenden Wirkung von IL-6.

5.5 Einfluss von IL-20RB in HNSCCs

Die Versuche haben gezeigt, dass eine 24-stündige Co-Kultur der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 mit der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10 zu einer verminderten Expression des Interleukin-Rezeptors IL-20RB führt. Des Weiteren hat sich jedoch gezeigt, dass die IL-6 Stimulation der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 zu einer vermehrten Expression von IL-20RB führt.

IL-20RB ist Teil der Rezeptoren über die die Interleukine der IL-10-Familie wirken. Die zwei bekannten Rezeptoren sind der IL-22R/ IL-20-RB-Rezeptor und der IL-20RA/ IL-20RB-Rezeptor, welche jeweils aus einer kurzen und einer langen Untereinheit bestehen (Parrish-Novak et al., 2002; Wang & Liang, 2005). Den beiden Rezeptoren ist die kurze Untereinheit des IL-20RB somit gemeinsam (Menezes et al., 2014; Wang & Liang, 2005). Des Weiteren existiert der lösliche

IL-20RB-Rezeptor, welcher für die Blockierung von IL-24 verantwortlich gemacht wird (Parrish-Novak et al., 2002). Lediglich IL-20 und IL-24 der IL-10-Familie sind in der Lage über beide Rezeptoren zu wirken, während die restlichen Vertreter der IL-10-Familie, AK155, IL-19, IL-22, lediglich über den IL-20RA/ IL-20-RB-Rezeptor wirken können (Parrish-Novak et al., 2002).

Es wurde bereits gezeigt, dass eine erhöhte IL-20RB-Expression mit einem erhöhten T-Stadium des Tumors, vermehrten Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen einhergeht (Jia et al., 2016). Außerdem wird vermutet, dass der IL-20RA/ IL20-RB-Rezeptor, die durch IL-24 induzierte Wachstumsinhibition vermittelt (ebd.).

Die verminderte Expression des Rezeptors IL-20RB von den HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2, nach Co-Kultur dieser mit der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10, lassen somit vermuten, dass die Co-Kultur keinen tumorinduzierenden Effekt mit sich bringt. Durch die Co-Kultur kommt es zu einer Änderung auf Genebene der HNSCCs, welche das Größenwachstum und die Migration wahrscheinlich negativ beeinflussen und somit antitumorös sind.

5.6 Einfluss von IL-24 in HNSCCs

Die Versuche haben gezeigt, dass die HNSCC-Zelllinien UD-SCC2 und Cal27 nach einer 24-stündigen Co-Kultur mit der aus peritumoralem Fettgewebe isolierten ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10 das Interleukin IL-24 vermehrt exprimieren. Bei der Zelllinie Cal27 hatte die Co-Kultur mit der ASC-Zelllinie etwa den gleichen Effekt auf die IL-24-Expression wie eine Bestrahlung mit 2 Gy.

IL-24 wurde ursprünglich Mitte der 1990er Jahre als Melanom Differentiation Assoziiertes Gen-7 (MDA-7) identifiziert, welches Einfluss auf die Zelldifferenzierung haben soll; dieses wurde 2002 anhand seiner Oberflächenrezeptoren zu IL-24 umbenannt (Wang & Liang, 2005). IL-24 gehört mit AK155, IL-19, IL-20 und IL-22 zur IL-10-Familie, dessen Vertreter die Gemeinsamkeit haben über die heterodimeren IL-22R/ IL-20-RB- und IL-20RA/ IL-20RB-Rezeptoren zu wirken (Parrish-Novak et al., 2002; Wang & Liang, 2005).

IL-24 wirkt in normalen Konzentrationen über seine Rezeptoren als klassisches Zytokin der Immunantwort, in hohen Konzentrationen wirkt es allerdings intrazellulär mit einem zytotoxischen Einfluss auf Krebszellen (Chada et al., 2004; Wang & Liang,

2005). Dieser antitumoröse Effekt wird durch eine Beeinflussung der verschiedenen zentralen Kennzeichen der Tumorzellentstehung gewährleistet: IL-24 hemmt die Proliferation und induziert Apoptose (Jia et al., 2016; Liu et al., 2017), außerdem inhibiert es die Migration, Invasion und Angiogenese der Krebszellen (Chada et al., 2004; Menezes et al., 2014; Panneerselvam et al., 2015).

IL-24 ist teilweise in Karzinomen mit Mikrosatelliteninstabilitäten überexprimiert (Wang & Liang, 2005), in vielen Krebsentitäten wird es jedoch vermindert bis gar nicht exprimiert und seine Wirkung geht somit verloren (Menezes et al., 2014; Panneerselvam et al., 2015).

IL-24 wird als funktioneller Tumorsuppressor beschrieben, da es zu einer verminderten Proliferation, vermehrten Apoptose und Metastasierungshemmung in Tumorzellen führt, während es jedoch keinen Einfluss auf Nicht-Tumorzellen zeigt. Es ist allerdings lediglich als funktioneller Tumorsuppressor anzusehen, da es keinerlei genetische Eigenschaften eines Tumorsuppressors, wie Funktionsverlustmutation, Verlust der Heterozygotie oder Keimbahnmutationen, besitzt (Wang & Liang, 2005).

IL-24 wird als potentielles, molekular wirkendes Krebstherapeutikum angesehen, da es vielfältige antitumoröse Eigenschaften besitzt und zudem zu einer erhöhten Strahlensensibilität innerhalb der Tumore führen soll (Jia et al., 2016; Panneerselvam et al., 2015).

5.7 Wechselseitiger Einfluss der ASCs und HNSCCs

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass HNSCCs die Invasion von ASCs anregen. Es wurde ebenfalls bereits mehrfach zuvor in der Literatur gezeigt, dass MSCs in der Lage sind zu Tumoren zu migrieren. Deshalb ist es ihnen möglich vor Ort direkten Einfluss auf Tumorzellen zu nehmen und zudem als potentielles Vehikel in der Tumorthherapie genutzt zu werden, um beispielweise Chemotherapeutika in Tumore zu befördern.

Die Versuchsergebnisse machen deutlich, dass einerseits ASCs eine hohe IL-6-Expression zeigen und andererseits eine erniedrigte IL-20RB-Expression. Zudem ist eine erhöhte IL-24-Expression der HNSCC-Zelllinien nach Co-Kultur mit ASCs zu erkennen. Die Kombination von Bestrahlung und der Co-Kultivierung der HNSCCs mit den ASCs zeigt zudem additive Effekte auf die verminderte

IL-20RB-Expression und erhöhte IL24-Expression.

Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der Crystal-Violett-Proliferationsanalyse, dass die Stimulation der HNSCC-Zelllinien UD-SCC2 und Cal27 mit dem stark von den ASCs exprimierten und sezernierten IL-6 keinen proliferationsfördernden Einfluss hat.

Zudem war jedoch auch erkennbar, dass eine direkte Stimulation der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 mit IL-6 zu einer vermehrten Expression von IL-20RB führt.

IL-24 kann die Expression anderer Zytokine, wie TNF- α oder IL-6 beeinflussen (Wang & Liang, 2005), weshalb zu vermuten ist, dass diese Beeinflussung auch gegensätzlich möglich ist. Somit wäre anhand der Versuchsergebnisse denkbar, dass ASCs IL-6 exprimieren und sezernieren und dadurch zu einer Hochregulation von IL-24 und Verminderung von IL-20RB in den HNSCC-Zelllinien beitragen, wenn diese beiden Zellen miteinander in Co-Kultur stehen. Durch das Wiedererlangen der Expression von IL-24, welche in Tumorzellen, so auch in den HNSCC-Zelllinien, normalerweise verloren gegangen ist, kann IL-24 seine Funktion als Tumorsuppressor ausüben. IL-24 kann dann über eine Proliferationshemmung antitumorös wirken.

Der vermutete Einfluss von IL-6 aus den ASCs auf eine Hochregulation von IL-24 in den HNSCCs und dem damit verbundenen antitumorösen Effekt wurde bis dato nicht beschrieben.

Da die direkte IL-6-Stimulation der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 jedoch keinen Effekt auf die IL-24-Expression zeigt und zudem zu einer vermehrten Expression des Interleukin-Rezeptors IL-20RB führt, muss in Erwägung gezogen werden, dass die gezeigten Effekte der Co-Kultivierung auf die IL-24- und IL-20RB-Expression eventuell nicht durch die IL-6-Sezernation der ASCs hervorgerufen sind. Des Weiteren ist es jedoch möglich, dass das gebrauchte IL-6 zur Stimulation einen molekularen Unterschied zu dem von den ASCs selbst sezernierten IL-6 besitzt.

5.8 Ausblick

Um diese Ergebnisse weiter verifizieren zu können, sollten die beteiligten Signalkaskaden, welche zur Expression von IL-24, nach Co-Kultivierung mit den

ASCs, führen, eingehend untersucht werden. In einem nächsten Schritt sollte versucht werden die gesammelten Erkenntnisse auf einen *in vivo* Versuch zu übertragen und in diesem die Einflüsse von ASCs auf die IL-24-Expression in HNSCCs und die damit verbundenen Wirkungen auf Migration, Invasion, Tumorwachstum, Apoptose und Angiogenese zu untersuchen.

Die Erkenntnisse stellen somit einen neuen potentiellen protektiven bzw. therapeutischen Nutzen der ASCs dar.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein grundlegendes Verständnis des unterschiedlichen Invasionsverhaltens von aus peritumoralem Fettgewebe gewonnenen ASCs und nicht mit Tumorzellen assoziierten ASCs zu erlangen. Im Weiteren sollte der Einfluss der ASCs des TME auf die Tumorzellen untersucht und verstanden werden. Diese Erkenntnisse sollen dazu beitragen, die vielfältigen Interaktionen des TME besser zu verstehen um eines Tages einen neuen therapeutischen Angriffspunkt für die Tumorthherapie zu erarbeiten.

Es wurde gezeigt, dass HNSCCs die Invasion von ASCs, sowohl aus peritumoralem Fettgewebe als auch nicht mit Tumorzellen assoziiertem Fettgewebe, fördern. Es lässt sich allerdings eine höhere invasive Kapazität der ASCs des peritumoralem Fettgewebes, und damit wahrscheinlich Teil des TME, erkennen.

Es wird deutlich, dass ASCs hohe Konzentrationen an IL-6 exprimieren und sezernieren; die IL-6-Expression der ASCs wird zudem durch Bestrahlung mit 2 Gy erhöht. Es zeigt sich, dass IL-6 keinen proliferationsfördernden Einfluss auf HNSCCs hat. Inwieweit IL-6 über Signalkaskaden in den Stoffwechsel von HNSCCs eingreift, ist leider noch nicht eindeutig verstanden.

HNSCCs, welche mit der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10 Co-kultiviert werden, zeigen eine verminderte Expression von IL-20RB. Die Co-Kultur von HNSCCs und ASCs des TME zeigen somit keinen tumorfördernden Einfluss, sondern es werden molekulare Änderungen induziert, welche antitumoröse Effekte besitzen.

Nach einer Co-Kultur der HNSCCs mit der ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 wird der funktionelle Tumorsuppressor IL-24, welcher in Tumorzellen eigentlich nicht mehr exprimiert wird, wieder stark exprimiert. Somit hat die Co-Kultur einen antitumorösen Effekt, welcher durch eine genetische Änderung der Tumorzellen selbst vermittelt wird.

Zusammengefasst zeigt sich, dass der Einfluss von ASCs auf HNSCCs nicht, wie vielfach vermutet, in der Tumorinitiation, Unterstützung des Tumorwachstums und der Migration liegt, sondern antitumorös ist. Durch noch nicht verstandene Mechanismen kommt es zu einer Hochregulation des üblich nicht-exprimierten, Tumorsuppressors IL-24 in den HNSCCs, wodurch vermutlich die Proliferation inhibiert und Apoptose induziert wird, sowie Migration, Invasion und Angiogenese gehemmt werden.

7. Literaturverzeichnis

- Anjanappa, M., Burnett, R., Zieger, M. A., Merfeld-Clauss, S., Wooden, W., March, K., ... Nakshatri, H. (2016). Distinct Effects of Adipose-derived Stem Cells and Adipocytes on Normal and Cancer Cell Hierarchy. *Molecular Cancer Research : MCR*, 14(July), 660–671. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0055>
- Argiris, A., Karamouzis, M. V, Raben, D., & Ferris, R. L. (2008). Head and neck cancer. *Lancet (London, England)*, 371(9625), 1695–1709. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60728-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60728-X)
- Baghaei, K., Hashemi, S. M., Tokhanbigli, S., Rad, A. A., Assadzadeh-, H., Sharifian, A., & Zali, M. R. (2017). Isolation , differentiation , and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterology and Hepatology*, 10(8), 208–213. <https://doi.org/10.22037/ghfbb.v0i0.1089>
- Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(23), 5591–5596. <https://doi.org/10.1242/jcs.116392>
- Bann, D. V., Deschler, D. G., & Goyal, N. (2016). Novel immunotherapeutic approaches for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancers*, 8(10), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cancers8100087>
- Bauml, J. M., Cohen, R. B., & Aggarwal, C. (2016). Immunotherapy for head and neck cancer: Latest developments and clinical potential. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 8(3), 168–175. <https://doi.org/10.1177/1758834016631529>
- Beck-Mannagetta, J., Burian, M., Vinzenz, K., Kopp, M., & Rosenlechner, S. (2011). *Manual der Chirurgischen Krebstherapie - Kopf-Hals-Malignome*.
- Bellei, B., Migliano, E., Tedesco, M., Caputo, S., Papaccio, F., Lopez, G., & Picardo, M. (2018). Adipose tissue-derived extracellular fraction characterization: biological and clinical considerations in regenerative medicine, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0956-4>
- Bender, R., Lange, S., & Ziegler, A. (2007). Multiple testing. *Deutsche Medizinische*

Wochenschrift (1946), 132 Suppl 1(12), 27–30. <https://doi.org/10.1055/s-2007-959035>

Benson, R., Mallick, S., Julka, P. K., & Rath, G. K. (2016). Anti EGFR therapy in the treatment of non-metastatic head and neck squamous cell carcinoma: The current evidence. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 28(3), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.jnci.2016.04.003>

Bielli, A., Scioli, M. G., Gentile, P., Cervelli, V., & Orlandi, A. (2015). Adipose Tissue-Derived Stem Cell Therapy for Post-Surgical Breast Reconstruction--More Light than Shadows. *Advances in Clinical and Experimental Medicine : Official Organ Wroclaw Medical University*, 24(3), 545–548. <https://doi.org/10.17219/acem/31673>

Bora, P., & Majumdar, A. S. (2017). Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: A brief review on biology and translation. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0598-y>

Bose, P., Brockton, N. T., & Dort, J. C. (2013). Head and neck cancer: From anatomy to biology. *International Journal of Cancer*, 133(9), 2013–2023. <https://doi.org/10.1002/ijc.28112>

Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2016). *TNM Classification of Malignant Tumours* (8th ed.). Union For International Cancer Control.

Browning, L., Patel, M. R., Horvath, E. B., Tawara, K., & Jorcyk, C. L. (2018). IL-6 and ovarian cancer: Inflammatory cytokines in promotion of metastasis. *Cancer Management and Research*, 10, 6685–6693. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S179189>

Chada, S., Mhashilkar, A. M., Ramesh, R., Mumm, J. B., Sutton, R. B., Bocangel, D., ... Ekmekcioglu, S. (2004). Bystander activity of Ad-mda7: Human MDA-7 protein kills melanoma cells via an IL-20 receptor-dependent but STAT3-independent mechanism. *Molecular Therapy*, 10(6), 1085–1095. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.08.020>

Chavez-Munoz, C., Nguyen, K. T., Xu, W., Hong, S. J., Mustoe, T. A., & Galiano, R.

- D. (2013). Transdifferentiation of adipose-derived stem cells into keratinocyte-like cells: Engineering a stratified epidermis. *PLoS ONE*, 8(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080587>
- Corning. (2013). Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chamber, 2200(354480).
- Danan, D., Lehman, C. E., Mendez, R. E., Langford, B., Koors, P. D., Dougherty, M. I., ... Jameson, M. J. (2018). Effect of Adipose-Derived Stem Cells on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*. <https://doi.org/10.1177/0194599817750361>
- Desai, H. V., Voruganti, I. S., Jayasuriya, C., Chen, Q., & Darling, E. M. (2012). Live-Cell, Temporal Gene Expression Analysis of Osteogenic Differentiation in Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*, 20, 120905121132000.
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0127>
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., ... Muller, C. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Research*, 71(7), 2455–2465.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3323>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (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>
- Feisst, V., Meidinger, S., & Locke, M. (2015). From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 8, 149. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S64373>
- Feng, H., Zhao, J. K., Schiergens, T. S., Wang, P. X., Ou, B. C., Al-Sayegh, R., ... Thasler, W. E. (2018). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote colorectal cancer cell death under low-dose irradiation. *British Journal of Cancer*, 118(3), 353–365. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.415>
- Fisher, D. T., Appenheimer, M. M., & Evans, S. S. (2014). The two faces of IL-6 in

the tumor microenvironment. *Seminars in Immunology*, 26(1), 38–47.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.008>

Girandon, L., Kregar-Velikonja, N., Božikov, K., & Barlič, A. (2011). In vitro models for adipose tissue engineering with adipose-derived stem cells using different scaffolds of natural origin. *Folia Biologica*, 57, 47–56.

Goldstone, R. N., & Austen, W. G. (2015). Human Adipose Tissue-Derived Stromal/Stem Cells Promote Migration and Early Metastasis of Head and Neck Cancer Xenografts. *Aesthetic Surgery Journal*, 36(1), 93–104.
<https://doi.org/10.1093/asj/sjv090>

Grottkau, B. E., & Lin, Y. (2013). Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells. *Bone Research*, 1(2), 133–145. <https://doi.org/10.4248/BR201302003>

He, N., Kong, Y., Lei, X., Liu, Y., Wang, J., Xu, C., ... Liu, Q. (2018). MSCs inhibit tumor progression and enhance radiosensitivity of breast cancer cells by down-regulating Stat3 signaling pathway. *Cell Death and Disease*, 9(10).
<https://doi.org/10.1038/s41419-018-0949-3>

Husain, N., & Neyaz, A. (2017). Human papillomavirus associated head and neck squamous cell carcinoma: Controversies and new concepts. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 7(3), 198–205.
<https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2017.08.003>

Jia, Y., Ji, K., Ye, L., Sanders, A. J., Jiang, W. G., Ji, J., & Hao, C. (2016). Il24 and its receptors regulate growth and migration of pancreatic cancer cells and are potential biomarkers for il24 molecular therapy. *Anticancer Research*, 36(3), 1153–1164.

Kansy, B. A., Dißmann, P. A., Hemeda, H., Bruderek, K., Westerkamp, A. M., Jagalski, V., ... Brandau, S. (2014). The bidirectional tumor - Mesenchymal stromal cell interaction promotes the progression of head and neck cancer. *Stem Cell Research and Therapy*, 5(4), 1–10. <https://doi.org/10.1186/scrt484>

Kitamura, H., Ohno, Y., Toyoshima, Y., Ohtake, J., Homma, S., Kawamura, H., ... Taketomi, A. (2017). Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to

- improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Science*, 108(10), 1947–1952. <https://doi.org/10.1111/cas.13332>
- Klopp, A. H., Spaeth, E. L., Dembinski, J. L., Woodward, W. A., Munshi, A., Meyn, R. E., ... Marini, F. C. (2010). Tumor Irridiation Increases the Recruitment of Circulating Mesenchymal Stem Cells into the Tumor Microenvironment. *Clinical Lymphoma*, 9(1), 19–22. <https://doi.org/10.3816/CLM.2009.n.003.Novel>
- Lee, H. H., Jung, J., Moon, A., Kang, H., & Cho, H. (2019). Antitumor and Anti-Invasive Effect of Apigenin on Human Breast Carcinoma through Suppression of IL-6 Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3143. <https://doi.org/10.3390/ijms20133143>
- Lee, J. H., Park, C. H., Chun, K. H., & Hong, S. S. (2015). Effect of adipose-derived stem cell-conditioned medium on the proliferation and migration of B16 melanoma cells. *Oncology Letters*, 10(2), 730–736. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3360>
- Liotta, F., Querci, V., Mannelli, G., Santarasci, V., Maggi, L., Capone, M., ... Matuskova, M. (2014). Mesenchymal stem cells are enriched in head neck squamous cell carcinoma, correlates with tumour size and inhibit T-cell proliferation. *Br J Cancer*, 112(1), 745–754. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.15> bjc201515 [pii]
- Liu, B., Chen, F., Wu, Y., Wang, X., Feng, M., Li, Z., ... Liang, D. (2017). Enhanced tumor growth inhibition by mesenchymal stem cells derived from iPSCs with targeted integration of interleukin24 into rDNA loci. *Oncotarget*, 8(25), 40791–40803. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16584>
- Locke, M., Feisst, V., & Dunbar, P. R. (2011). Concise review: Human adipose-derived stem cells: Separating promise from clinical need. *Stem Cells*, 29(3), 404–411. <https://doi.org/10.1002/stem.593>
- Lv, F.-J., Tuan, R. S., Cheung, K. M. C., & Leung, V. Y. L. (2014). Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 32(6), 1408–1419. <https://doi.org/10.1002/stem.1681>

- Mast, D. D. G., Pigorsch, D. S., Ihrler, P. D. S., Kolk, P. D. D. A., & Betz, P. D. C. (2005). *Kopf-Hals-Malignome - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge* (Vol. W. Zucksch).
- Menezes, M. E., Bhatia, S., Bhoopathi, P., Das, S. K., Emdad, L., Dasgupta, S., ... Fisher, P. B. (2014). MDA-7/IL-24: Multifunctional Cancer Killing Cytokine Mitchell, 818, 127–153. <https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6458-6>
- Michmerhuizen, N. L., Birkeland, A. C., Bradford, C. R., & Brenner, J. C. (2016). Genetic determinants in head and neck squamous cell carcinoma and their influence on global personalized medicine. *Genes & Cancer*, 7(5–6), 182–200. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.110>
- Murphy, M. B., Moncivais, K., & Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: Environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental and Molecular Medicine*, 45(11), e54-16. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.94>
- Nie, C., Yang, D., Xu, J., Si, Z., Jin, X., & Zhang, J. (2011). Locally administered Adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. *Cell Transplantation*, 20(2), 205–216. <https://doi.org/10.3727/096368910X520065>
- Nowicka, A., Marini, F. C., Solley, T. N., Elizondo, P. B., Zhang, Y., Sharp, H. J., ... Klopp, A. H. (2013). Human omental-derived adipose stem cells increase ovarian cancer proliferation, migration, and chemoresistance. *PLoS ONE*, 8(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081859>
- Palumbo, P., Lombardi, F., Siragusa, G., Cifone, M., Cinque, B., & Giuliani, M. (2018). Methods of Isolation, Characterization and Expansion of Human Adipose-Derived Stem Cells (ASCs): An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1897. <https://doi.org/10.3390/ijms19071897>

- Panneerselvam, J., Jin, J., Shanker, M., Lauderdale, J., Bates, J., Wang, Q., ... Ramesh, R. (2015). IL-24 Inhibits lung cancer cell migration and invasion by disrupting the SDF-1/CXCR4 signaling axis. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122439>
- Parrish-Novak, J., Xu, W., Brender, T., Yao, L., Jones, C., West, J., ... Chandrasekher, Y. A. (2002). Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes: Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(49), 47517–47523. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205114200>
- QIAGEN. (2012). RNeasy Mini Handbook. *Sample & Assay Technologies*, (June), 50–54. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77674-3>
- Qomi, R. T., & Sheykhasan, M. (2017). Adipose-derived stromal cell in regenerative medicine: A review. *World Journal of Stem Cells*, *9*(8), 107. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v9.i8.107>
- Ritter, A., Friemel, A., Fornoff, F., Adjan, M., Yuan, J., & Louwen, F. (2015). Characterization of stem cells from subcutaneous and visceral adipose tissues and their function in breast cancer cells, *6*(33).
- Robert Koch-Institut. (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. *Bericht Zum Krebsgeschehen in Deutschland*, 16–77. <https://doi.org/10.17886/rkipubl-2016-014>
- Rowan, B. G., Gimble, J. M., Sheng, M., Anbalagan, M., Jones, R. K., Frazier, T. P., ... Chiu, E. S. (2014). Human adipose tissue-derived stromal/stem cells promote migration and early metastasis of triple negative breast cancer xenografts. *PLoS ONE*, *9*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089595>
- Santamaria-Martínez, A., Barquintero, J., Barbosa-Desongles, A., Hurtado, A., Pinós, T., Seoane, J., ... Munell, F. (2009). Identification of multipotent mesenchymal stromal cells in the reactive stroma of a prostate cancer xenograft by side population analysis. *Experimental Cell Research*, *315*(17), 3004–3013. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.05.007>

- Satish, L., Krill-Burger, J. M., Gallo, P. H., Etages, S. D., Liu, F., Philips, B. J., ... Rubin, J. P. (2015). Expression analysis of human adipose-derived stem cells during in vitro differentiation to an adipocyte lineage. *BMC Med Genomics*, *8*, 41. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0119-8>
- Schweizer, R., Tsuji, W., Gorantla, V. S., Marra, K. G., Rubin, J. P., & Plock, J. A. (2015). The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis. *Stem Cells International*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/120949>
- Scioli, M. G., Bielli, A., Gentile, P., Mazzaglia, D., Cervelli, V., & Orlandi, A. (2014). The biomolecular basis of adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(4), 6517–6526. <https://doi.org/10.3390/ijms15046517>
- Spencer, N. D., Chun, R., Vidal, M. A., Gimble, J. M., & Lopez, M. J. (2008). In vitro expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Computer*, *144*(5), 724–732. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Stefani, F. R., Eberstål, S., Vergani, S., Kristiansen, T. A., & Bengzon, J. (2018). Low-dose irradiated mesenchymal stromal cells break tumor defensive properties in vivo. *International Journal of Cancer*, *143*(9), 2200–2212. <https://doi.org/10.1002/ijc.31599>
- Sun, Z., Wang, S., & Zhao, R. C. (2014). The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *Journal of Hematology and Oncology*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-7-14>
- Thesleff, T., Lehtimäki, K., Niskakangas, T., Mannerström, B., Miettinen, S., Suuronen, R., & Öhman, J. (2011). Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial: A novel method for cranial reconstruction. *Neurosurgery*, *68*(6), 1535–1540. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e31820ee24e>
- Vigneswaran, N., & Williams, M. D. (2014). Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Belgian Cancer Registry*, *26*(2), 74–76. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2014.01.001.Epidemiological>

- Wang, Mai, & Liang, P. (2005). Interleukin-24 and its receptors. *Immunology*, 114(2), 166–170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02094.x>
- Wang, Maonan, Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., ... Guo, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), 761–773. <https://doi.org/10.7150/jca.17648>
- 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 and Therapeutics*, 151, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.03.006>
- Wu, M., Han, Z. B., Liu, J. F., Wang, Y. W., Zhang, J. Z., Li, C. T., ... Zhu, X. P. (2014). Serum-free media and the immunoregulatory properties of mesenchymal stem cells in vivo and in vitro. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33(3), 569–580. <https://doi.org/10.1159/000358635>
- Yagi, H., & Kitagawa, Y. (2013). The role of mesenchymal stem cells in cancer development. *Frontiers in Genetics*, 4(NOV), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00261>
- Yamamoto, M., Nakata, H., Hao, J., Chou, J., Kasugai, S., & Kuroda, S. (2014). Osteogenic Potential of Mouse Adipose-Derived Stem Cells Sorted for CD90 and CD105 In Vitro. *Stem Cells International*, 2014(March), 576358. <https://doi.org/10.1155/2014/576358>
- Zhang, R., & Rosen, J. M. (2018). The role of undifferentiated adipose-derived stem cells in peripheral nerve repair. *Neural Regeneration Research*, 13(5), 757–763. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.232457>
- Zhao, G., Zhu, G., Huang, Y., Zheng, W., Hua, J., Yang, S., ... Ye, J. (2016). IL-6 mediates the signal pathway of JAK-STAT3-VEGF-C promoting growth, invasion and lymphangiogenesis in gastric cancer. *Oncology Reports*, 35(3), 1787–1795. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4544>

Zhu, M., Heydarkhan-Hagvall, S., Hedrick, M., Benhaim, P., & Zuk, P. (2013). Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (79), e50585.
<https://doi.org/10.3791/50585>

Zimmerlin, L., Donnenberg, A. D., Rubin, J. P., Basse, P., Landreneau, R. J., & Donnenberg, V. S. (2011). 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*, 17(1–2), 93–106.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0248>

Zuk, P., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J., Katz, A., ... Hedrick, M. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2).

8. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: pT-Klassifikation | 13 |
| Tabelle 2: pN-Klassifikation | 13 |
| Tabelle 3: pN-Klassifikation von p16-positiven OPSCC | 13 |
| Tabelle 4: pM-Klassifikation..... | 14 |
| Tabelle 5: R-Faktor | 14 |
| Tabelle 6: Stadieneinteilung | 15 |
| Tabelle 7: Stadieneinteilung der p16-positiven OPSCC | 15 |
| Tabelle 8: Grading | 16 |
| Tabelle 9: Kriterien der MSCs, modifiziert nach Dominici et al., 2006..... | 24 |
| Tabelle 10: HNSCC-Zelllinien..... | 30 |
| Tabelle 11: ASC-Zelllinien | 30 |
| Tabelle 12: Medien und Supplemente für die Zellkultur | 31 |
| Tabelle 13: Reagenzien und Chemikalien..... | 34 |
| Tabelle 14: Geräte..... | 35 |
| Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien..... | 37 |
| Tabelle 16: Computerprogramme..... | 37 |
| Tabelle 17: Standardeinstellungen der Bestrahlungseinheit | 40 |
| Tabelle 18: Induktionsmedium der adipogenen Differenzierung | 42 |
| Tabelle 19: Differenzierungsmedium der adipogenen Differenzierung | 42 |
| Tabelle 20: RNA-Isolation..... | 49 |
| Tabelle 21: RNA-Mix | 51 |
| Tabelle 22: Enzym-Mix | 51 |
| Tabelle 23: Primer für die PCR..... | 52 |
| Tabelle 24: PCR-Master-Mix | 52 |
| Tabelle 25: PCR-Programm | 53 |
| Tabelle 26: Definition des Signifikanzniveaus | 55 |
| Tabelle 27: Errechnete p-Werte der Invasionstestung der ASC-Zelllinien MTU-ASC- T10 und MTU-ASC-N11 in einem Versuchsaufbau mit den Kulturmedien XF, XF bestrahlt mit 2 Gy, DMEM und RPMI | 64 |
| Tabelle 28: Errechnete p-Werte der Invasionstestung der ASC-Zelllinien MTU-ASC- T10 und MTU-ASC-N11 in einem Versuchsaufbau mit den Überständen der | |

| | |
|---|----|
| HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 sowie der Zelllinien Cal27 und UD-SCC2, zudem in Kombination mit Bestrahlung der selbigen mit 2 Gy | 65 |
| Tabelle 29: Errechnete p-Werte der Invasionstestung der ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 in einem Versuchsaufbau mit den Überständen der zwei ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 sowie dieser selbst, zudem in Kombination mit Bestrahlung derselbigen mit 2 Gy | 69 |
| Tabelle 30: Errechnete p-Werte der Invasionstestung der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 in einem Versuchsaufbau mit den ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 | 73 |

9. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Entstehungsmodell des HNSCC, modifiziert nach Argiris et al., 2008 | 17 |
| Abbildung 2: Plattenbelegung der adipogenen und osteogenen Differenzierung | 42 |
| Abbildung 3: Übersicht der Kombination der Invasionstestung | 47 |
| Abbildung 4: Aufbau der Invasionstestung | 48 |
| Abbildung 5: Plattenbelegung des Crystal-Violet-Proliferationsessays unter IL-6-Stimulation..... | 54 |
| Abbildung 6: MTU-ASC-T10 am 6. Tag der adipogenen Differenzierung in zehnfacher Vergrößerung | 57 |
| Abbildung 7: Öl-Rot-Färbung von MTU-ASC-T10 nach adipogener Differenzierung | 57 |
| Abbildung 8: Öl-Rot-Färbung von MTU-ASC-N11 nach adipogener Differenzierung | 58 |
| Abbildung 9: Alizarin-Rot-Färbung von MTU-ASC-T10 nach osteogener Differenzierung | 59 |
| Abbildung 10: Alizarin-Rot-Färbung von MTU-ASC-N11 nach osteogener Differenzierung | 59 |
| Abbildung 11: Alcian-Blau-Färbung von MTU-ASC-T10 nach chondrogener Differenzierung | 60 |
| Abbildung 12: Alcian-Blau-Färbung von MTU-ASC-N11 nach chondrogener Differenzierung | 60 |
| Abbildung 13: FACS der ASCS-Zelllinie MTU-ASC-T10 für CD90 | 61 |
| Abbildung 14: FACS der ASCS-Zelllinie MTU-ASC-T10 für CD73 | 62 |
| Abbildung 15: FACS der ASCS-Zelllinie MTU-ASC-T10 für CD105 | 62 |
| Abbildung 16: FACS der ASCS-Zelllinie MTU-ASC-T10 für HLA-DR | 63 |
| Abbildung 17: Invasionstestung der ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 in einem Versuchsaufbau mit den Kulturmedien XF, XF bestrahlt mit 2 Gy, DMEM und RPMI | 64 |
| Abbildung 18: Invasionstestung der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10 in einem Versuchsaufbau mit den Überständen der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 sowie den Zelllinien Cal27 und UD-SCC2, zudem in Kombination mit Bestrahlung derselbigen mit 2 Gy | 66 |
| Abbildung 19: Invasionstestung der ASC-Zelllinie MTU-ASC-N11 in einem Versuchsaufbau mit den Überständen der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD- | |

| | |
|---|----|
| SCC2 sowie den Zelllinien Cal27 und UD-SCC2, zudem in Kombination mit Bestrahlung derselbigen mit 2 Gy | 68 |
| Abbildung 20: Invasionstestung der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10 in einem Versuchsaufbau mit den Überständen der zwei ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 sowie dieser selbst, zudem in Kombination mit Bestrahlung derselbigen mit 2 Gy | 70 |
| Abbildung 21: Invasionstestung der ASC-Zelllinie MTU-ASC-N11 in einem Versuchsaufbau mit den Überständen der zwei ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 sowie dieser selbst, zudem in Kombination mit Bestrahlung derselbigen mit 2 Gy | 71 |
| Abbildung 22: Vergleich der Invasionstestungen der ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 in den oben bereits aufgezeigten Versuchsaufbauten | 72 |
| Abbildung 23: Invasionstestung der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 in einem Versuchsaufbau mit den ASC-Zelllinien MTU-ASC-T10 und MTU-ASC-N11 ... | 73 |
| Abbildung 24: Genexpression von Cal27 und Cal27 nach Bestrahlung mit 2 Gy. Des Weiteren Cal27 sowie Cal27 nach Bestrahlung mit 2 Gy, nach einer 24- stündigen Co-Kultur mit der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10. Jeweils normalisiert auf Cal27 | 74 |
| Abbildung 25: Genexpression von UD-SCC2 und UD-SCC2 nach Bestrahlung mit 2 Gy. Des Weiteren UD-SCC2 sowie UD-SCC2 nach Bestrahlung mit 2 Gy, nach einer 24-stündigen Co-Kultur mit der ASC-Zelllinie MTU-ASC-T10. Jeweils normalisiert auf Cal27 | 75 |
| Abbildung 26: Genexpression von T10 und N11, sowie T10 und N11 nach Bestrahlung mit 2 Gy. Jeweils normalisiert auf Cal27 | 76 |
| Abbildung 27: Genexpression von T10 nach einer 24-stündigen Co-Kultur mit den HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2. Jeweils normalisiert auf Cal27 | 77 |
| Abbildung 28: Genexpression der HNSCC-Zelllinien Cal27 und UD-SCC2 nach 12- bzw. 24-stündiger IL-6-Stimularion. Jeweils normalisiert auf Cal27 | 78 |
| Abbildung 29: Proliferation von Cal27 unter Stimulation von 10pg und 25pg IL-6 ... | 79 |
| Abbildung 30: Proliferation von UD-SCC2 unter Stimultation von 10pg und 25pg IL-6 | 79 |

10. Danksagung

Ich möchte Herrn Professor Dr. med. Henning Bier für die Möglichkeit, diese Arbeit unter wunderbaren Bedingungen in seiner Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde durchführen zu können, danken. Ich möchte zudem mein Beileid an seine Familie, Freunde und Mitarbeiter aussprechen.

Vielen Dank an Frau Professor Dr. med. Anja Pickhard für die Vergabe des spannenden Themas meiner Dissertation und ihre Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung meiner Arbeit. Ihr großes Engagement hat zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Großer Dank gilt Frau Dr. med. Maria Buchberger für die wertvolle Unterstützung bei jeglicher Problemstellung. Jede Phase wurde von ihr geduldig und freundlich betreut und sie hat das Ergebnis dieser Arbeit stark geprägt.

Ich möchte Herrn Guido Piontek für die Einführung in die Methoden dieser Arbeit danken.

Auch möchte ich Frau Dr. rer. nat. Sybille Regn für die Einführung in die Laborarbeit und das Lehren des Umgangs mit den ASCs danken.

Ich bedanke mich bei Frau Professor Dr. med. Stephanie Combs für die freundliche Bereitstellung und Benutzung des Bestrahlungsgeräts.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Laborkollegen für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit im Labor bedanken.

Ebenso vielen Dank an meine lieben Eltern, meine Großeltern, meine Schwester und meine Freunde für die uneingeschränkte Unterstützung in jeder Art und Weise.