

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE
PROF. DR. MED. DR. MED. DENT. TORSTEN E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Effekte mesenchymaler Knochenstammzellen auf Kopf- Hals-Tumorzelllinien in 2D- und 3D- Zellkultur

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anna Franziska Waltera

2022

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE
PROF. DR. MED. DR. MED. DENT. TORSTEN E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Effekte mesenchymaler Knochenstammzellen auf Kopf- Hals-Tumorzelllinien in 2D- und 3D- Zellkultur

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anna Franziska Waltera

2022

Dekan:	Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Richard Bauer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Susanne Grässel
Tag der mündlichen Prüfung:	03.03.2023

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs.....	6
1.1.1	Tumorlokalisation.....	6
1.1.2	Ätiologie.....	6
1.1.3	Karzinogenese.....	7
1.1.4	Epidemiologie.....	10
1.1.5	Klinik.....	12
1.2	Die Tumormikroumgebung in HNSCCs.....	15
1.2.1	Mesenchymale Stammzellen - als zellulärer Bestandteil der Tumormikroumgebung.....	16
1.2.2	MMPs - als azellulärer Bestandteil der Tumormikroumgebung.....	27
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	34
2	MATERIAL UND METHODEN	36
2.1	Material.....	36
2.1.1	Zellen.....	36
2.1.2	Reagenzien.....	38
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	41
2.1.4	Geräte.....	42
2.1.5	Software.....	43
2.2	Methoden.....	44
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	44
2.2.2	Luciferaseassay.....	50
2.2.3	Zymographie.....	53
2.2.4	Spreadingassay.....	60
2.2.5	Statistische Auswertung.....	62
3	ERGEBNISSE	63
3.1	MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen in 2D- vs. 3D-Zellkultur.....	63
3.1.1	Etablierung des Dual-Luciferase [®] Reporter Assays in 3D-Zellkultur.....	63
3.1.2	Ermittlung der MMP-9 Promotoraktivität in HNSCC-Zellen.....	68
3.1.3	Änderung der MMP-9 Promotoraktivität in HNSCC-Zellen bei BMSC Co-Kultivierung.....	69
3.1.4	Einfluss des Verhältnisses aus HNSCC-Zellen und BMSCs auf die MMP-9 Promotoraktivität.....	71
3.2	MMP-9 Proteinexpression in HNSCC-, BMSC- und in Mischsphäroiden.....	74
3.2.1	Ermittlung der MMP-9 Proteinexpression mittels Zymographie.....	74
3.2.2	MMP-9 siRNA KD zur Ermittlung des verantwortlichen Zelltyps für die MMP-9 Synthese in Mischsphäroiden.....	77
3.2.3	MMP-9 Synthese in Mischsphäroiden nach Runx2 siRNA KD in HNSCC-Zellen.....	80
3.3	Ausbreitungsverhalten von HNSCC-, BMSC- und Mischpopulationen auf Matrigel[®].....	82
3.4	Ausbreitungsverhalten von Mischpopulationen auf Levamisol-haltigem Matrigel[®].....	88

4	DISKUSSION	91
4.1	Zellkultivierung	94
4.1.1	Auswahl geeigneter Zellen zur Durchführung der Experimente	94
4.1.2	Vorteile von 3D- gegenüber 2D-Zellkultur	95
4.1.3	Auswahl der unterschiedlichen Gesamtzellzahlen für Sphäroide	97
4.1.4	Gewählte Verhältnisse aus BMSCs und HNSCC-Zellen	98
4.1.5	Co-Kultivierung und konditioniertes Medium	99
4.2	Zellulärer Ursprung der erhöhten MMP-9 Expression in Mischsphäroiden	101
4.2.1	Ermittlung der MMP-9 Promotoraktivität mittels Dual-Luciferase [®] Reporter Assay	102
4.2.2	MMP-9 Proteinexpression mittels Zymographie	110
4.3	Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen und BMSCs fördert Ausbreitung auf Matrigel[®]	112
4.3.1	Adhäsion und Ausbreitung von HNSCC-Sphäroiden	113
4.3.2	Adhäsion und Ausbreitung von Mischsphäroiden	114
4.3.3	Adhäsion und Ausbreitung von BMSC-Sphäroiden	116
4.3.4	Zellmorphologische Beobachtungen	117
4.3.5	Limitationen des Spreadingassays	119
4.4	ALP beeinflusst die Ausbreitung von Mischsphäroiden	120
5	ZUSAMMENFASSUNG	123
6	ANHANG	125
6.1	Zusätzliche Abbildungen	125
6.2	Abkürzungsverzeichnis	130
6.3	Abbildungsverzeichnis	133
6.4	Tabellenverzeichnis	135
6.5	Literaturverzeichnis	136
6.6	Publikation	160
7	DANKSAGUNG	

1 Einleitung

Tumorerkrankungen zählen zu den häufigsten Erkrankungs- und Todesursachen weltweit. Die jährliche Inzidenz liegt bei 14 Millionen Betroffenen. Dabei beläuft sich die jährliche Mortalität auf acht Millionen Fälle (1). Auch in Deutschland stellt Krebs mit fast 500.000 Neuerkrankungen pro Jahr eine der häufigsten Erkrankungsursachen dar (2). Darunter ist das Plattenepithelkarzinom der Kopf- und Halsregion weltweit die siebt-häufigste Malignität (3). Trotz medizinischer Fortschritte liegt die 5-Jahres Überlebensrate von Patienten mit Kopf-Halstumoren (engl.: *head and neck squamous cell carcinomas*, HNSCCs) seit Jahrzehnten immer noch bei etwa 50 %. Die Gründe hierfür sind mitunter die häufig sehr späte Diagnose in bereits weit fortgeschrittenen Stadien sowie die Heterogenität innerhalb der Kopf-Halstumoren (4).

Aktueller Gegenstand der Forschung ist nunmehr nicht nur die Erforschung der Tumoren selbst, sondern auch die Entschlüsselung der Zusammensetzung der Tumormikroumgebung, da diese für die Tumorprogression von entscheidender Bedeutung ist. Hierbei wecken mitunter mesenchymale Stammzellen (engl.: *mesenchymal stem cells*, MSCs) das Interesse. Physiologisch sind MSCs unter anderem an der Wundheilung beteiligt. Ebenfalls können MSCs in Tumorgewebe nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit Tumoren ist ihre Funktion allerdings noch nicht vollständig geklärt. Es gibt widersprüchliche Literatur, die MSCs sowohl tumorfördernde als auch tumorhemmende Eigenschaften zuschreibt (5). In etwa 20 % der HNSCC-Patienten kann auch eine Knocheninvasion beobachtet werden. Interessanterweise korrelieren osteogene Differenzierungsmarker von MSCs der Tumormikroumgebung hierbei mit einer schlechteren Prognose. Diese Arbeit diene dazu den Einfluss von MSCs aus dem Knochenmark auf HNSCC-Zellen weiter aufzuklären. Hierbei lag der Fokus auf der Untersuchung der Expression von Matrixmetalloproteasen (MMPs), insbesondere MMP-9. Bei MMP-9 handelt es sich um ein Schlüsselprotein der Tumorprogression, das Migration und Invasion ermöglicht und somit die Tumormetastasierung begünstigt (6).

1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs

1.1.1 Tumorlokalisation

Unter den Kopf- und Halstumoren wird eine Gruppe von Neoplasien zusammengefasst, die jede Region der Mundhöhle, des Rachenraums (Pharynx und Larynx), *Sinus nasalis* und der Speicheldrüsen befallen kann. Am häufigsten kommt es zur Entstehung von Tumoren an der Lippe, den lateralen Zungenrändern sowie dem Mundboden aus prämaligen Läsionen heraus (7). Bei der überwiegenden Mehrheit der diagnostizierten Kopf- und Halstumoren handelt es sich histologisch um Plattenepithelkarzinome (8). Oft wird der Begriff der Entität der Kopf- und Halstumoren im Austausch mit dem des oralen Plattenepithelkarzinom (engl.: *oral squamous cell carcinoma*, OSCC) verwendet, welches die häufigste aller oralen Neoplasien darstellt. Es wird geschätzt, dass mehr als 90 % aller oralen Neoplasien OSCCs sind (9). Abbildung 1 zeigt schematisch eine Übersicht über die mögliche Lokalisation von HNSCCs.

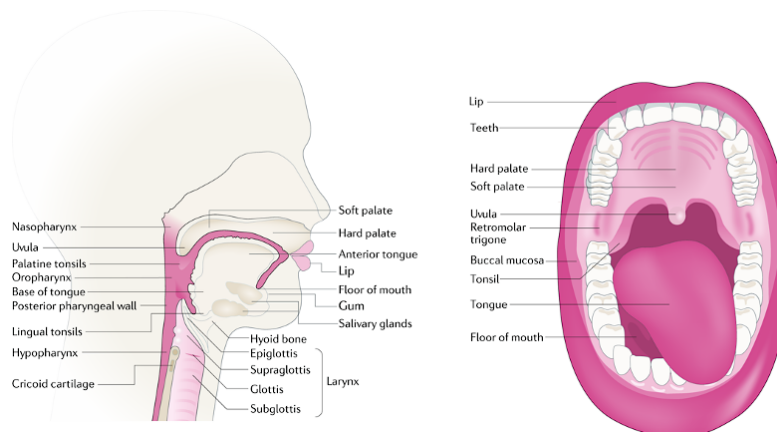


Abbildung 1: Schematische Darstellung möglicher Lokalisationen von HNSCCs. Aus Johnson et al. (4).

1.1.2 Ätiologie

Haupttrisikofaktoren für die Entstehung eines Kopf- und Halstumors sind primär Alkohol- und Tabakkonsum, die für bis zu 75 % der Tumoren verantwortlich gemacht werden (10). Dabei zeigen gemeinsamer Alkohol- und Tabakkonsum ein kumulatives Risiko durch einen synergistischen Effekt. Dieses kann bei sehr starkem Konsum bis um das 35-fache erhöht sein (11).

Neben Alkohol- und Tabakkonsum gilt heutzutage auch eine Infektion mit den onkogenen humanen Papilloma Viren (HPV) insbesondere mit HPV 16 und 18 (12) sowie mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) als Hauptrisikofaktor für Oropharyngeale und Nasopharyngeale Tumoren (13–15). Es wird davon ausgegangen, dass bis zu 20 % der oralen Karzinome und 60-80 % der oropharyngealen Tumoren HPV-assoziiert sind (16).

Diese Noxen sind jedoch nicht die einzigen Einflussfaktoren für die Entwicklung von Kopf-Halstumoren: Insbesondere das sogenannte *betel chewing* – bekannt in Indien und Taiwan – (17,18) sowie andere Rauschmittel, darunter auch Cannabis (19), spielen besonders im asiatischen Raum bei der Entstehung von Kopf-Halstumoren eine Rolle (20).

Auch eine schlechte Mundhygiene (21) sowie genetische Prädispositionen wie die Fanconi Anämie werden als Risikofaktoren für die Entstehung von HNSCCs angesehen (22).

1.1.3 Karzinogenese

Abhängig von ihrer Entstehung werden HNSCCs im Allgemeinen in HPV-positive und HPV-negative Tumoren unterteilt (23).

HPV-negative Tumoren im Kopf- und Halsbereich entstehen oft über Jahre hinweg in einem multifaktoriellen Prozess aus Akkumulation an genetischen und epigenetischen Veränderungen und Dysregulationen in Signalwegen, welche die Entartung von Keratinozyten des Plattenepithels der Mundschleimhaut begünstigen (7). Die Daten des *Cancer Genome Atlas* (TCGA) zeigen bei HPV-negativen HNSCCs eine deutlich höhere Mutationslast als bei HPV-positiven HNSCCs (24). Die Tumorgenese lässt sich histologisch in verschiedene Stadien einteilen, die sich durch den progressiven Verlust von Tumorsuppressorgenen und der Aktivierung Proto-Onkogenen auszeichnen. Initial zeigt sich eine Zellhyperplasie, die in eine Dysplasie (leicht, mittel, schwer) übergeht. Diese wiederum mündet in die Entstehung eines *Carcinoma in situ* (Cis) und schließlich in ein invasives Karzinom (25), welches bei Zerstörung der subepithelialen Basalmembran zu Gewebsinvasion sowie Metastasierung von Tumorzellen führt (7).

Als häufigste Mutation findet sich in etwa 50 % der HNSCCs eine Mutation im Tumorsuppressorgen TP53. Diese kann teilweise bereits in prämaligen Läsionen nachgewiesen werden. Sie ist insgesamt mit einer schlechten Prognose sowie höheren Rezidiv-Raten und Tumoraggressivität assoziiert (26). Daneben finden sich auch häufig Mutationen des

NOTCH1 Gens (15 %), welches als mutiertes Tumorsuppressorgen die Proliferation und Invasion über inflammatorische Zytokine und den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) fördert (26). Auch zeigt sich häufig eine Mutation des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)-Gens (10 %) mit einer Überexpression in 90 % der HNSCCs. Bei EGFR handelt es sich um einen membrangebundenen Tyrosinkinase-Rezeptor, der Zellproliferation, Überleben, Invasion, Metastasierung und Angiogenese vermittelt (26).

In bis zu 12 % der Tumoren finden sich Mutationen des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors 2a (CDKN2a), der über p16 den Zellzyklus reguliert und bei Funktionsverlust mit einer schlechten Prognose einhergeht (26).

Obwohl 90 % der Kopf- und Halstumoren Plattenepithelkarzinome sind, besitzen HNSCCs dennoch eine große genetische Heterogenität beziehungsweise Variabilität. Selbst innerhalb der gleichen anatomischen Subtypen weisen HNSCC-Patienten hochkomplexe molekulare Signaturen, Immuninfiltrationen und Behandlungsreaktionen auf (27). Teilweise können histologischen Stadien jedoch spezifischen genetische Veränderungen zugeordnet werden (28). Abbildung 2 zeigt anhand histologischer Schnitte verschiedener Stadien die Entwicklung von einer normalen Mukosa bis hin zum invasiven Karzinom. Darüber hinaus werden typische Mutationen genannt, die die Tumorprogression in den jeweiligen Stadien vorantreiben (4).

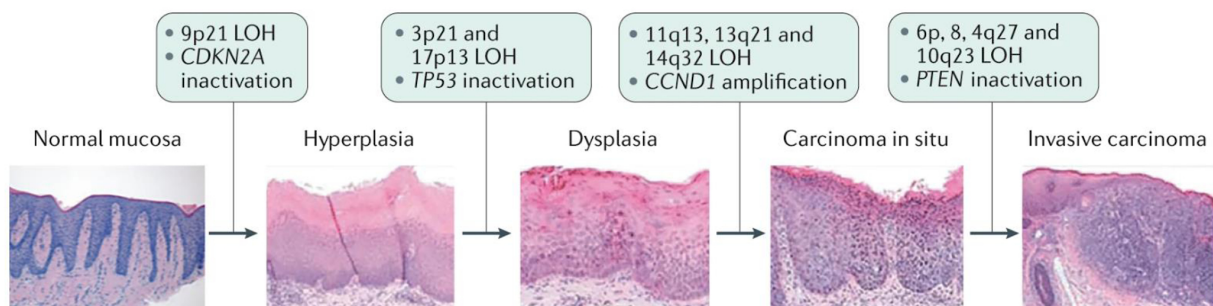


Abbildung 2: Entwicklungsstadien des HNSCCs und typische Mutationen während der Tumorprogression. Aus Johnson et al. (4).

Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass Tabakexposition zu einer Störung der micro (mi)RNA-Regulation führen kann, welche zu Veränderungen wichtiger zellulärer Signalwege und Stoffwechselprozesse führen kann. MiRNAs sind kleine, nicht-codierende RNAs, die bei der posttranskriptionellen Genregulation eine Rolle spielen (29). Die erhöhte Produktion von nikotinhaltigem Nitrosaminketon (NNK), einem karzinogenen Bestandteil von Tabak, führt in

HNSCC-Zellen zu einer Hochregulation der Expression verschiedener onkogener miRNAs, darunter miR-21, miR-155 und miR-944, während die Expression der Tumorsuppressor-miRNA miR-422a in HNSCC-Zellen herunterreguliert wird. Die Hochregulation der Expression von miR-944 in HNSCC-Zellen induziert die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und aktiviert den *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3), was ebenfalls die Karzinogenese begünstigt (30,31).

Darüber hinaus können karzinogene Nitrosamine sowie Acetaldehyd aus Tabak und Alkohol metabolisch aktiviert und kovalent an DNA gebunden werden. Eine Summierung an DNA-Addukten kann zu Hypermutationen und chromosomaler Instabilität führen, die wichtige zelluläre Mechanismen und die Zellhomöostase dysregulieren. Diese Wirkung von Tabak kann durch Alkohol zusätzlich verstärkt werden, da Alkohole als Lösungsmittel fungieren und tabakbedingte Karzinogene in den Schleimhäuten der Kopf- und Halsregion freisetzen können. Darüber hinaus induziert Alkohol das von Cytochrom p450 2E1 (CYP2E1) kodierte Enzym, das den Nitrosamin-Stoffwechsel aktiviert. Alkohol und Tabak wirken folglich synergistisch und fördern die Karzinogenese von HNSCCs (32,33).

In HPV-positiven Tumoren wird das virale Genom häufig in das humane Erbgut integriert. Unterschiedliche Integrationsorte verändern die Genexpression und fördern damit die Karzinogenese (34). Die HPV-DNA-Insertion in das Gen RAD51 homolog 2 (RAD51B), eine Kernkomponente der DNA-Doppelstrangbruchreparatur, fördert die Bildung alternativer Transkripte, wodurch ein nicht funktionelles RAD51-Protein entsteht. HPV E6 und E7 beispielsweise dysregulieren als Onkoproteine verschiedene zelluläre Signalwege, einschließlich der Inaktivierung der Tumorsuppressoren p53 bzw. pRB (35). Die Inaktivierung der Retinoblastom Proteinfamilie (RB1) und des Tumorsuppressor-Proteins p53 fördern durch virale Immunevasion eine Entartung der Keratinozyten (16,36). Neben E6/E7 deutet eine neuere Studie auf einen alternativen onkogenen Mechanismus des E2/E4/E5-Subtyps von HPV-positiven HNSCCs mit episomalem HPV hin, der eine Aktivierung des *fibroblast growth factor receptor* (FGFR) und eine p53-abhängige Zellproliferation zeigt (37). Die Expression von Zellzyklus-assoziierten Genen ist vor allem in HPV-positiven Tumoren deutlich erhöht. Diese Genexpressionsmuster stehen in funktionellem Zusammenhang mit der signifikant höheren Zellproliferationsrate von HPV-positiven Tumorzellen (38).

1.1.4 Epidemiologie

Das HNSCC stellt mittlerweile die siebthäufigste Tumorentität weltweit dar. Im Jahr 2020 waren 880.000 Neudiagnosen und 470.000 Tote mit Kopf- und Halstumoren assoziiert (3). Dabei sind regionale Unterschiede zu beachten: In Pakistan und Indien wird davon ausgegangen, dass Hals- und Kopftumoren sogar 10 % bzw. 45 % der dortigen Krebserkrankungen ausmachen (39). In Europa zeigte sich im Jahr 2012 eine Inzidenz von ungefähr 250.000 und 63.500 Todesfällen aufgrund von Kopf- und Halstumoren (40). In Deutschland hat sich die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen seit den 70er Jahren fast verdoppelt (41). Hier lag die Inzidenz 2018 zuletzt bei 14.310. Im Jahr 2018 wurden 5.412 Sterbefälle in Deutschland registriert (42). Das Robert Koch Institut sieht bei seiner Prognose für das Jahr 2022 keine Veränderung bzw. Verbesserung der epidemiologischen Daten in Deutschland (42).

Abbildung 3 zeigt eine Karte zur Übersicht der weltweiten Inzidenz von HNSCC im Jahr 2020. Die Häufigkeit wird über die Blaufärbung definiert, wobei eine intensivere Färbung mit einer höheren, altersbezogenen Inzidenz beider Geschlechter pro 100.000 Einwohner korreliert. Hier wurden Tumoren im Bereich der Lippe, Mundhöhle, Hypo-, Oro, Nasopharynx und Larynx inkludiert.

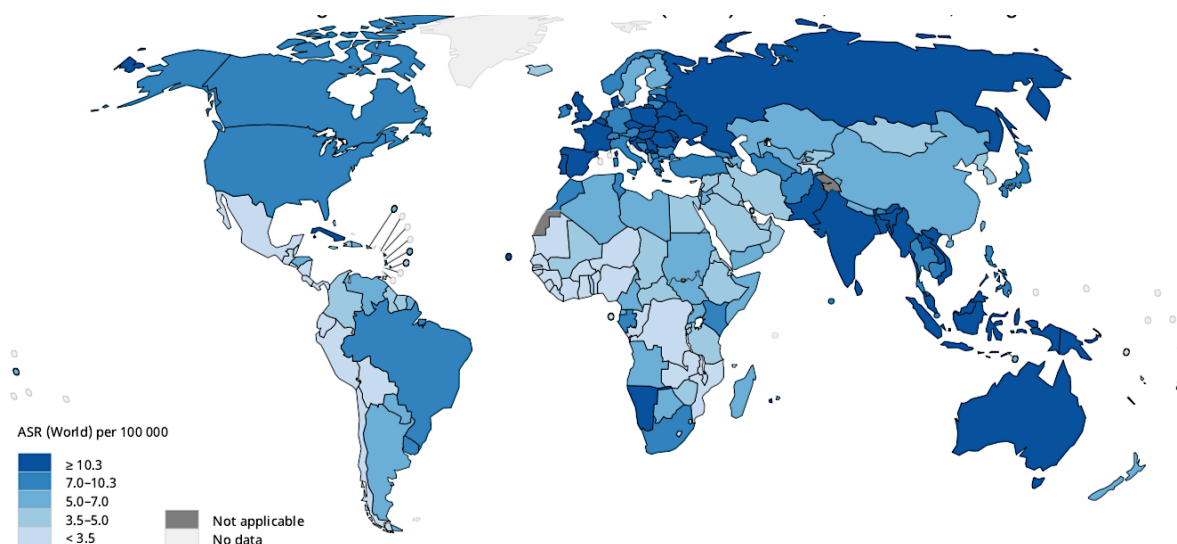


Abbildung 3: Weltweite Inzidenz von HNSCC im Jahr 2020. Aus Globocan 2020 (3,43).

Im Allgemeinen steigt die Wahrscheinlichkeit an Kopf-Halstumoren zu erkranken mit zunehmendem Alter. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für alle Tumoren der Mundhöhle bei 64 Jahren (44). Abbildung 4 zeigt eine Statistik des RKI in Deutschland für die Jahre 2017-2018. Dargestellt wird die Inzidenz von Tumoren der Mundhöhle und des Rachenraumes in Abhängigkeit des Geschlechts (Frauen: rot, Männer: blau) und des Alters (5-Jahresschritte von 0 bis >85 Jahre). Hier wird ebenfalls deutlich, dass das Risiko für die Entstehung eines HNSCC bei Männern grundsätzlich zwei bis dreimal höher ist als bei Frauen (3).

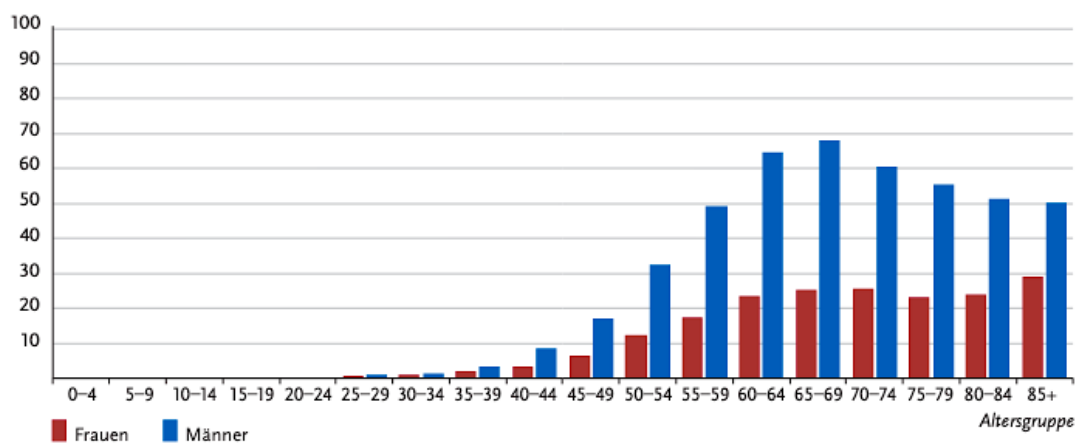


Abbildung 4: Altersspezifische Neuerkrankungsrate an Tumoren der Mundhöhle und des Rachens unterteilt nach Geschlecht. Daten des RKI in Deutschland für die Jahre 2017-2018 (42).

Eine Erklärung dafür, dass mit zunehmendem Alter das Risiko an HNSCC zu erkranken steigt, ist die Anhäufung von Mutationen, die die Karzinogenese begünstigen. Dennoch zeigen jüngste Daten, dass nunmehr nicht nur Menschen mittleren und hohen Alters betroffen sind, sondern zunehmend auch eine jüngere Altersgruppe zwischen 18 und 44 Jahren (45). Dies ist vor allem durch den Anstieg HPV-positiver HNSCCs (oropharyngeale Tumoren) in den letzten Jahrzehnten zu begründen. Dies zeigt sich besonders in Nordamerika und Europa, und zwar verstärkt in jüngeren Altersgruppen (15,46). Der Effekt könnte noch bis ins Jahr 2060 aufgrund von Latenzen bezüglich der HPV-Impfung, die die Zulassung in den frühen 2000ern erhielt, andauern (15). Für HPV-assoziierte Tumoren liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 53 Jahren (47). Damit verbunden ist zudem eine steigende Zahl an HNSCC bei weißen Frauen (48). Die hohe Prävalenz an Kopf- und Halstumoren in Asien und Australien wird dagegen überwiegend noch auf den Konsum karzinogener Produkte zurückgeführt (49).

1.1.5 Klinik

1.1.5.1 Symptome

Bemerkbar werden HNSCCs oftmals als schmerzlose, ulzerierende, nicht heilende Wunden der oralen Mukosa. Tumoren an versteckteren Stellen, wie den Tonsillen, dem Zungengrund und des Hypopharynx, werden meist erst spät durch Dysphagie, Odynophagie und Otalgie durch den Patienten entdeckt. Laryngeale Tumoren fallen oft durch länger anhaltende Heiserkeit auf. Bei HPV-positiven HNSCCs führt oft eine schmerzlose Tumormasse am Hals zur Diagnose (4). HNSCCs entstehen zudem oftmals aus präkanzerösen Veränderungen der Mundschleimhaut. Zu diesen potentiell malignen Erkrankungen der Mundhöhle gehören unter anderem die Leukoplakie und Erythroplakie (50). Diese können als Präkanzerosen über Jahre schließlich zur Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms führen (7). Abbildung 5 zeigt typische klinische Präsentationen eines asymptomatisch ulzerierendes Plattenepithelkarzinoms der Wangenschleimhaut sowie einer maligne entarteten Leukoplakie des Zungenrandes.

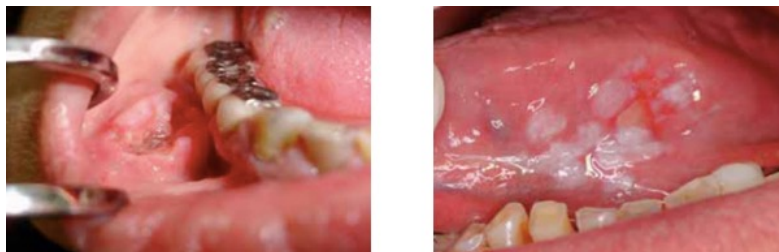


Abbildung 5: Exophytisch wachsendes Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (links) und maligne entartete Leukoplakie des Zungenrandes (rechts). Aus Markopoulos (51).

1.1.5.2 Diagnose und Staging

Die Diagnose des HNSCCs erfolgt über eine Biopsie und histopathologische Gewebsuntersuchung, in dem auch der HPV-Status getestet wird (4). Problematisch ist, dass HNSCCs oftmals aufgrund von Fehldiagnosen oder einer falschen Einschätzung der Symptome seitens der Patienten erst in einem bereits weit fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden (52).

Der Diagnose folgt ein umfangreiches, vom Tumorsubtyp unabhängiges, *Staging* bestehend aus klinischer Untersuchung, Laryngoskopie, CT oder MRT der Kopf- und Halsregion, CT-Thorax und Sonografie des Abdomens. Das *Staging* erfolgt anhand des TNM-Schemas. Seit 2017 bezieht die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) dabei auch die Eindringtiefe (engl.: *depth of invasion*, DOI), den HPV-Status und die Lymphknotenkapsel-Überschreitung mit ein (4). Die Mehrheit der Patienten zeigt bei Diagnose einen fortgeschrittenen Tumor mit Lymphknotenmetastasierung (53). Die Diagnose und Therapie des HNSCC gestaltet sich oft schwierig, da eine frühe Invasion von zervikalen Lymphknoten und Fernmetastasierung der oralen Keratinozyten stattfindet (54).

1.1.5.3 Therapie und Prognose

Klassische Therapieformen des HPV-negativen HNSCCs beinhalten die chirurgische Tumorresektion, Chemotherapie und Strahlentherapie. In vielen Fällen sind diese weitestgehend, trotz der Verbesserungen im Therapieregime, ineffektiv und können zudem die Lebensqualität stark einschränken (55).

Die Prognose richtet sich nach Tumorgröße, Lymphknotenstatus sowie Metastasierung (53). Mindestens 50 % der Patienten mit lokal-fortgeschrittener Erkrankung entwickeln im Verlauf lokale Rezidive oder Metastasen (56). Die 5-Jahres-Überlebensrate (JÜLR) hat sich trotz erweiterter Therapiemöglichkeiten in den letzten 50 Jahren (bis ins Jahr 2000) nicht wesentlich verbessert (57) und bewegt sich zwischen 40 % und 60 % (52,58). Auch im Jahr 2018 lag in Deutschland die relative 5-JÜLR bei 52-62 %. Diese zeigte sich vor allem abhängig von Geschlecht und UICC-Stadium. Das UICC-Stadium IV ist mit einer 5-JÜLR von lediglich 40-43 % verknüpft. Männer zeigten je nach Stadium eine bis um 14 Prozentpunkte niedrigere 5-JÜLR gegenüber Frauen (42). Im Zeitraum 2002-2006 kam es, verglichen mit dem Zeitraum 1992-1996, insgesamt zu einer moderaten Erhöhung der 5-JÜLR von 55 % auf 66 %. Hiervon ausgenommen sind Tumoren des Larynx sowie Patienten älter als 75 Jahre, bei denen sich keine Veränderungen der Überlebensrate zeigte. Die leichte Verbesserung der allgemeinen Überlebensrate von Patienten mit HNSCC wird vor allem auf die Zunahme an HPV-positiven Tumoren und das damit verbundene niedrigere mittlere Erkrankungsalter sowie das weitaus bessere Therapieansprechen zurückgeführt (40,59).

Bisher fehlen Optionen einer personalisierten oder zielgerichteten (engl.: *targeted*) Therapie, so dass neben der operativen Entfernung von HNSCCs die Bestrahlung die Therapiemethode der Wahl bleibt (55). Die oft unzureichenden Therapieerfolge mögen auch im Zusammenhang mit der enormen Vielfalt an Subtypen (klinisch, histologisch und auf molekularer Ebene) von HNSCCs und deren genetischer Variabilität stehen (27,55).

In den letzten Jahren haben jedoch Fortschritte in der Immuntherapie Hoffnung gegeben, die vor allem bei Patienten mit metastasiertem und rezidiviertem HNSCC teilweise enorme Erfolge erzielt haben (60). Insbesondere für palliative Patienten mit metastasiertem Kopf-Hals-Karzinom sowie nicht resezierbarem Rezidiv ist eine Therapie mit Nivolumab und Pembrolizumab, monoklonale Antikörper zur PD-1 Inhibition, je nach PD-1/PD-L1-Status Erstlinientherapie (61). Leider profitieren im Moment nur etwa 20 % der Patienten von dieser Therapieform. Tatsächlich besteht bei einzelnen Patienten sogar die Gefahr eines schnellen Tumorprogresses, einer sogenannten Hyperprogression. Die Mechanismen, die zu solch unerwarteten Effekten führen sind bis heute nicht geklärt (62).

Während Patienten mit einem Tumor in frühen Stadien - das sind nur 30-40 % der Patienten - oft alleine mit chirurgischen Resektion oder definitiver Bestrahlung geheilt werden können und von Langzeitüberlebensraten von 70-90 % profitieren (63), gestalten sich die Therapiemöglichkeiten beim fortgeschrittenen Tumor umso schwieriger. Wobei mit 75 % bereits ein Großteil der Patienten den Status eines lokalisierten oder lokal-fortgeschrittenen Tumors hat (64). Hier zeigen sich trotz adäquater Therapie lediglich Überlebensraten von weniger als 50 % (64).

Die Prognose für die Untergruppe der HPV-positiven HNSCCs fällt insgesamt vielversprechender aus (38). Mit einem besseren Ansprechen auf Chemotherapie und Bestrahlung weisen Patienten mit HPV-positiven Karzinomen generell weniger Komorbiditäten auf als Patienten mit Alkoholabusus und Tabakkonsum in der Vorgeschichte (65,66).

1.2 Die Tumormikroumgebung in HNSCCs

Tumorgewebe stellt nicht, wie lange angenommen, ein homogenes Gewebe dar, das sich ausschließlich aus einheitlichen Tumorzellen mit einer bestimmten Charakteristik zusammensetzt. Neben Tumorzellen unterschiedlicher molekularer Veränderungen und Differenzierungsgrade tragen auch Stromazellen, darunter Immunzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und MSCs, zur Gesamtheit des Tumorgewebes bei (67–69). Zusammengefasst unter dem Begriff “Mikroumgebung des Tumors” (TME) kommt eben diesen Zellen und deren Interaktion mit Tumorzellen eine immer größere Bedeutung zu. MSCs stellen dabei eine zentrale Rolle in der Gestaltung des Tumormilieus dar.

Abbildung 6 zeigt eine Illustration aus dem bekannten Review von Hanahan und Weinberg aus dem Jahre 2011 (69). Diese veranschaulicht bildlich die Heterogenität des Tumorgewebes unter anderem bestehen aus Tumorzellen verschiedener Differenzierungsstadien, Immunzellen, Stoma-Progenitorzellen wie mesenchymalen Stammzellen und einwachsenden Blutgefäßen. Mit dieser Abbildung soll ebenfalls verdeutlicht werden, dass die Zusammensetzung des Tumorgewebes keinesfalls statisch und definiert ist, sondern sich je nach Differenzierungsstatus vom Primärtumor zum invasiven Tumor entwickeln kann. Nach der Ansiedlung einer Metastase fernab des Primärtumors kann diese Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede zum Primärtumor ausweisen.

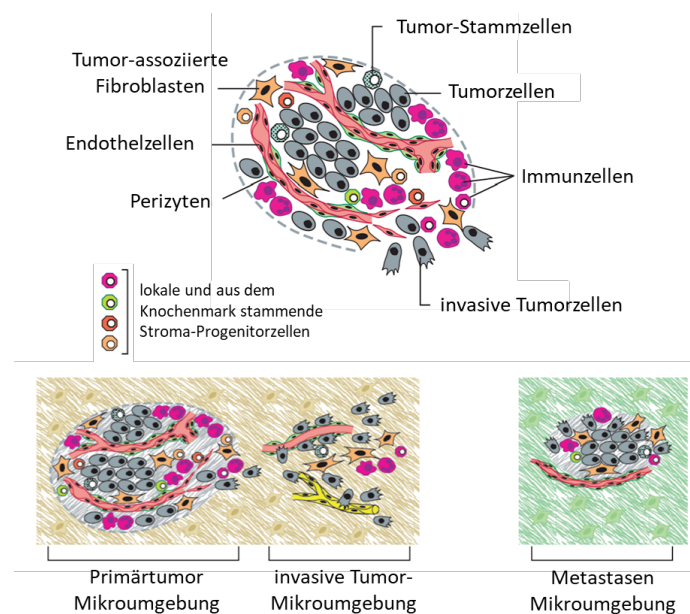


Abbildung 6: Zusammensetzung des Tumorgewebes. Modifiziert nach Hanahan und Weinberg (69).

1.2.1 Mesenchymale Stammzellen - als zellulärer Bestandteil der Tumormikroumgebung

MSCs werden in der Regel an verletztes Gewebe rekrutiert, wo sie zur Gewebereparatur, zum Gewebeumbau und zur Wundheilung beitragen sollen. Tumoren werden durch die langanhaltende Inflammation, die sie verursachen als "nie heilende Wunde" bezeichnet. So lässt sich erklären, weshalb MSCs ebenfalls in die hypoxische Tumor-Mikroumgebung rekrutiert werden. Diese Eigenschaft hat die MSCs als potenzielle therapeutische Vehikel für die Verabreichung von Krebsmedikamenten und -genen ins Rampenlicht gerückt. Ihre Rolle im Tumor und dem Tumorstroma sowie ihr Beitrag für den Tumormetabolismus sind noch nicht vollständig geklärt.

1.2.1.1 Ursprung und Charakteristika

MSCs sind multipotente Stammzellen. Neben ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung (70) besitzen sie, wie in Abbildung 7 schematisch dargestellt, auch die Eigenschaft sich adipogen, osteogen oder chondrogen zu differenzieren (71,72). Seit der ersten *in vitro* Kultivierung von MSCs aus Knochenmark durch Friedstein *et al.* (73) sind sie intensiver Gegenstand biomedizinischer Forschung.

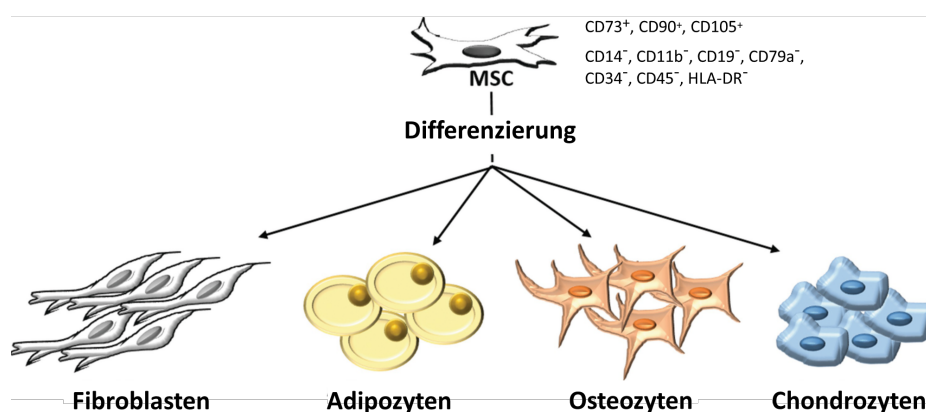


Abbildung 7: Differenzierung von MSCs. Modifiziert nach Atiya *et al.* (74).

MSCs konnten bisher aus einer Vielzahl an adulten und fetalen Geweben isoliert werden. Besonders das Knochenmark und Fettgewebe stellen eine gute Quelle für MSCs dar (71,75).

Ebenso können MSCs aus peripherem Blut, der Dermis, Leber, Haut, quergestreifter Muskulatur, Nabelschnur und Plazenta als auch aus der dentalen Pulpa isoliert werden (76–81,75,82). Abbildung 8 zeigt eine Übersicht geeigneter Gewebe zur Isolation von MSCs. Für die Durchführung dieser Arbeit wurden MSCs aus Knochenmark isoliert.

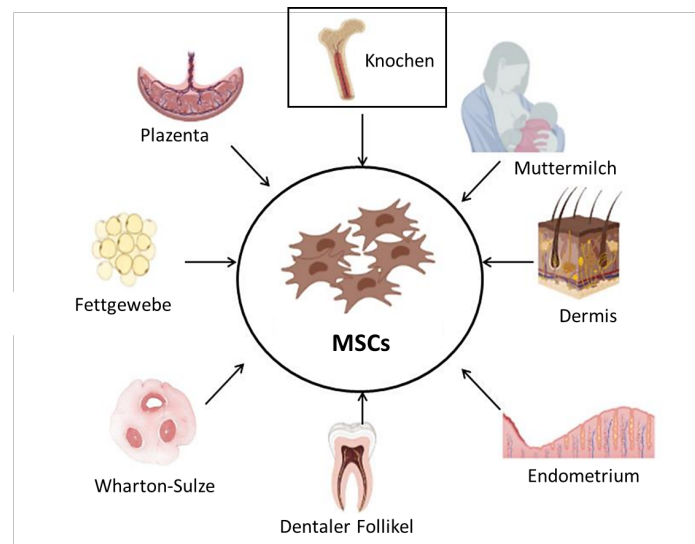


Abbildung 8: Geeignete Gewebe zur Isolation von MSCs. Modifiziert nach Dzobo et al. (83).

Endogene Funktionen von MSCs sind die Blutbildung, Geweberegeneration und Wundheilung. Dies geschieht unter anderem durch parakrine Mechanismen (84). In Abhängigkeit von externen Stimuli und ihrer Lokalisation sind diese Stammzellen auch zur Differenzierung in Hepatozyten, Fibroblasten und Perizyten fähig (85,86). Im Knochenmark befinden sich neben MSCs auch hämatopoetische Stammzellen (HSC), Osteoblasten, Osteoklasten, Endothelzellen, Adipozyten und Stromazellen (87). Dort können MSCs hämatopoetische Stammzellen (HSCs) in der Blutbildung unterstützen (88). MSCs selbst wirken durch ihre Fähigkeit zur Differenzierung in Osteoblasten am Aufbau von Knochenmatrix mit. Dabei sind der Runx2-Transkriptionsfaktor, die Alkalische Phosphatase (ALP), Osteopontin und Osteocalcin beteiligt, die auch als osteogene Differenzierungsmarker zum Einsatz kommen (89).

MSCs wandern auch in geschädigtes, inflammatorisches und hypoxisches Gewebe ein und sind dort fähig die Immunantwort zu regulieren (90–92). Sie sind an der Regeneration einer Vielzahl von Geweben beteiligt, so zum Beispiel der Lunge, der Leber, des Gehirns und des Herzens (93–96). Dort differenzieren MSCs zu Fibroblasten und Perizyten (97), die verschiedene

Matrixproteine und Zytokine ausschütten, darunter der *Vascular Endothelial growth factor* (VEGF) und *Platelet-derived growth factor* (PDGF), und so die Gewebeproliferation und Vaskularisierung fördern (98).

Im Jahr 2006 wurden von der *International Society for Cellular Therapy* Mindestkriterien definiert, die Zellen erfüllen müssen, um als MSCs deklariert zu werden. Charakterisierend ist demnach für alle MSCs, sich sowohl zu Chondroblasten, Osteoblasten als auch zu Adipozyten *in vitro* zu differenzieren. Auch eine starke Adhäsion an Plastik, unter Standardkultivierungsmethoden, ist obligat. Genau diese Eigenschaft macht *in vitro* Experimente mit MSCs möglich. Für MSCs sind keine spezifischen Oberflächenmarker bekannt. Zellen werden als MSCs bezeichnet, wenn 95 % der Zellen einer Population positiv für die Oberflächenzellmarker *Cluster of Differentiation* (CD)73, CD90 und CD105 getestet werden und weniger als 2 % eine Expression von CD14, CD11b, CD19, CD79a, CD34, CD45 und dem humanen Leukozyten-Antigen-Heterodimer HLA-DR aufweisen (71) (siehe ebenfalls Abbildung 7).

1.2.1.2 Einfluss von MSCs auf Tumorzellen

Tumoren sind durch ein inflammatorisches Gewebe gekennzeichnet und vergleichbar mit einer nicht heilenden Wunde. Daher steht die Rolle von MSCs in der Wundheilung auch in engem Zusammenhang mit ihrer Funktion in Tumoren (99,100). Ihre Rolle im Tumor und dem Tumorstroma sowie ihr Beitrag für den Tumormetabolismus sind noch nicht vollständig geklärt. Aktuell existieren verschiedene experimentelle und klinische Studien, die teilweise widersprüchliche Auswirkungen darlegen (101). Diese Effekte müssen jedoch in Abhängigkeit von beispielsweise MSC- und Tumorsprung in ihrem jeweiligen Kontext betrachtet werden (74).

Sowohl lokale als auch fern gelegene MSCs können in Tumoren einwandern (70,102) und dort Teil des Tumorstromas oder auch des Tumors selbst werden (103). Diese werden durch verschiedenste, von Tumorzellen ausgeschüttete Wachstumsfaktoren und inflammatorische Zytokine in die unmittelbare Umgebung des Tumors gelockt. So können MSCs aus dem Knochenmark in verschiedenen epithelialen Tumoren vorgefunden werden, unter anderem auch in der Tumorumgebung von HNSCCs (104–106).

Abbildung 9 zeigt eine Übersicht über die gegensätzliche Beeinflussung von HNSCCs durch MSCs anhand aktueller Literatur. Aufgeführt sind primär Studien *in vivo*.

Folgende Arbeiten zeigten einen tumorfördernden Einfluss von MSCs im HNSCC: Angiogenese (a) Li et al. (107), Invasion und Metastasierung (b) Liu et al. (108), (c) Wang et al. (109), (d) Rowan et al. (110), (e) Wu et al. (111), (f) Hong et al. (112), (g) Shi et al. (113), *Immunevasion* (h) Chen et al. (114), (i) Liotta et al. (104), Therapieresistenz (j) Liu et al. (115) und Tumorproliferation (b) Liu et al. (108), (e) Wu et al. (111), (g) Shi et al. (113), (j) Liu et al. (115), (k) Kansy et al. (116) und (l) Zielske et al. (117). Keinen nachweisbaren Effekt von MSCs auf HNSCCs zeigten (m) Tan et al. (118). Tumordinhibierenden Einfluss von MSCs auf HNSCCs zeigten (n) Bruna et al. (119), und (o) Bruna et al. (120) im Zusammenhang mit Tumorwachstum und Differenzierung, sowie (p) Wang et al. (121) und (q) Ji et al. (122) im Zusammenhang mit der Induktion von Apoptose in HNSCC-Zellen.

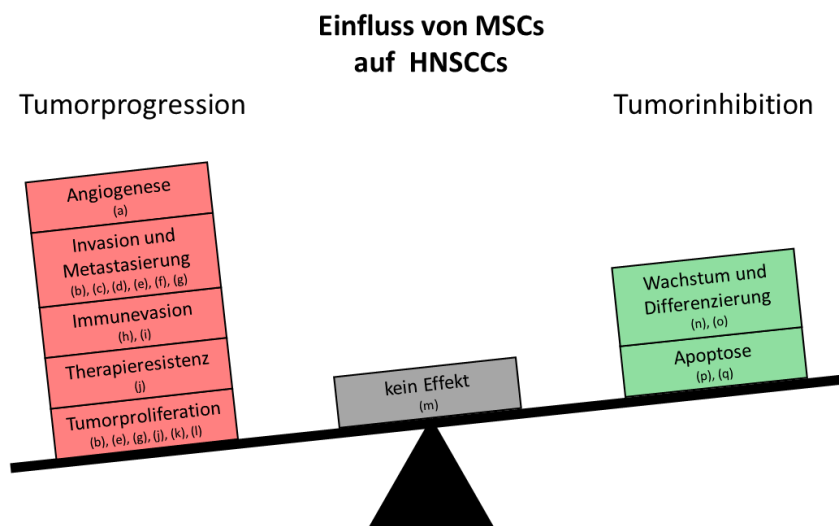


Abbildung 9: Einfluss von MSCs auf die Tumorprogression und Tumorsuppression von HNSCCs. Aktuelle Literatur (Stand Januar 2022) gewichtet die tumorfördernden Eigenschaften von MSCs auf HNSCCs stärker als die tumordinhibierenden Eigenschaften.

1.2.1.2.1 Begünstigung der Tumorprogression

Die Mehrheit der Studien schreibt den MSCs im Moment eine Förderung der Tumorprogression zu. MSCs wandern in das Tumorstroma ein und stimulieren dort das Tumorwachstum und die Metastasierung. Sie können als Teil des HNSCC assoziierten Tumorstromas mitverantwortlich

sein für die Angio- und Lymphogenese, die Modulation des Immunsystems und die Produktion von Tumor-assoziierten Fibroblasten (TAF) (105).

Im Jahr 2000 wurden von Hanahan und Weinberg die erstmals sogenannten *hallmarks of cancer* definiert: Sechs Eigenschaften, die allen Tumoren gemein sind (69). Eine dieser charakteristischen Eigenschaften ist die Förderung der Angiogenese zur Versorgung des schnell proliferierenden Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen. Diese ist essenziell, um eine Unterversorgung und damit letztendlich den Zelltod zu vermeiden. MSCs können durch Differenzierung in Perizyten und endothelähnliche Zellen sowie durch Sekretion von Gefäßbildungs-fördernden Faktoren, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und trophischen Faktoren, die auch durch die Tumorzellen selbst sezerniert werden, die Neovaskularisation des Tumors beeinflussen (97,123,124). In Co-Kultur von MSCs und Tumorzellen konnten erhöhte Angiogenese-fördernde Faktoren wie Interleukin (IL)-6, VEGF und *Fibroblast Growth Factor* (FGF)-2 nachgewiesen werden (97). Es konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition des IL-6/ET-1/Akt-Signalweges Tumorwachstum und -angiogenese reduziert wurden (125). Des Weiteren zeigte sich im hypoxischen Tumorgewebe eine vermehrte Expression von VEGF durch MSCs, welches die Gefäßstabilität erhöht und die Tumor-Angiogenese *in vitro* fördert (98,126). *In vivo* Experimente im Xenograft-Tumormodell (PDX) konnten zeigen, dass MSCs nach Bestrahlung durch vermehrte Ausschüttung des Zytokins *Stromal Cell-derived Factor* (SDF)-1, auch bekannt als CXCL-12, und des *Platelet-derived growth factor* (PDGF)-B, von Tumorzellen, in die Tumorumgebung gelockt werden und sich dort zu Perizyten differenzieren können. Dort stellen sie das Tumorwachstum sicher und fördern die erforderliche Gefäßneubildung (127). So beeinflussen MSCs die Angiogenese direkt als Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Perizyten oder Perizyten-ähnliche Zellen (128).

Aktuell werden immer mehr Mechanismen der Tumor-Metastasierung erforscht. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass MSCs die Metastasierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* initiieren können (129–133). MSCs und Tumorzellen sollen synergistische Wirkung auf die Tumor-Metastasierung haben (134). Eine der ersten Studien, die MSCs in Zusammenhang mit vermehrter Metastasierung brachte, konnte zeigen, dass MSCs nach Kontakt mit Brust-Tumorzellen das Chemokin CCL5 ausschütteten, welches für eine erleichterte Metastasierung, Invasivität und Zellmigration verantwortlich ist (129). Daneben wurde auch die Metastasierung von Prostata-Tumorzellen durch MSCs mittels CCL5 erhöht (135). Die vermehrte Ausschüttung von CCL5 durch MSCs kann über die Sekretion des *Insulin-like Growth Factor*

(IGF)-1 (136), dem pro-inflammatorischen Cathelicidin LL-37 (137) sowie Osteopontin (138) durch Tumorzellen angestoßen werden.

Die Präsenz von MSCs kann dazu beitragen, auch die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) zu fördern. EMT ist ein wichtiger Schritt in der Organogenese, Wundheilung, aber auch in der Metastasierung von Tumoren, Entstehung von Medikamenten-Resistenzen (139) und trägt damit zu einem invasiven Phänotyp des Tumors bei (140). EMT zeichnet sich durch den Verlust der Zellpolarität und einer Herabregulation von epithelialen Proteinen, wie E-Cadherin und des *Zonula occludens* Protein ZO-1, aus, welche die Zell-Zell Adhäsion begünstigen würden. Die Zellen nehmen dagegen einen mesenchymalen Genexpressionscharakter an (N-Cadherin, Vimentin, Fibronectin und *Smooth Muscle Actin* (SMA)) (141,142). MSCs konnten die Metastasierung durch EMT, mit Verlust von E-Cadherin und vermehrter Expression von N-Cadherin, Vimentin, Twist und Snail in Co-Kultur mit Brustkrebs- (143) und Magenkarzinomzellen erleichtern (144).

Abbildung 10 aus dem Nature Review von Shi et al. zeigt die Interaktion von MSCs mit Tumorzellen im Rahmen der Tumorprogression (145). Durch die extrazelluläre Matrix (EZM) wandern lokale und distale MSCs ins Tumormilieu ein und werden zu Tumor-assoziierten (TA)-MSCs. Hier regulieren TA-MSCs die Tumorproliferation, die Metastasierung und die Reaktion auf Chemo- und Strahlentherapie, indem sie Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine sezernieren. Die Sezernierung von MMPs unterstützt Tumorzellen bei der Metastasierung.

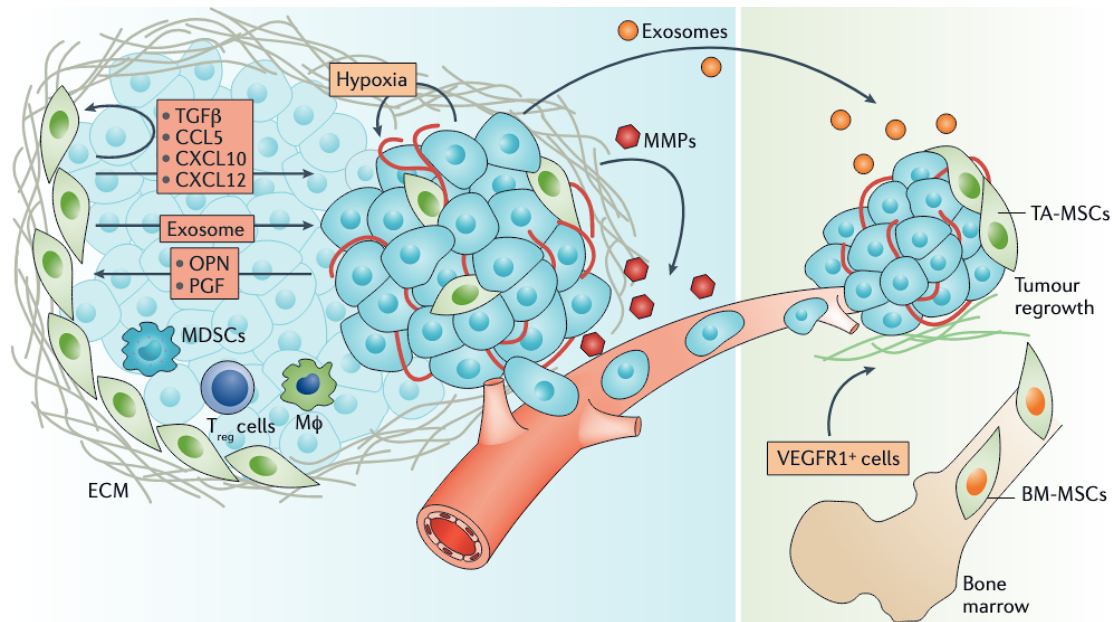


Abbildung 10: Interaktion von MSCs mit Tumorzellen im Rahmen der Tumorprogression. MSCs (grün) interagieren mit Tumorzellen (türkis) in der Tumormikroumgebung (links) und in Metastasen (rechts). Aus Shi et al. (145).

Neben Tumorzellen und MSCs finden sich auch Fibroblasten im Tumorstroma (68,69). Fibroblasten und Myofibroblasten, die sich in der Tumorumgebung befinden, können zu sogenannten TAFs aktiviert werden, einer heterogenen Population an Fibroblasten-ähnlichen Zellen, die mit einer hohen Tumoraggressivität assoziiert sind. TAFs finden sich in einer hohen Zahl in besonders invasiven Tumoren und sind charakterisiert durch ihre Expression von Fibroblasten-Proteinen wie α -SMA und *Fibroblast-specific Protein* (FSP)-1 (146). Auch MSCs besitzen das Potential einen TAF Phänotyp im Tumorgewebe anzunehmen (97,147,148). MSCs aus Tumormetastasen zeigen einen TAF Phänotyp mit α -SMA, Tenascin-c, SDF-1, FSP-1, MMP-2 und MMP-9 Überexpression sowie erleichtertes Wachstum und Metastasierung (138,149). Auch die EMT der Tumorzellen wird durch die Differenzierung von MSCs in TAFs gefördert (150–152).

Zudem besitzen MSCs einen immunsuppressiven Effekt, der dazu beitragen kann, die Tumor-Invasion und Tumorprogression zu begünstigen. Die Einflussnahme der MSCs auf die Regulation des Immunsystems findet sich in ihrer Fähigkeit die Funktion einer Reihe von Immunzellen wie B- und T-Lymphozyten sowie natürlichen Killerzellen (NKs) und die Reifung von dendritischen Zellen (engl.: *dendritic cells*, DCs) zu supprimieren (153–157). Durch die Sezernierung von IL-6 fördern MSCs die Bildung von myeloiden Suppressorzellen aus DCs, die wiederum MMP-9, PD-L1 und PD-L2 produzieren (5). PD-L1 und PD-L2 sind Liganden des Immuncheckpoints PD-1 und können NKs sowie zytotoxische T-Zellen bei ihrer Ausführung einer anti-tumoralen Immunantwort inhibieren (158). MSC können die Proliferation von NKs und deren zytotoxische Aktivität durch Sekretion von beispielsweise PGE2 undIDO unterbinden (5). Aus MSCs stammendes IL-6 konnte in neutrophilen Granulozyten Apoptose verhindern (83). Auch pro-inflammatorischen T-Zellen wie Th1 und Th17 werden durch Sekretion PD-1, PGE2, und IL-10 inhibiert, während Th2 durch IL-4 stimuliert werden. CD8⁺T-Zellen werden in ihrer Proliferation, Zytotoxizität und Ausschüttung von Zytokinen durch von MSCs ausgeschüttetes Stickstoffmonoxid (NO) gehemmt (159). Auch die Induktion über TGF- β zur Bildung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) hilft dem Tumor, eine gezielte Immunreaktion zu umgehen (160). Durch MSCs kann ein Wechsel von tumorhemmenden M1 Makrophagen zu M2 Makrophagen, die über VEGF die Angiogenese fördern, stattfinden (161). Des Weiteren kann die B-Zell Proliferation, Aktivierung und Differenzierung durch MSCs gehemmt werden (155). Die immunsuppressiven Funktionen sind mit einem MSC2 Phänotyp assoziiert (162).

Abbildung 11 zeigt eine schematische Übersicht des immunsuppressiven Einflusses von MSCs im Tumormilieu. Hier wird der Einfluss der jeweiligen Faktoren auf die unterschiedlichen Zelltypen, die Bestandteil des Immunsystems sind, auf dem aktuellen Stand der Forschung zusammengefasst.

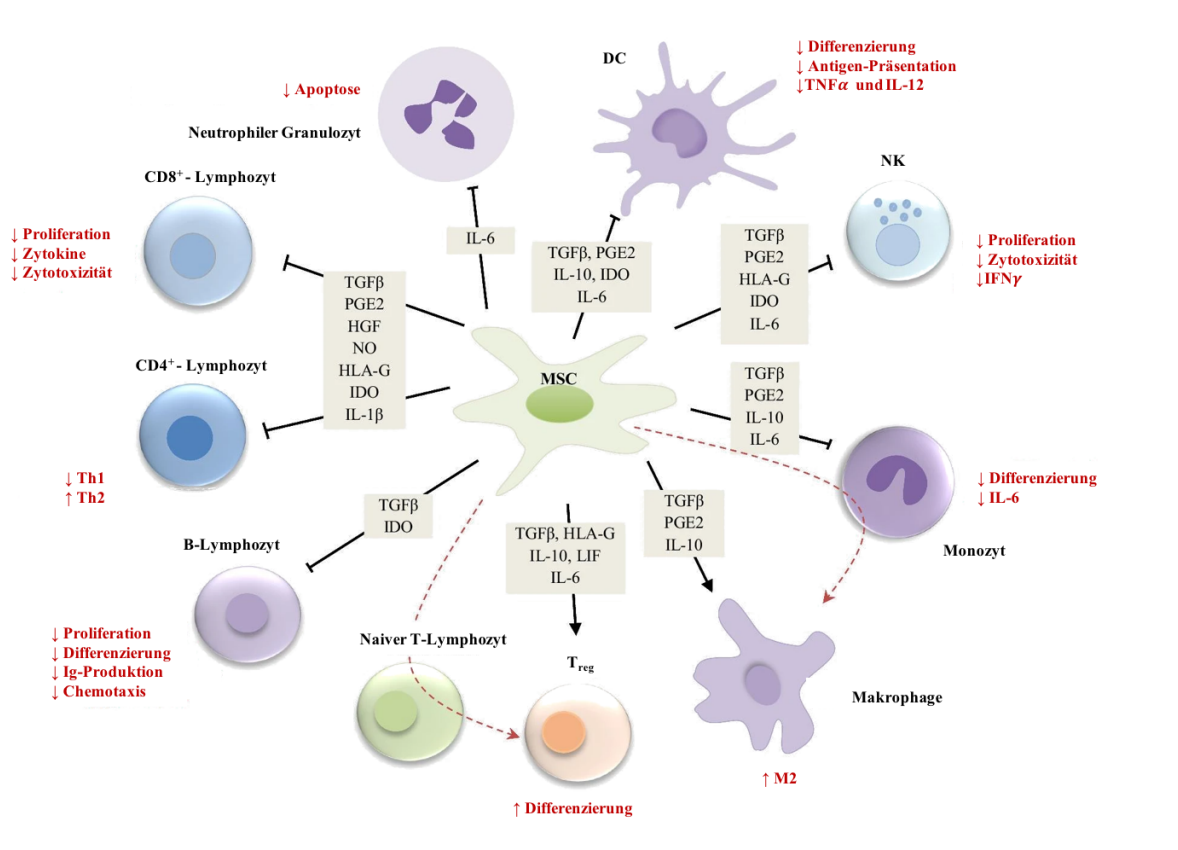


Abbildung 11: Immunsuppressiver Einfluss von MSCs auf die Immunantwort in Tumoren.

Aus Lian et al. (163).

Eine weitere Eigenschaft von Tumorzellen ist die Fähigkeit zur uneingeschränkten Proliferation. MSCs helfen dabei, die Immortalität und Replikation von Krebszellen aufrecht zu erhalten und dem durch Chemo- und Strahlentherapie angestrebten Zelltod zu entgehen. So können Brusttumorzellen durch MSCs eine Resistenz gegen Cisplatin, einem zytotoxischen Chemotherapeutikum, das auf bei der Behandlung von HNSCCs standardmäßig eingesetzt wird, entwickeln (164–166). Auch sind MSCs an der Generierung von radioresistenten Tumoren beteiligt, indem sie DNA-Reparatur (ATM, Chk2, DNA-Ligase IV) begünstigen und anti-apoptische Proteine (Bcl-2, Bcl-XL) exprimieren (167).

1.2.1.2.2 Begünstigung der Tumorsuppression

Ferner konnten bisher auch verschiedene Mechanismen aufgeklärt werden, über die MSCs die Tumorsuppression initiieren. Einige Studien berichten über die Fähigkeit der MSCs, das Tumorstromawachstum, Angiogenese und die Metastasierungsfähigkeit zu hemmen (168,169).

Es wird vermutet, dass dies unter anderem durch die Verstärkung der Entzündungsreaktion im Tumor geschieht (170). So erleichtern MSCs die Einwanderung von Granulozyten und Makrophagen ins Tumorstroma (171). Diese sind mit einem sogenannten MSC1 Phänotyp assoziiert, der inflammatorisch wirkt (162). Unter bestimmten Bedingungen konnte gezeigt werden, dass MSCs durch Regulation des PDGF und seines Rezeptors (PDGFR), einer Zellwachstums-, Migrations- und Angiogenese-aktivierenden Rezeptor-Tyrosinkinase, einen negativen Effekt auf die Angiogenese ausüben (172).

Von MSCs generierte Exosomen, kleinste extrazelluläre Vesikel, die genetisch und molekular ihrer Ursprungszelle ähneln (173), konnten in Brusttumorzellen *in vivo* die VEGF-Expression herunterregulieren und infolgedessen das Tumorstromawachstum hemmen (174).

Auch besitzen MSCs die Fähigkeit, die Tumorstromaproliferation und Metastasierung über Wnt- und Akt-Signalwege zu hemmen. Diese Signalwege werden inhibiert (175–177), wodurch ein Zellzyklusarrest und Apoptose induziert werden (171,178,179). So konnte die Proliferation von hepatozellulärem Karzinom (180), Brusttumoren (176), nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (181) und Kaposi-Sarkomzellen (175) inhibiert werden.

1.2.1.3 MSCs als Therapeutikum

Durch ihre regenerativen Eigenschaften rückten MSCs als Therapie verschiedenster Krankheiten in den Fokus neuerer Forschung (182,183). Bisher konnten MSCs im Bereich der Mundhöhle für die Wiederherstellung von Zähnen, des Zahnfleisches und des Zahnhalteapparates genutzt werden. Auch die Produktion von Enamel und Dentin sowie die Rekonstruktion von Gaumenspalten stellt eine Anwendung dar (184). Ebenfalls kommen MSCs als Therapie für ulzerierende, präkanzeröse oder maligne Läsionen in Frage. In oralen Ulzera und oraler Mukositis konnten MSCs in Tiermodellen die Wundheilung positiv unterstützen. In präkanzerösen Läsionen, wie der oralen submukösen Fibrose, konnte durch Injektion von Stammzellkonzentrat eine Symptomreduktion erzielt werden (184).

Schattenseite des Einsatzes von Stammzellen zu therapeutischen Zwecken ist, dass die Regulation, die die Differenzierung von Stammzellen bestimmt noch nicht vollständig erforscht ist. Eine unkontrollierte Differenzierung kann durch die vorherrschenden Einflüsse im lebenden Organismus noch weniger ausgeschlossen werden. Eine Meta-Analyse von 2021 zur Sicherheit beim Einsatz von MSCs als Therapeutikum wertete Studien der vergangenen 15 Jahren aus. Diese bewertete den Einsatz von MSC als insgesamt sicher (185).

Bisher wurden Stammzellen im Rahmen von Tumorerkrankungen primär zur Wiederherstellung des Immunsystems und von Blutzellen nach Bestrahlung und Chemotherapie genutzt (184). Doch auch ihre Rekrutierung in das Tumorstroma durch Tumorzellen macht MSCs zu potenziellen Therapievehikeln systemischer Therapie, aber auch der Gentherapie (186), die besonders Tumorstrukturen zum Ziel haben könnten (187,188).

Da jedoch die gleichen Mechanismen und Signale, die MSCs als Therapievehikel und zur Rekonstruktion von Gewebe so interessant machen, auch von Tumorzellen genutzt werden, bleibt bisher offen, ob eine Stammzelltherapie Tumorrezidive oder eine maligne Transformation hervorrufen könnte (188,189).

1.2.2 MMPs - als azellulärer Bestandteil der Tumormikroumgebung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von mesenchymalen Knochenmarksstammzellen (BMSCs) auf die Tumorprogression von Zellen des Kopf-Halsbereichs näher untersucht. In diesem Zusammenhang wird der größte Fokus auf die Expression und Funktion der Matrixmetalloprotease MMP-9 gelegt. Diese Enzyme sind in der Lage, extrazelluläre Matrix zu degradieren und somit das Verlassen des Tumorzellverbandes und damit die Tumormetastasierung zu begünstigen. Um die Mechanismen bei der Entstehung und Progression des HNSCCs weiter aufzuklären, wurde hier MMP-9 nach Co-Kultivierung mit BMSCs näher untersucht.

1.2.2.1 Definition und Klassifikation

Matrixmetalloproteasen gehören zur Familie von Zink-abhängigen Endopeptidasen. Es sind bisher 28 humane MMPs bekannt (190). Sie werden am häufigsten nach Substratspezifität und Struktur in acht Gruppen eingeteilt: Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, Kollagenasen, Metalloelastasen, membrangebundene MMPs, auch bekannt als *membrane-type* (MT)-MMPs Typ 1 und Typ 2, Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte MMPs und die Gruppe der nicht klassifizierten MMPs (191,192). Bis auf die MT-MMPs und GPI-MMPs, welche membranständig sind, handelt es sich bei MMPs um extrazelluläre Proteine (193). Sie besitzen zusammen die Fähigkeit alle Komponenten der extrazellulären Matrix abzubauen (EZM) (191). Bei der EZM handelt es sich um eine Reihe von Molekülen, die von Zellen extrazellulär sezerniert werden. Sie geben Zellen sowohl biochemisch als auch physikalisch Stabilität und beeinflussen Zelladhäsion, Zell-Zellkontakte und die Zelldifferenzierung (194).

Die Gruppe der Gelatinasen, denen MMP-2 und MMP-9 angehören, sind auch unter den Namen Gelatinase A und B bekannt und besitzen über ihre Fibronectin-Domäne die Fähigkeit, Gelatine, Laminin, Kollagen Typ I und IV zu binden (195) und Kollagene zu erkennen (196). Sie bauen unter anderem Kollagen Typ IV, V und XI, Laminin und Aggrecan ab, alles Proteine der extrazellulären Matrix. MMP-2 baut zudem noch Kollagen Typ I und II ab (197,198).

Abbildung 12 zeigt eine schematische Übersicht bekannter MMPs aus dem Jahre 2020, unterteilt nach Substratspezifität und Struktur.

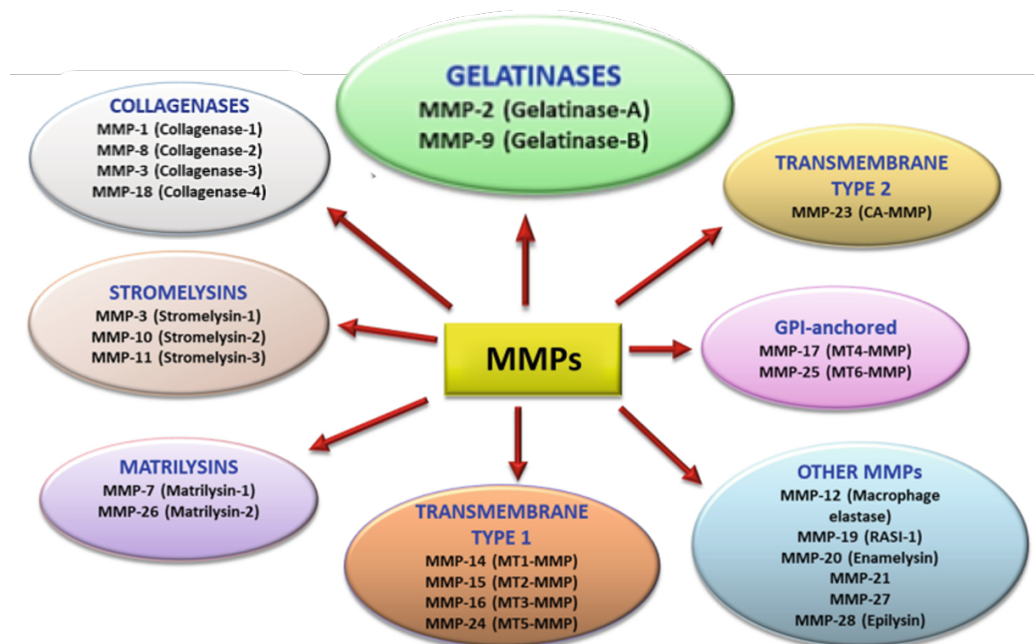


Abbildung 12: Übersicht bekannter MMPs. Diese wurden nach Substratspezifität und Struktur in verschiedene Gruppen unterteilt: Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, Kollagenasen, Metalloelastasen, membrangebundene MMPs Typ 1, 2 und MMPs mit GPI-Anker (engl.: *GPI-anchored*), alle auch bekannt als *membrane-type* MMPs (MT-MMPs) sowie die Gruppe der nicht klassifizierten MMPs (*other* MMPs). Modifiziert nach Gonzalez-Avila et al. (199).

1.2.2.2 Struktur und Aufbau

Fast alle MMPs folgen in ihrem strukturellen Aufbau einem grundsätzlichen Schema aus Signalpeptid, einem ca. 80 Aminosäuren großem pro-Peptid mit Cystein-Motiv und einer katalytischen Domäne mit Zn^{2+} -Bindungsstelle aus ca. 170 Aminosäuren. Die meisten MMPs besitzen zudem ein Verbindungspeptid (engl.: *linker region*) mit variabler Länge und eine Hämopexin-Domäne, bestehend aus etwa 200 Aminosäuren (198).

MMP-9, genauso wie MMP-2, besitzen als MMP aus der Gruppe der Gelatinasen zudem eine Fibronectin-Domäne, bestehend aus drei Fibronectin Typ 2 Motiven in der katalytischen

Domäne. Die schematische Struktur von MMPs am Beispiel der Gelatinasen wird in **Abbildung 13** dargestellt (198,200).

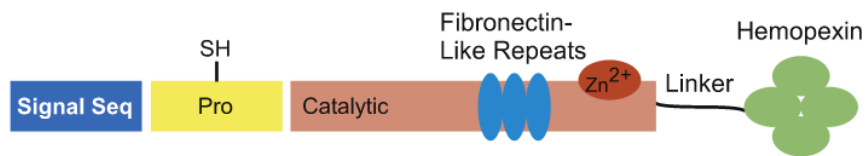


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Struktur von MMPs am Beispiel der Gelatinasen (MMP-9 und MMP-2). Signal-Peptid (Signal Seq), pro-Peptid mit Cystein-Motiv (Pro), Sulfhydrylgruppe (SH), Zink-Bindungsstelle (Zn^{2+}), katalytische Domäne (Catalytic), Fibronectin-Domäne, bestehend aus drei Fibronectin Typ 2 Motiven (Fibronectin-Like Repeats), Verbindungspeptid (Linker) und Hämopexin-Domäne (Hemopexin). Aus Cathcart et al. (195).

1.2.2.3 Regulation und Synthese

Eine Regulation der MMPs kann auf drei Ebenen erfolgen: 1. Im Rahmen der Gen-Expression. Hier erfolgt die Regulation vor allem auf der Transkriptionsebene (201). 2. Beim Prozessieren des pro-Enzyms. 3. Durch Inhibition der Enzymaktivität (202).

Abbildung 14 zeigt den schematischen Ablauf der MMP-Synthese von der Transkription des MMP-Gens bis zur MMP-Aktivierung zum Zwecke der Degradierung von extrazellulärer Matrix. Vor der Ausübung der enzymatischen Aktivität als fertig prozessiertes MMP gibt es inaktive Vorstufen, die als pro-MMP bezeichnet werden.

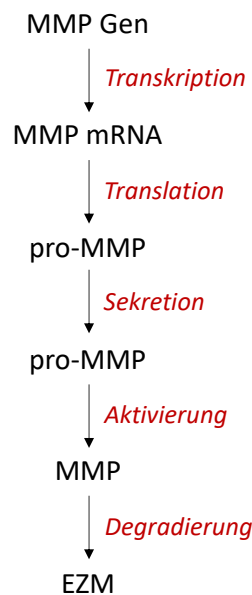


Abbildung 14: Schematischer Ablauf der MMP-Synthese bis zur Sezernierung in die extrazelluläre Matrix (EZM).

Die Regulation der Gen-Expression von MMP-9 erfolgt unter anderem über eine TATA-Box und eine Aktivator-Protein (AP)-1 Bindestelle, die an Transkriptionsfaktoren der Fos und Jun Familie bindet (203). Daneben kann auch der Runt-verwandte Transkriptionsfaktor 2 (Runx2) durch Bindung an die MMP-9 Promotorregion die MMP-9 Expression initiieren (204).

Die Mehrheit der MMPs wird als pro-MMPs in Form von inaktiven Zymogenen sezerniert. Die Zn^{2+} -Bindestelle (HEXXHXXGXXH) der katalytischen Domäne sowie das Cystein-Motiv des pro-Peptid können aneinanderbinden. Durch diese Bindung wird eine Aktivierung der pro-MMPs durch Bindung eines Wassermoleküls an die Zn^{2+} -Bindestelle verhindert. Zudem besitzt die katalytische Domäne ein konserviertes Methionin, welches dazu beiträgt, die Struktur um die Zn^{2+} -Bindestelle zu erhalten (198). Es bedarf der Abspaltung des pro-Peptids, um MMPs in ihre aktive Form zu überführen (205).

Die Generierung der pro-MMPs aus prä-pro-Enzymen erfolgt nach Abspaltung des Signalpeptids bei Translation (198). Nur ein Teil des pro-Peptids wird durch Gewebs- und Plasma-Proteinasen, aber auch bakterielle Proteinasen, abgespalten. Oft erfolgt die komplette Abspaltung des pro-Peptids und die subsequente Aktivierung durch andere MMP-Zwischenformen oder andere aktive MMPs, auch bezeichnet als „*stepwise activation*“ (206,198).

MMP-9 wird im menschlichen Körper unter anderem von Fibroblasten, Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten, Osteoklasten und Makrophagen als ca. 92 Kilodalton (kDa) großes inaktives pro-Enzym sezerniert (207). Durch Abspalten der pro-Peptidregion durch unter anderem anderen MMPs wie MMP-3 (208), MMP-2 (209), MMP-7, MMP-10, MMP-13 sowie Cathepsin G und Plasmin, entsteht in mehreren Schritten das ca. 82 kDa große aktive Enzym (6,207).

Die endogene Inhibition der proteolytischen Aktivität der MMPs erfolgt überwiegend einerseits spezifisch durch sogenannte *Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase* (TIMPs), andererseits unspezifisch durch beispielsweise α 2-Macroglobulin (198,210). Auch verschiedene andere Proteine können bestimmte MMPs inhibieren. So kann beispielsweise ein sezerniertes β -Amyloid Vorläufer-Protein (211) sowie C-terminales Fragment des Prokollagen-C Proteinase Enhancer Proteins (212) MMP-2 inhibieren. Es sind vier Gruppen an TIMPs bekannt: TIMP-1, -2, -3, und -4 (193).

1.2.2.4 Physiologische Funktion

Im physiologischen Gewebe werden MMPs streng reguliert und im Allgemeinen schwach exprimiert (6). Die proteolytische Aktivität von MMPs beeinflusst viele zelluläre Funktionen und physiologische Prozesse (201). Sie sind an Gewebsbildung, -reparatur und Wundheilung (213) sowie Zellproliferation, -migration und -adhäsion (214) und der Angiogenese (215) beteiligt.

1.2.2.5 Pathophysiologische Prozesse

Darüber hinaus spielen MMPs eine besondere Rolle bei der Entstehung einer Vielzahl pathologischer Erkrankungen. Bei Dysregulation der MMP-Funktion kann es zur Entstehung von Arthritis (216), Fibrose (217), Arteriosklerose, kardiovaskulären Erkrankungen (218), Nephritis und Ulcera kommen (219–221). Ein Ungleichgewicht in der Aktivierung und Inhibition von MMPs ist zudem wesentlich an der Entstehung und Progression von Tumoren beteiligt (219). MMPs können durch ihre Fähigkeit, die EZM zu degradieren und mit nicht-

Matrix-Substraten, wie z.B. Chemokinen und Wachstumsfaktoren (VEGF, *basic* (b)FGF und TGF- β) zu interagieren, Zelltod, Proliferation, Differenzierung, Tumorangiogenese, Metastasierung und die maligne Transformation beeinflussen und eine vielfältige zelluläre Antwort hervorrufen (219).

Durch die Einwanderung von pro-inflammatorischen Zellen in das Tumorgewebe wird die Expression von MMPs in Tumor- und Stromazellen angeregt. Sezerniert werden MMPs des Tumorgewebes vor allem aus Zellen der Tumormikroumgebung, wie beispielsweise Mastzellen, tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs), neutrophilen Granulozyten, myeloiden Suppressorzellen, Thrombozyten und TAFs (222). Tumorzellen selbst zeigen nur eine geringe MMP-Expression, stimulieren aber die oben genannte Zellen über parakrine Mechanismen (Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren) zur MMP-Synthese.

In verschiedenen Tumorentitäten, wie dem Blasen-, Ovarial-, papillärem Schilddrüsen- und Mammakarzinom (207), lässt sich eine Assoziation von erhöhter MMP-9 und MMP-2 Expression mit einer schnellen Tumorprogression sowie einem geringeren Differenzierungsstatus der Tumorzellen feststellen (223). So auch im HNSCC. In HNSCCs kommt es häufig, neben MMP-9 und MMP-2, zu einer Überexpression an MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-13, und MT1-MMP (224). Dies ist mit einer Tumorprogression assoziiert. Im HNSCC korrelieren hohe Level an MMP-2 und MMP-9 mit einer schlechten Prognose und gesteigerter Invasion und Metastasierung. Zudem konnte MMP-9 an der invasiven Front von HNSCCs detektiert werden. MMP-9 wird deshalb als potenzieller Tumorbiomarker diskutiert (225,226).

In Mammakarzinomen und Kolonkarzinomen geht eine Überexpression an MMP-9 ebenfalls mit herabgesetzten Überlebensraten einher (227).

Der Durchbruch des Tumors durch die Basallamina, bestehend aus Matrixmakromolekülen wie Kollagen Typ IV, Laminin und Heparansulfatproteoglykanen, stellt zusammen mit erhöhter Zellmotilität einen entscheidenden Schritt in der Tumorprogression dar. MMP-2 und MMP-9 werden hier als Gelatinasen, die insbesondere Kollagen Typ IV und Laminin abbauen, eine große Bedeutung in Invasion und Metastasierung zugeschrieben (228). Die Degradation der Basallamina fördert zudem auch die Angiogenese in Tumoren, in dem es Angiogenese-fördernde Epitope wie HUIV26 freilegt. Auch die CD44-abhängige Spaltung von TGF- β durch MMP-9 konnte die Tumorangiogenese und das Tumorstadium steigern (229). Dabei wird MMP-9 in Präzipitaten durch CD-44 an die Tumorzelloberfläche lokalisiert (230).

In der Metastasierung des Lungenkarzinoms spielt die Induktion von MMP-9 durch VEGF eine wesentliche Rolle (231). Daneben ist MMP-9 auch an der Immunevasion von Tumoren beteiligt, indem es IL-2 α spaltet und TGF- β aktiviert (231).

Es wurden ebenfalls Mechanismen entdeckt, über die MMPs die Angiogenese des Tumors inhibieren. So wird durch Spaltung von Plasminogen Angiostatin frei, welches den programmierten Zelltod von Tumorzellen herbeiführen kann (6).

Aufgrund der Rolle von MMPs in der Tumorprogression wurden MMP-Inhibitoren entwickelt. Diese zeigten sich in der Krebsforschung aber als wenig erfolgreich. In klinischen Studien konnten sie sich bisher wenig beweisen (232). Diese wurden seit 2013 eingestellt. Den größten Fortschritt machte ein MMP-Inhibitor in der klinischen Phase III zur Behandlung des polyzystisches Ovar-Syndroms (NCT01788215) (233).

Um gezielte und vielversprechendere Therapieansätze für die Behandlung des HNSCCs entwickeln zu können müssen zunächst die komplexen Zusammenhänge, die Interaktionen verschiedener Zelltypen wie die Interaktion zwischen HNSCC-Zellen und MSCs, sowie die Regulation für die Tumorprogression entscheidende Signalwege, wie die der MMPs Synthese, weiter entschlüsselt werden. Diese Arbeit soll dazu beitragen.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Karzinome im Kopf- und Halsbereich zählen zu den siebthäufigsten Tumoren weltweit. Dabei ist das Plattenepithelkarzinom im Mund- und Rachenraum der häufigste maligne Tumor (234). Trotz Intensivierung von Forschung und Entwicklung an erweiterten und neuen Therapieansätzen hat sich die Überlebensprognose des HNSCC, besonders in fortgeschrittenen Stadien, bisher nicht wesentlich verbessert. In den letzten Jahrzehnten lag das 5-Jahresüberleben von Patienten mit HNSCC weiterhin bei etwa 60 % (42). Grund ist mitunter die häufige Entwicklung von okkulten Metastasierungen in Halslymphknoten sowie eine Invasion in umliegendes Gewebe wie auch Knochen (4,235).

Hier wird der dringende Bedarf deutlich, grundlegende Interaktionen von Zellen im Tumornetzwerk weiter aufzuklären und besser zu verstehen. Bis heute ist noch nicht vollständig geklärt, wie genau Tumorzellen ihre Umgebung beeinflussen, welche zahlreichen Faktoren die Tumorprogression fördern und welche Interaktionen zwischen Tumorzellen und den umliegenden Gewebezellen das Tumorwachstum begünstigen.

In dieser Arbeit wurde sich intensiv mit den Auswirkungen der Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und BMSCs beschäftigt, denn unter einer Vielzahl anderer Zellen können ebenfalls MSCs im Tumorgewebe detektiert werden (236).

Diesen Stammzellen werden sowohl tumorhemmende als auch tumorprogressive Eigenschaften zugeschrieben (237). Ihre Auswirkungen auf den Tumor und sein Stroma ist bis heute jedoch nicht eindeutig geklärt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine der momentan wichtigsten Säulen der Therapie des HNSCC stellt die Strahlentherapie dar (238). Neben der direkten, eliminierenden Wirkung auf Tumorzellen verstärkt die Bestrahlung ebenfalls die Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen in das Tumorstroma (127).

Die häufigsten Forschungsergebnisse bieten derzeit Hinweise auf die Förderung aggressiverer Tumoreigenschaften durch die Infiltration mesenchymaler Stammzellen. Dies konnte auch in Arbeiten der Arbeitsgruppe (AG) Bauer gezeigt werden (239). In diesen Arbeiten konnte eine erhöhte Gen- und Proteinexpression von MMP-9 bei Kultivierung von HNSCC-Zellen zusammen mit BMSCs gezeigt werden. Bei MMP-9 handelt es sich um eine Matrix-Metalloproteinase der Gruppe der Gelatinasen, die für den Abbau von extrazellulärer Matrix

verantwortlich ist (239). MMP-9 ist im Allgemeinen mit einer erhöhten Invasion, Metastasierung und Progression von verschiedensten Tumorentitäten, darunter auch den Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich, assoziiert (223). Zudem konnte die Erhöhung der alkalischen Phosphatase (ALP) und des Runt-verbundenen Transkriptionsfaktors 2 (Runx2) in Co-Kultur von HNSCC-Zellen mit BMSCs festgestellt werden. Bekannt als osteogenen Differenzierungsmarker sind diese bei einer Vielzahl an Tumoren mit einem Tumorprogress und einer schlechten Prognose assoziiert (240–242).

Der genaue Ursprung einer erhöhten Produktion von MMP-9 im Tumorgewebe ist bisher nur unzureichend bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der Interaktion von BMSCs und Tumorzellen des Kopf- und Halsbereichs weiter aufzuklären. Hierzu wurde ausgehend von HNSCC-Zelllinien in Co-Kultur zusammen mit BMSCs insbesondere der jeweilige Einfluss auf die Proteinexpression von MMP-9 in der Tumorumgebung untersucht. Des Weiteren diente diese Arbeit der genaueren Erforschung der MMP-9 Aktivität bzw. Promotoraktivität in HNSCC-Zellen und BMSCs sowie des Einflusses von ALP auf die Migrationsfähigkeit von Co-Kultur Sphäroiden aus 3D-Zellkultur.

Um eine möglichst realitätsnahe Wachstums- und Versorgungsumgebung zu ermöglichen, stand besonders die 3-dimensionale (3D) Kultivierung der untersuchten Zellen nach der sogenannten *Hanging Drop*-Methode, neben einer Kultivierung adhärenter Zellen als einzellige Schicht, im Vordergrund.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

2.1.1.1 HNSCC-Zellen

Die verwendeten Tumorzelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68 wurden am Pittsburgh Cancer Institute (PCI; Pittsburgh, PA, USA) aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs isoliert und etabliert (243,244). Alle Zelllinien wurden zuletzt im Jahr 2018 durch das Leibniz Institut DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) mittels STR-DNA-Typisierung getestet.

Informationen zur ursprünglichen Lokalisation, Tumorstadium, Alter, Geschlecht und Vorbehandlung der Patienten (243,244) sind aus Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: HNSCC-Zellen

Zelllinie	anatomischer Ursprung	TNM-Status	kultivierte Zellen	präoperative Behandlung	Alter / Geschlecht
PCI 1	Larynx	pT2N0M0G2	Primärtumor/ Rezidiv	Resektion	65, m
PCI 13	retromolarer Bereich	pT4N1M0G3	Primärtumor	keine	50, m
PCI 68	Zunge	pT4N0M0G1	k.A.	k.A.	k.A., m

2.1.1.2 BMSCs

Die verwendeten humanen mesenchymalen Stammzellen (BMSCs) wurden großzügigerweise von der Abteilung für Experimentelle Orthopädie unter Leitung von Frau Prof. Dr. Susanne Grassel des UKR am Zentrum für medizinische Biotechnologie zur Verfügung gestellt (239) (Tabelle 2). Die Zellen stammen aus osteoarthritischen Patienten mit Implantation einer Hüftprothese. Die Verwendung des menschlichen Materials fand nach schriftlicher Zustimmung durch die Patienten statt und wurde durch eine Ethik-Kommission zugelassen. Das Knochenmark aus dem *Caput femoris* und dem *Acetabulum* wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Die mononukleären Zellen wurden bis zur Passage drei in *StemMACS Expansion Medium* (Miltenyi Biotec GmbH) kultiviert. Alle verwendeten Zellen wurden auf die mit BMSCs assoziierten Marker CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD19⁻ und CD34⁻ mittels Durchflusszytometrie getestet, um eine Kreuzkontamination mit anderen Zellen und eine Differenzierung der BMSCs auszuschließen (71,245).

Tabelle 2: BMSCs

Spendernummer	Alter, Geschlecht	Herkunft
706	67, m	Acetabulum
821	60, w	Acetabulum
822	84, w	Acetabulum
866	63, m	Caput femoris

* m = männlich, w = weiblich

2.1.2 Reagenzien

2.1.2.1 Zellkultur

Tabelle 3: Reagenzien zur Zellkultivierung

Reagenz	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
DMEM 1,0 g/l Glucose	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
Methylcellulose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Gibco Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml; 10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Accutase solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Gibco™ Opti-MEM™ I Reduced Serum Media	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isopropanol	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D
L-Glutamin 200 mM	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
StemMACS MSC Expansion Media, 500 ml	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, D
Trypsin rec. hum. / EDTA 0,2 %, 10x	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D

2.1.2.2 siRNA-Knockdown

Tabelle 4: siRNA-Transfektionsreagenzien

Reagenz	Hersteller
DharmaFECT 1	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
Invitrogen Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco Opti-MEM I Reduced Serum Media	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ON-TARGETplus Human RUNX2 siRNA SMARTPOOL, 10 nmol	GE Healthcare Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA
ON-TARGETplus Human MMP-9 siRNA SMARTPOOL, 10 nmol	GE Healthcare Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA
ON-TARGETplus non-targeting Pool, 20 nmol	GE Healthcare Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA

2.1.2.3 Luciferaseassay

Tabelle 5: Plasmid-Transfektionsreagenzien

Reagenz	Hersteller
Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System	Promega, Madison, WI, USA
Kontrollvektor pGL4.74 [<i>hRluc</i>/TK] Vector 1000 ng/μl; 20 μg (Verkaufsmenge) (Renilla)	Promega, Madison, WI, USA
MMP-9c Vektor	Eigene Herstellung (246)
FuGENE[®] HD Transfection Reagent	Promega, Madison, WI, USA
pGL4.16 (luc2/Neo) (Luciferase)	Promega, Madison, WI, USA

2.1.2.4 Zymographie

Tabelle 6: Reagenzien zur Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Reagenz	Hersteller
cOmplete, mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Basel D
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Bicinchoninsäure (BCA) Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 7: Reagenzien zur Zymographie

Reagenz	Hersteller
Gelatine aus Schweinehaut	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
MMP-2, recombinant, 0,1 mg/ml	Calbiochem, San Diego, CA, USA
MMP-9, recombinant, 0,1 mg/ml	Calbiochem, San Diego, CA, USA
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Precision Plus Dual Color Protein Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
H₂O, DNase- und RNase-frei, sterilfiltriert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D

2.1.2.5 Spreadingassay

Tabelle 8: Reagenzien zur Plattenbeschichtung

Reagenz	Hersteller
Matrigel® Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, 9,3 mg/ml	Corning Inc., Corning, USA
Levamisole hydrochloride, Alkaline phosphatase inhibitor	Abcam, Cambridge, UK

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cellstar® Platten, flat bottom, transparent mit Deckel: 6/48/96-Wells	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Corning™ CentriStar™ Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Corning Inc., Corning, USA
Kryoröhrchen, Rundboden, 2 ml	VWR International GmbH, Ismaning, D
Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Kisker Biotech GmbH & Co.KG, Steinfurt, D
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	Corning Inc., Corning, USA
Parafilm M	Bemis Company Inc., Neenah, WI, USA
Serologische Pipetten: 2, 5, 10, 25 ml	Sarstedt AG &Co, Nümbrecht, D
Zählkammer Cedex Smart Slides	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Zellschaber 25 cm	Sarstedt AG &Co, Nümbrecht, D
Petrischale 94x16 mm, steril	Greiner Bio-One, Kremismünster, A
Lumivials 5ml	Berthold Technologies, Bad Wildbad, D
Mikrozentrifugenröhrchen 1,5 ml	Kisker Biotech GmbH & Co.KG, Steinfurt, D

2.1.4 Geräte

Tabelle 10: Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank HERAcCell 240	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
GENios Plattenphotometer	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Glasplatten für SDS-PAGE Mini-PROTEAN® Glass plates für 1,0 mm- Gele	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Invitrogen DryEase® Gel Drying System	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Kamera Digital Sight DS-U1	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, NL
Laborschüttelgerät BlotBoy™	Benchmark Scientific Inc., Edison, NJ, USA
Lichtmikroskop CKX41	Olympus Corporation, Tokyo, JP
Lichtmikroskop Eclipse TE2000-U	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, NL
Mini-PROTEAN® Gel releaser	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Mini-PROTEAN® Kamm für 10 Taschen, 1 mm Gele	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
Netzgerät PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Sicherheitswerkbank Heraeus® HERAsafe®	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
Ultraschall-Stab Bandelin Sonopuls	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D
Vortex Genie2	Scientific Industries, New York, NY, USA
Zellzählgerät Cedex XS® Analyzer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Zentrifuge 3K-30	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, D
Zentrifuge PerfectSpin 24 Plus	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Zentrifuge Rotanta/P	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, D
Schütteler Polymax 2040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Lumat LB 9507	Berthold Technologies, Bad Wildbad, D
Zentrifuge Universal 320	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D

Zentrifuge Sprout	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA
Gel DocEZ	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Schüttelwasserbad 1086	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
peqTWIST Vortex-Schüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Dewar Transport Gefäß	KGW Isotherm, Karlsruhe, D
Mikrowelle 8022L	Bauknecht Hausgeräte GmbH, Suttgart, D
Schüttler VXR basic Vibrax®	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D

2.1.5 Software

Tabelle 11: Software

Software	Hersteller	Verwendung
Cedex XS Software Version 1.0.4	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D	Zellzahlbestimmung
Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA	Datenverarbeitung
Fiji	Open-Source Software mit GNU General Public License (247)	Flächenvermessung, Zymographiegelanalyse
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA, USA)	Graphische Datendarstellung, Statistische Auswertung
Image Lab™ Software 6.0.1 for PC and Mac Version	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D	Bildakquisition von Zymographie-Gelen, Signal-Quantifizierung
Magellan4 und 6	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay
NIS-Elements AR 3.2	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, NL	Kamerasteuerung des Lichtmikroskops Nikon Digital Sight DS-U1

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle verwendeten Zellen wurden im Brutschrank HERAcell 240 (Thermo Scientific) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.1.1 2D-Zellkultivierung

Die HNSCC-Zelllinien wurden in T75- oder T25-Zellkulturflaschen kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurden die adhärennten Zellen passagiert.

BMSCs wurden in T175 oder T75 kultiviert bis zu einer maximalen Konfluenz von 80% und Passage 7.

Passagiert wurden die Zellen, indem das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS (20 ml für T175, 10 ml für T75 und 5 ml für T25) gewaschen und mit 1x Trypsin überschichtet (3 ml für T175, 1 ml für T75 und 0,5 ml für T25) wurden. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ so lange mit Trypsin inkubiert, bis sie sich vollständig von der Zellkulturflasche abgelöst hatten, maximal jedoch für 10 min, um eine nachhaltige Zellschädigung zu vermeiden. Während der Trypsinierung erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle. Die Zellen wurden daraufhin in frischem Kulturmedium resuspendiert und in gewünschter Konzentration in eine neue Zellkulturschale überführt.

Tabelle 12: HNSCC-Zell-Medium zur 2D-Zellkultivierung

HNSCC-Zell-Medium
DMEM 1,0 g/l Glucose
+ 10 % Gibco Fetal Bovine Serum (FBS)
+ 1 % L-Glutamin (\cong 2 mM)
+ 1 % Penicillin / Streptomycin (P/S) (\cong 100 Units Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin)

Tabelle 13: BMSCs/Co-Kultivierungs-Medium zur 2D-Zellkultivierung

BMSC/Co-Kultivierungs -Medium
StemMACS MSC Expansion Media
+ 1 % Penicillin / Streptomycin

2.2.1.2 3D-Zellkultivierung

Für die Kultivierung in 3D sowohl der BMSCs als auch der HNSCC-Zellen wurde die *Hanging Drop*-Methode (HD) herangezogen. Dabei wurden Zellen in einem viskösen Medium (Tabelle 14 und Tabelle 15) auf die Deckelinnenseite einer Petrischale (Greiner Bio-One) ausgesät. Die Konzentration der Zellen im Medium wurde hierbei so eingestellt, dass sich die gewünschte Zellzahl für ein Sphäroid in 30 µl Zellsuspension befand. Anschließend wurden 30 µl der Zellsuspension tropfenweise, mit genügend Abstand zueinander, auf der Innenseite des Deckels einer Petrischale platziert. Im Anschluss wurde der Deckel vorsichtig gewendet und die Petrischale geschlossen. Um dem Austrocknen der Sphäroide entgegenzuwirken, wurde der Boden der Petrischale mit 15 ml PBS befüllt. Die *Hanging Drop*-Methode wird in Abbildung 15 schematisch dargestellt.

Durch das Zusammenspiel aus Oberflächenspannung und Viskosität formen sich sogenannte *Hanging Drops*, welche es den Zellen zusammen mit der fehlenden Adhäsionsmöglichkeit an eine Oberfläche ermöglichen in Sphäroid-3D-Struktur zu wachsen.

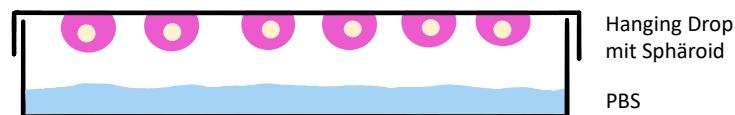


Abbildung 15: Schematische Darstellung der 3D-Zellkultivierung.

Tabelle 14: Zusammensetzung des HD-Mediums zur 3D-Kultivierung

Bestandteil	Volumen	Prozentualer Anteil
Methylcellulose (1,2 %)	4,0 ml	20 %
StemMACS Expansion Medium	15,8 ml	79 %
Penicillin/Streptomycin (5000 U/ml)	0,2 ml	1 %
Gesamtvolumen	20,0 ml	

Tabelle 15: Zusammensetzung des HD-Mediums ohne Serum zur Ernte des Überstands

Bestandteil	Volumen	Prozentsatz
Methylcellulose (1,2 %)	4,0 ml	20 %
DMEM	15,8 ml	79 %
L-Glutamin	0,2 ml	1 %
Gesamtvolumen	20,0 ml	

Das HD-Medium zur 3D-Kultivierung wurde in folgenden Experimenten verwendet: Messung der MMP-9-Promotoraktivität mittels Luciferase-Aktivität (siehe auch 2.2.2), Gewinnung von Zelllysaten und Zellkulturüberständen für die Zymographie (siehe auch 2.2.3.1 und 2.2.3), Matrigel[®] *Spreadingassay*.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die automatische Zellzahlbestimmung erfolgte mit Cedex *Smart Slide*-Zählkammern (Roche) im Cedex XS Analyser (Roche) mit der dazugehörigen Software Cedex XS (Roche). Für eine Zählung wurden 20 µl der unverdünnten Zellesuspension eingesetzt. Dabei wurden Zellen mit einem Durchmesser von 12 µm erfasst und die Gesamtzellzahl pro Milliliter bestimmt.

2.2.1.4 Transfektion

2.2.1.5 Transfektion mit pcDNA-Plasmid MMP-9c (Dual-Luciferase® Reporter Assay)

Die Transfektion erfolgte in einer 6-Well Platte. Für die Transfektion wurden $2 \cdot 10^5$ Tumorzellen pro Well ausgesät. Fünf Stunden nach Aussaat, als bereits alle Zellen adhärent waren, erfolgte die Transfektion mit dem MMP-9c Plasmid (246). Pro Well wurden 100 μ l Komplexansatz (siehe Tabelle 17) mit einer Gesamtmenge von 1500 ng DNA und 5 μ l FuGENE HD Transfektionseagenz hergestellt. Der Komplexansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Inzwischen wurde das Medium der Zellen abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 2 ml des Transfektionsmediums (DMEM pur, ohne L-Glutamin, ohne Antibiotika und ohne FBS) in ein Well vorgelegt. Der Komplexansatz ließ sich nun tropfenweise in ein Well geben. Die Transfektion erfolgte für 24 h.

Das verwendete MMP-9c-Plasmid wurde bereits in Bedal et al. 2014 beschrieben (246)

Tabelle 16: MMP-9c-Plasmid (nach Bedal et al., 2014)

Material	Bezeichnung/Sequenz
Klonvektor	pGL4.16 (luc2/Neo) (Promega)
MMP-9-Promotor Primers (930bp)	5'-TACATTGGTACCTCTTGGGTCTTGGCCTTAGT-3' 5'-TTGATACTCGAGCCAGCACCAGGAGCACC-3'

Tabelle 17: Plasmid-Transfektion

Komplexansatz pro Well	Mengenangabe
FuGENE HD	5 µl
MMP-9c	1450 ng
Kontrollvektor	50 ng
DMEM	ad. 100 µl
Gesamtvolumen	100 µl

Als Reagenzkontrolle diente ein Komplexansatz aus 5 µl FuGENE HD-Reagenz und 95 µl DMEM, ohne Plasmid.

2.2.1.6 Transfektion mit siRNA in HNSCC-Zellen

In den Tumorzellen wurde ein Knockdown von MMP-9 und des Transkriptionsfaktors RUNX-2 mittels *small interfering RNA* (siRNA) erzeugt. Zur Transfektion der Tumorzellen wurden $5,0 \cdot 10^5$ Zellen in einer T25-Kulturflasche in DMEM mit L-Glutamin und FBS ausgesät und für 20 h kultiviert. Die Transfektion erfolgte mit dem Reagenz DharmaFECT 1 für 24 h.

Tabelle 18: siRNA Transfektion in HNSCC-Zellen

	Komplexansatz	Volumen	Anwendung
Gefäß 1	siRNA (20 µM)	15 µl (100 nM)	Mischen und 5 min bei RT inkubieren
	DMEM ohne FBS und ohne P/S	285 µl	
Gefäß 2	DharmaFECT 1	7,5 µl	Mischen und 5 min bei RT inkubieren
	DMEM ohne FBS und ohne P/S	292,5 µl	
	Gesamtvolumen	600 µl	Gefäß 1 und 2 mischen und 20 min bei RT inkubieren

Es wurden 2,4 ml DMEM mit FBS und L-Glutamin, ohne P/S in 15 ml konische Zentrifugenröhrchen vorgelegt und nach der in der Tabelle 18 beschriebenen Inkubation der 600 µl Komplexansatz für 20 min bei RT miteinander gemischt. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und das Transfektionsmedium langsam auf die Zellen getropft. Siehe Tabelle 20.

2.2.1.7 siRNA-Transfektion in BMSCs

In BMSCs wurde zur weiteren Untersuchung der MMP-9 Aktivität durch Zymographie (s. 2.2.3) ein siRNA Knockdown von MMP-9 durchgeführt. Die Transfektion erfolgte an adhärennten Zellen. Dafür wurden zwei Tage vor der Transfektion 160.000 BMSCs in einer T25-Kulturflasche ausgesät und für anschließend 48 h kultiviert. Zur Vorbereitung der Transfektion wurden 22,5 µl RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) mit 375 µl *Gibco Opti-MEM I Reduced Serum Media* (Thermo Fisher Scientific) in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben. In einem separaten Mikroreaktionsgefäß wurden 6,25 µl siRNA mit einer Stammkonzentration von 20 µM (MMP-9 siRNA oder *non-targeting* siRNA) mit ebenfalls 375 µl *Gibco Opti-MEM I Reduced Serum Media* verdünnt. Zur Bildung der Reaktionskomplexe aus siRNA und Transfektionsreagenz wurden beide Ansätze (Tabelle 19) vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden auf die Transfektion vorbereitet, indem das reguläre Stammzell-Kulturmedium in den T25-Zellkulturflaschen durch 5 ml *Gibco Opti-MEM I Reduced Serum Media* pro T25 ersetzt wurde. Je Zellkulturflasche wurden 750 µl Transfektionsreagenz auf die Zellen getropft und diese für 24 h inkubiert/kultiviert (37 °C, 5 % CO₂).

Tabelle 19: siRNA Transfektion in BMSCs

	Bestandteil	Volumen
Gefäß 1	RNAiMAX	22,5 µl
	Gibco™ Opti-MEM™ I Reduced Serum Media	375 µl
Gefäß 2	siRNA (20µM)	6,25 µl
	Gibco™ Opti-MEM™ I Reduced Serum Media	375 µl

2.2.2 Luciferaseassay

Zur Ermittlung der MMP-9 Promotoraktivität wurde ein Luciferaseassay durchgeführt. Dieser dient der Untersuchung einer spezifischen Promotorregion mittels Biolumineszenz. Dabei wird zum einen das Firefly-Luciferase-Gen mit der zu untersuchenden Promotorsequenz verknüpft, um so die Aktivierung desselben mittels eines Luminometers messen zu können. Die Klonierung des MMP-9 Promotorelementes erfolgte in den das Firefly-Luciferase-Gen enthaltenden Vektor pGL4.16 (luc2/Neo) (Promega, Madison, WI). Der verwendete MMP-9 Promotor besaß eine Größe von 930 Basenpaaren mit den codierenden Abschnitten:

5'-TACATTGGTACCTCTTGGGTCTTGGCCTTAGT-3' und

5'-TTGATACTCGAGCCAGCACCAGGAGCACC-3'.

Der schematische Aufbau des verwendeten Plasmids findet sich in Abbildung 16.

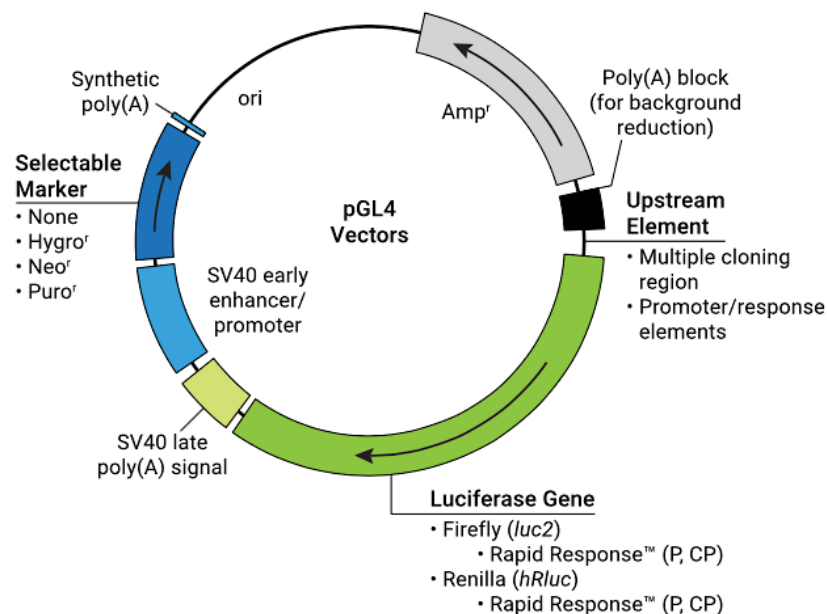


Abbildung 16: Schematischer Plasmid-Aufbau des MMP-9- und Co-Vektors (248).

Luciferasen eignen sich besonders, da sie in einem großen Bereich einen linearen Zusammenhang zwischen der vorhandenen Enzymkonzentration und der Biolumineszenz-emission aufweisen und so einen direkten Rückschluss auf die Promotoraktivität ermöglichen. Zudem bedarf die Luciferase für ihre Aktivierung keinerlei posttranslationaler Modifikation. Um die Lichtemission zu stabilisieren, erfolgt die Zugabe von Coenzym A, welches die Biolumineszenz bis hin zu minutenlang (min. 20 min) stabilisieren hilft (248). Eine Darstellung der ablaufenden chemischen Reaktionen zeigt Abbildung 17.

Um Unterschieden in der Transfektionseffizienz und kultivierungsbedingten Schwankungen gerecht zu werden und die Messungen untereinander vergleichbar zu machen erfolgte zugleich die Transfektion mit einem Co-Vektor (Renilla-Luciferase). Als Kontrollvektor erfolgte die Co-Transfektion mit pGL4.74 (hRluc/TK) (Promega). Der schematische Aufbau des Co-Vektors wird in

Abbildung 16 dargestellt. Das vom Co-Vektor erzeugte Signal korreliert mit der Menge des transfizierten Vektors und somit der Transfektionseffizienz. Während die Renilla-Luciferase bei einer Wellenlänge von 480 nm im blauen Lichtbereich emittiert erfolgt die Emission bei der Firefly-Luciferase im Bereich grün/gelben Wellenlängenabschnitt bei 550 – 570 nm (248). So kann eine Überlappung des Emissionsbereiches vermieden werden und die Lichtsignale können klar den jeweiligen Luciferasen zugeordnet werden.

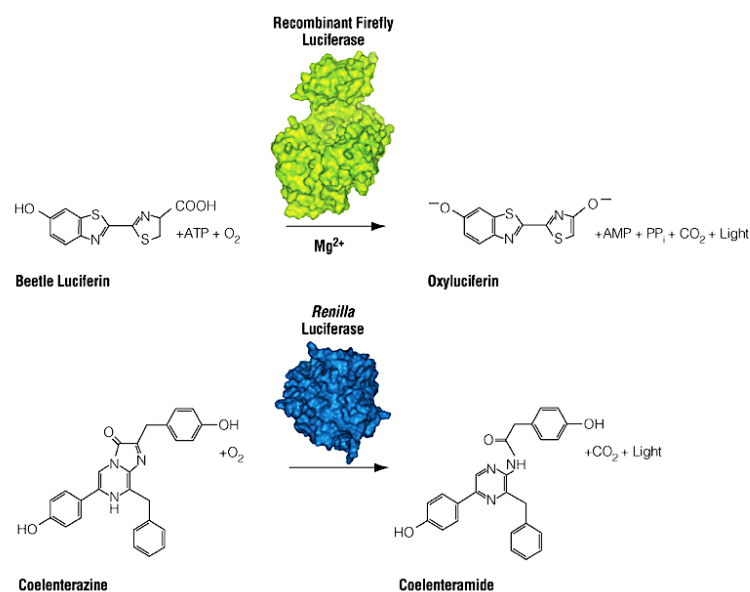


Abbildung 17: Ablaufende chemische Reaktionen der Firefly- (grün) und Renilla- (blau) Luciferase, die zur Emission von detektierbarem Licht führt (248).

Abbildung 18. Die Luciferase-Aktivität, der in Absatz 2.2.1.5 transfizierten Tumorzellen, wurde mittels *Dual Link Luciferase*-Assay analysiert. Nach Transfektion der Tumorzellen wurden diese entweder allein oder zusammen mit BMSCs in der gewünschten Zellzahl inkubiert. Für ein 2D-Experiment wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Für ein 3D-Experiment wurden 30 Sphäroide à 30 µl ausgesät und für drei Tage kultiviert.

Als Kontrollen dienten Aussaaten mit Zellen, die nicht transfiziert wurden, sowie Zellen, die nur mit Transfektionsreagenz behandelt wurden.

Der Luciferase Assay wurde mit dem Dual-Luciferase-Kit (Promega) durchgeführt. Tumorzellen im 2D-Experiment wurden vor der Lyse zweimal mit PBS gewaschen und danach unter sanftem Schwenken mit 300 µl PLB (passiver Lysepuffer) für 15-20 min unter sanften Schwenken lysiert. Zur Messung wurden 50 µl Zelllysate je Probe eingesetzt.

Für die Analyse des Versuchsansatzes mit Zellen aus 3D-Kultivierung wurden 30 Sphäroide in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gesammelt. Es folgten zwei Waschschrte mit 700 µl PBS. Im Anschluss wurde zu den Sphäroiden 100 µl PLB Lysepuffer gegeben. Die Sphäroide aller verwendeten Tumorzelllinien wurden für eine effektivere Lyse auf einem Schüttler für 15 min geschüttelt. Zur Unterstützung der Lyse bei insgesamt erschwerter Lyse wurden die verwendeten Zelllinien anschließend zusätzlich zweimal in flüssigem Stickstoff (LN₂) eingefroren und wieder aufgetaut. Zur Messung wurden 50 µl Zelllysate je Probe eingesetzt.

Gemessen wurde in relativen *light units* (RLU) (Lumat LB 9507, Berthold Technologies), was mit der Luciferase-Aktivität korrelierte.

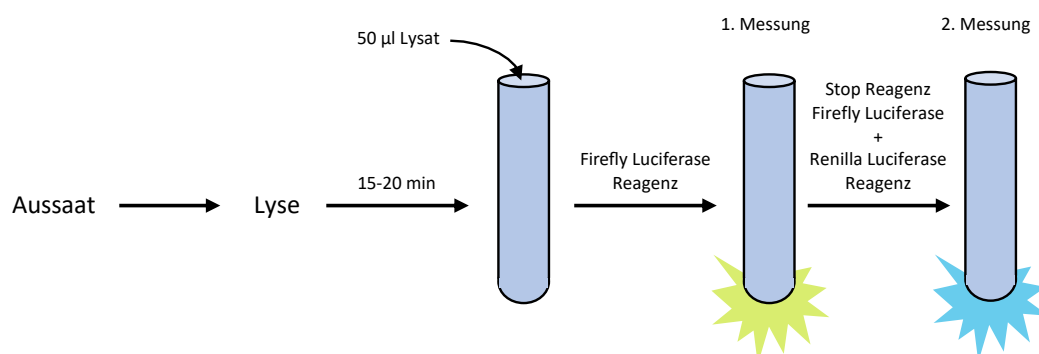


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Luciferaseassays.

2.2.3 Zymographie

Bei der Zymographie handelt es sich um eine Variante der klassischen SDS-Gelelektrophorese, in der durch Zusatz eines Substrates in einem Acrylamidgel, hier Gelatine, von Enzymen verdaut werden kann.

Neben aktiven Formen an MMPs lassen sich auch alle anderen Isoformen in der Zymographie darstellen. Die latente Form des Enzyms wird durch die Denaturierung und Renaturierung aktiv und kann so gemessen werden (249). In der Zymographie sind Enzymmengen in der Größe von Pikogramm (pg) detektierbar (249).

Die Zymographie diente dem Nachweis der Proteinexpression von MMP-9 und MMP-2.

2.2.3.1 Proteinisolation

Zur Proteinisolation aus Sphäroiden der *Hanging Drop*-Methode wurden jeweils 20 Sphäroide in ein gekühltes Gefäß aufgenommen. Diese wurden zweimal mit je 1ml PBS gewaschen, um FKS zu entfernen, und mit 50 µl Radio-Immunpräzipitations Assay (RIPA)-Lysepuffer versetzt. Um die Lyse zu unterstützen, wurden die Sphäroide zusätzlich in LN₂ schockgefroren und auf Eis wieder aufgetaut. Danach erfolgte eine Homogenisierung mittels Ultraschalles (2 Zyklen, 20 s, 50 %). Zellpellet und -überstand wurden bei 4°C mit 13000 Umdrehungen pro Minute (engl.: *revolutions per minute*, rpm) für 10 min durch Zentrifugation getrennt und der Überstand in ein gekühltes (4°C) Gefäß überführt. Entweder erfolgte eine Lagerung bei -20°C oder direkt eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay. Für die Überstände erfolgte eine Lagerung bei -80°C. Das Pellet wurde verworfen.

2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Messung der absoluten Proteinkonzentration der Zelllysate und der Überstände wurde ein BCA-Protein-Assay durchgeführt. Dieser beruht auf einer zweistufigen Reaktion (Abbildung 19) In der ersten Stufe werden Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen reduziert (Biuret-Reaktion). In der zweiten Stufe reagieren diese mit Bicinchoninsäure zu einem Komplex. Dieser Komplex hat eine Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Die Proteinkonzentration kann photometrisch bestimmt werden, da die optische Dichte (OD) proportional zur Proteinkonzentration zunimmt (250).

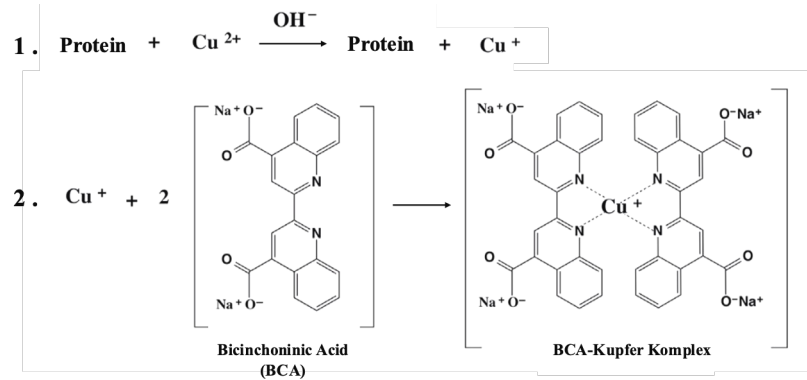


Abbildung 19: Chemische Reaktionen des BCA Assay zur Proteinquantifizierung. Modifiziert nach (251).

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte in einer 96-Well-Platte (Greiner Bio-One GmbH). Als Proteinstandard wurde bovines Serumalbumin (BSA) (2 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific) mit dem Lysepuffer RIPA verdünnt (1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 125, 25 µg/ml). Für die Messung wurden jeder Konzentration Triplikate zu je 10 µl vorgelegt. Das Zelllysat wurde im Verhältnis 1:5 verdünnt eingesetzt (2 µl). Bei Proben aus Überständen aus der 3D-Kultivierung wurden unverdünnte 10 µl verwendet. Je nach Verfügbarkeit wurden die Proben mindestens als Duplikat gemessen.

Das BCA Reagenz wurde in einem Verhältnis von 50:1 gemischt (Reagenz A/Bicinchoninic Acid: Reagenz B/4 % Kupfersulfat). 200 µl davon wurde zügig in jedes Well gegeben. Die Reaktion fand für 30 min bei 37 °C statt. Nach der Inkubation folgte eine Verlangsamung der Reaktion durch Abkühlen bei 4 °C für 1 min.

Die Ermittlung der OD erfolgte mit dem Tecan Mikro-Plattenleser, Magellan 6 bei 595 nm Wellenlänge.

2.2.3.3 Nachweis von MMPs

Die Zymographie ermöglichte die Darstellung der Enzymaktivität von Gelatinasen. Diese wurde in einem 0,1 % Gelatine- und 10 % Acrylamid-Gel durchgeführt. Um die Proben eines Gels untereinander vergleichen zu können wurden alle Geltaschen mit der gleichen Proteinmenge beladen. Pro Tasche wurde ein Volumen von 15 µl aufgetragen. Dieses Volumen setzte sich aus 1 µg Zelllysat oder 2 µg Zellkultur-Überstand und 3 µl 5x Ladepuffer zusammen (Tabelle 22). Der SDS-haltige Ladepuffer gewährleistet gute Sichtbarkeit und ein Beschweren der Probe im Elektrodenpuffer, während die durch β-Mercaptoethanol denaturierten Proteine gleichmäßig mit SDS umgeben werden, um eine ladungsunabhängige Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht zu ermöglichen. Auf ein Endvolumen von 15 µl wurde mit ddH₂O

aufgefüllt. Als Größenmarker kam der *Precision Plus Protein Dual Color*-Standard (Bio-Rad) in einer Menge von 10 µl zum (in der ersten Spur/Geltasche) Einsatz. Zudem wurde auf jedes Gel je ein Zymographie-Standard aus rekombinantem MMP-9 (0,1 mg/ml) mit 0,05 ng und rekombinantem MMP-2 (0,1 mg/ml) mit 0,5 ng aufgetragen. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit zehnfach verdünntem 10x SDS-PAGE Laufpuffer gefüllt (Tabelle 23). Pro Gel wurde eine Stromstärke von 20 mA angelegt.

Die Gelkammer wurde während der Auftrennung mit Eis gekühlt, um ein Schmelzen des Gels durch die entstehende Wärme zu verhindern. Die Auftrennung der Proben nach Molekulargewicht dauerte insgesamt 5 h. Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner als 50 kDa gingen bei der Auftrennung bewusst verloren, um eine bessere Auflösung der Banden über 50 kDa zu erreichen. Anschließend wurde das Gel zweimal für 15 min in Renaturierungspuffer (Tabelle 24) geschwenkt, da der native Zustand des Proteins essenziell für den Verdau der Gelatinasen war. Es folgten vier Waschschrte für jeweils 5 min in ddH₂O. Der Verdau von Gelatinase in den Gelen durch MMPs erfolgte bei 37 °C in 20 ml Verdaupuffer (Tabelle 25) für insgesamt 36 h. Die Gele wurden mit Coomassie Blue für 1 h gefärbt (Tabelle 26). Für die Darstellung der Banden wurde anschließend für 1 h in Entfärbelösung I und 4 h in Entfärbelösung II entfärbt, um die Farbe aus den verdauten Banden zu entfernen (Tabelle 27 und Tabelle 28).

Das Gel wurde mit Gel Doc EZ (Bio-Rad) fotografiert und zum Trocknen zweimal 30 min in Entwässerungslösung (Tabelle 29) geschwenkt und in Cellophanfolie im *Invitrogen Dry Ease* (Thermo Fisher Scientific) getrocknet.

Tabelle 20: 10 % Acrylamidgel der Zymographie, 1 mm Dicke

Komponenten	Volumen	Konzentration
40 % Acrylamid	1,72 ml	10,0 %
20 % SDS	22,5 µl	0,1 %
1 M Tris pH 8,8	1,125 ml	250 mM
10 % APS	30,0 µl	0,07 %
1 % Gelatine	450,0 µl	0,1 %
TEMED	4,5 µl	0,1 %
ddH ₂ O	1,72 ml	
Gesamtvolumen	4,5 ml	

Tabelle 21: 4,5 % Acrylamidgel der Zymographie, 1 mm Dicke

Komponenten	Volumen	Konzentration
40 % Acrylamid	506,0 µl	4,5 %
20 % SDS	22,5 µl	0,1 %
1M Tris pH 6,8	1,125 ml	250 mM
10 % APS	22,5 µl	0,05 %
TEMED	15,0 µl	0,33 %
ddH ₂ O	2,8 ml	
Gesamtvolumen	4,5 ml	

Tabelle 22: Zymographie-Ladepuffer, 5x

Komponenten	Volumen
1.5 M Tris-Cl pH 6,8	4 ml
Glycerol	10 ml
β-Mercaptoethanol	5 ml
SDS	2 g
1 % Bromphenolblau	1 ml

Tabelle 23: 10x SDS-Laufpuffer

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

Tabelle 24: Zymographie-Renaturierungspuffer

Komponenten	Volumen
TritonX100	2,5 %
ddH ₂ O	Ad.

Tabelle 25: Zymographie-Verdaupuffer

Komponenten	Volumen
Tris-HCl pH 8,5	50 mM
CaCl ₂	5 mM
ddH ₂ O	Ad.

Tabelle 26: Zymographie-Färbelösung

Komponenten	Volumen
Brilliant Blau G 250	0,25 % (w/v)
Eisessig	10 %
Isopropanol	25 %
ddH ₂ O	Ad.

Tabelle 27: Zymographie-Entfäber I

Komponenten	Volumen
Methanol	50 %
Eisessig	10 %
ddH ₂ O	Ad.

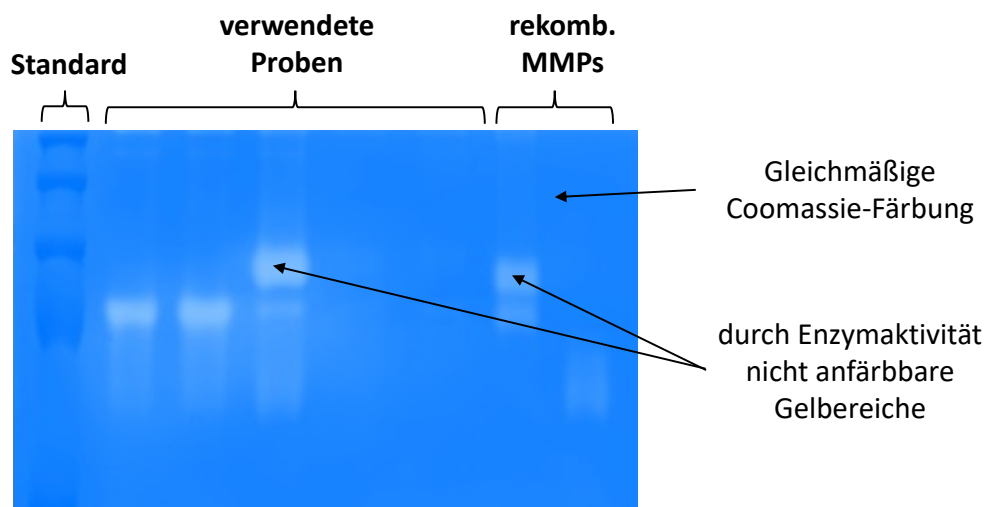
Tabelle 28: Zymographie-Entfäber II

Komponenten	Volumen
Methanol	5 %
Eisessig	7,5 %
ddH ₂ O	Ad.

Tabelle 29: Zymographie-Entwässerungslösung

Komponenten	Volumen
Ethanol	25 %
Glycerol	7,5 %
ddH ₂ O	Ad.

Abbildung 20 zeigt eine repräsentative Fotoaufnahme eines mit Coomassie-Blau gefärbten Zymographie-Gels nach enzymatischem Gelatine-Verdau durch MMPs. Zu sehen ist eine gleichmäßige Blaufärbung der Gelatine im Gel. Der zur Analyse des Molekulargewichts eingesetzte Standard stellt sich durch seine ursprüngliche Färbung als intensiv blau dar. Die nicht färbaren Bereiche entsprechen Bereichen mit Enzymaktivität. Hier kam es zum Verdau der Gelatine.

**Abbildung 20:** Exemplarisches mit Coomassie-Blau gefärbetes Zymographie-Gel.

Zur densitometrischen Analyse des Zymographie-Gels wurde die Software Fiji verwendet. Zunächst wurden die Farbaufnahme in ein 8-bit schwarz-weiß Bild umgewandelt. Wie in Abbildung 21 dargestellt erfolgte anschließend die manuelle Markierung der Spalten (gelbe Umrandung). Dabei erfolgte eine graphische Darstellung der Dichtewerte als *Plot* (s. rechte Seite der Abbildung 21). Hierin wurden die relevanten Banden (*Peaks*) manuell definiert. Das Hintergrundsignal wurde durch Einbringen einer horizontalen Trennlinie entfernt. Je höher die Spitzen des *Plots* waren, desto höher war die Transluzenz und damit die Enzymaktivität. Die Enzymaktivität korreliert mit der relativen Fläche unter der Kurve. Zur graphischen Darstellung erfolgte die Berechnung relativer densitometrischer Werte in Relation zu der gemessenen Aktivität an rekombinanten MMP-9 je Gel.

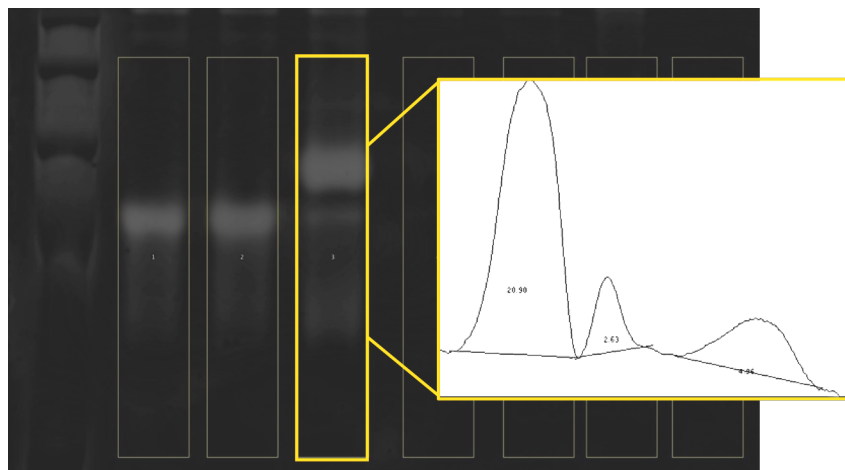


Abbildung 21: Densitometrische Analyse der Zymographie.

2.2.4 Spreadingassay

Um die Migrationsfähigkeit von HNSCC-Zellen auf Matrigel® zu untersuchen, wurden Sphäroide kultiviert, und auf einer mit Matrigel® beschichteten Platte ausgesät. Deren Flächenausbreitung wurde beobachtet und vermessen.

Bei Matrigel® handelt es sich um eine Reihe von Proteinen der extrazellulären Matrix, die aus Engelberth-Holm-Schwarm Maustumorzellen isoliert werden (252,253). Diese basalmembranartige Matrix besteht überwiegend aus Laminin, Kollagen IV, Entactin und Heparansulfatproteoglykan (253–255). Da herkömmliches Matrigel® ebenfalls diverse Wachstumsfaktoren beinhaltet, die Zellinteraktionen beeinflussen könnten, wurde hier mit Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel® gearbeitet.

Matrigel® befindet sich bei 4°C in flüssiger Form und geliert bei RT (253,255). Zur Beschichtung einer 48-Well Platte wurde bei –20°C gelagertes Matrigel® in einer Konzentration von 9,3 mg/ml auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde es im Verhältnis 1:5 mit DMEM verdünnt und davon 100 µl je Well aufgetragen. Es folgte eine Inkubation der Platte im Brutschrank für 30 min, um eine Verfestigung des Matrigels® zu erzielen. Das beschichtete Well wurde mit 700 µl MSC-Medium befüllt. Es wurde ein Sphäroid je Well ausgesät. Die hierfür eingesetzten Sphäroide wurden drei Tagen lang in der *Hanging Drop*-Methode aus Mono- und Mischkulturen von HNSCC-Zellen und BMSCs in unterschiedlichen Zellzahlen kultiviert. Das Migrationsverhalten der Zellen wurde alle 24 h über einen Beobachtungszeitraum von 96 h durch Fotoaufnahmen am Lichtmikroskop Eclipse TE2000-U (Nikon) dokumentiert.

Die Berechnung der eingenommenen Fläche erfolgte durch Abstecken eines Polygons mit dem Programm Fiji. Abbildung 23 zeigt die beispielhafte Ausmessung eines Sphäroids. Die Quantifizierung erfolgte getreu des Maßstabes ebenfalls mit der Software Fiji. Die Berechnung der relativen Flächenzunahme über 96 h erfolgte nach der in Abbildung 22 dargestellten Formel.

$$\text{rel. Flächenänderung} = \frac{(\text{Fläche } 96 \text{ h} - \text{Fläche } 0 \text{ h})}{\text{Fläche } 0 \text{ h}} \times 100$$

Abbildung 22: Formel zur Berechnung der relativen Flächenänderung auf Matrigel®.

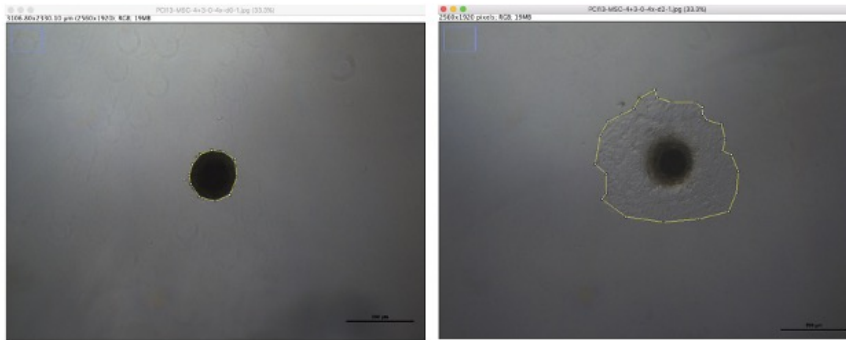


Abbildung 23: Beispielhafte Ausmessung von Flächen mittels Polygon-Auswahl.

2.2.4.1 Spreadingassay mit ALP-Inhibition durch Levamisol

Des Weiteren wurde das Verhalten von heterogenen Mischsphäroiden und BMSC-Sphäroiden in Monokultur in Präsenz des ALP-Inhibitors Levamisol in verschiedenen Konzentrationen auf der Matrigel[®]-Beschichtung beobachtet. Dabei wurde eine 5 mM Levamisol-Stocklösung durch Lösung derselben in DMEM hergestellt. Später wurden durch Verdünnung der Stocklösung mit DMEM und Matrigel[®] Levamisol-Konzentrationen von 0, 10 und 50 µg/ml (Tabelle 30) hergestellt. Kultivierung, Aussaat und Beobachtungszeitraum und –abstände sowie jegliches weitere Vorgehen entsprachen dem oben Beschriebenen.

Tabelle 30: Beschichtung von Matrigel[®] mit Levamisol

Levamisol-Konz.	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml
Matrigel[®] (9,3 mg/ml)	200 µl	200 µl	200 µl
Levamisol (5 mM)	0 µl	8,3 µl	41,54 µl
DMEM	800 µl	791,7 µl	758,46 µl
Gesamtvolumen in µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

2.2.5 Statistische Auswertung

Alle Versuchsansätze wurden mindestens in Triplikaten durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 8. Dabei wurden P-Werte von weniger als 0,05 als statistische signifikant gewertet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Der Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Datensätze erfolgte mit einem *unpaired t-test*, unter der Annahme einer Normalverteilung.

Im Falle zweier abhängiger Messreihen erfolgte die Untersuchung der Mittelwerte, unter der Annahme einer Gauß-Verteilung, mit einem *paired t-test* (Paardifferenztest).

Zum Vergleich des Einflusses einer Variablen auf drei oder mehr Gruppen kam der *one-way ANOVA* Test zum Einsatz. Bei Annahme einer Normalverteilung kam ein *ordinary one-way ANOVA* Test mit Tukey's-Korrektur bei Mehrfachvergleich zum Einsatz. Unter der Annahme eines nicht normalverteilten Datensatzes kam der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's-Korrektur bei Mehrfachvergleich zum Einsatz.

Eine Analyse mit dem *two-way ANOVA* Test wurde angewandt, um den Einfluss zweier unabhängiger Variablen auf eine Variable zu untersuchen. Es erfolgte der Mehrfachvergleich (*multiple comparisons*) mit der Tukey-Korrektur.

3 Ergebnisse

3.1 MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen in 2D- vs. 3D-Zellkultur

Die Ermittlung der Promotoraktivität dient dem Nachweis der Transkription eines bestimmten Genabschnitts. Um die Initiierung einer Neusynthese von MMP-9 in HNSCCs nachzuweisen, wurde die Messung der MMP-9 Promotoraktivität mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay durchgeführt.

Dazu wurden die Tumorzellen mit einem die MMP-9 Promotorregion und das Firefly-Luciferase-Gen enthaltenden Plasmid transfiziert und deren Luciferase-Aktivität gemessen. Als Transfektionskontrolle und zur Quantifizierung des gemessenen Firefly-Luciferase-Signals wurde in die HNSCC-Zellen (engl.: *head and neck squamous carcinoma cells*, abk. HNSCC-Zellen) ein Co-Plasmid transfiziert, welches ein für die Renilla-Luciferase codierendes Gen enthielt (256).

Das Experiment wurde sowohl mit adhärent kultivierten Zellen in 2D- als auch in 3D-Zellkultur durchgeführt, wobei Zellen als Sphäroid-Population kultiviert wurden. Verwendet wurden jeweils drei verschiedene HNSCC-Zelllinien: PCI 1, PCI 13 und PCI 68.

3.1.1 Etablierung des Dual-Luciferase® Reporter Assays in 3D-Zellkultur

Während für die Durchführung des Dual-Luciferase® Reporter Assays in 2D-Kultur ein bereits im Labor etabliertes Protokoll vorlag, welches zur Orientierung diente, gab es zum Umgang mit 3D-Kultur keine Vorerfahrungen. Hier stellte sich vor allem die Lyse der 3D-Sphäroide, die sich durch einen starken Zell-Zell-Kontakt auszeichnen, als größte Herausforderung dar. Daher wurde das detektierbare Signal nach unterschiedlichen Durchführungen der Lyse verglichen, um so die optimale Lyse-Methode zu identifizieren.

Um festzustellen, ob eine Lyse von Sphäroid-Kulturen mittels passivem Lysepuffer generell möglich sei und eine ausreichende Signalstärke gemessen werden könne, wurden die folgenden Etablierungsexperimente durchgeführt. Hierfür wurden insgesamt 40 Sphäroide à 25.000 HNSCC-Zellen untersucht. Vor der Sphäroid-Generierung wurden die verwendeten Tumorzellen analog zur Untersuchung der Promotoraktivität in 2D-Kultur transfiziert. Die Transfektionsbedingungen waren somit für die folgende 2D- bzw. 3D-Kultur identisch. Auch

als Lyse-Methode kam wie in 2D-Kultur eine 20-minütige passive Lyse zum Einsatz. Zunächst sollte geprüft werden, ob Plasmid-transfizierte Sphäroide nach der herkömmlichen Lyse ein höheres chemilumineszentes Signal generieren als nicht transfizierte Sphäroide. Ein messbares Signal in transfizierten Zellen beweist, dass eine generelle Lyse von Sphäroiden möglich ist.

In Abbildung 24 A zeigte sich, dass in den transfizierten Sphäroiden eine signifikant höhere Lumineszenz der Renilla-Luciferase (spez. Lumineszenz) gegenüber nicht transfizierten Sphäroiden zu messen war. Zudem zeigt der Vergleich der Renilla- bzw. Firefly-Luciferase-Aktivität in transfizierten Zellen in B ein deutlicheres Signal der Firefly-Luciferase. Abbildung 24 C zeigt eine 8-fach höhere Promotoraktivität in transfizierten Sphäroiden gegenüber nicht transfizierten Sphäroiden nach Normalisierung der Firefly-Luciferase-Aktivität auf die gemessene Renilla-Luciferase-Aktivität. Dies beweist, dass die Messung bei vorhandener Aktivität in Sphäroiden generell möglich ist.

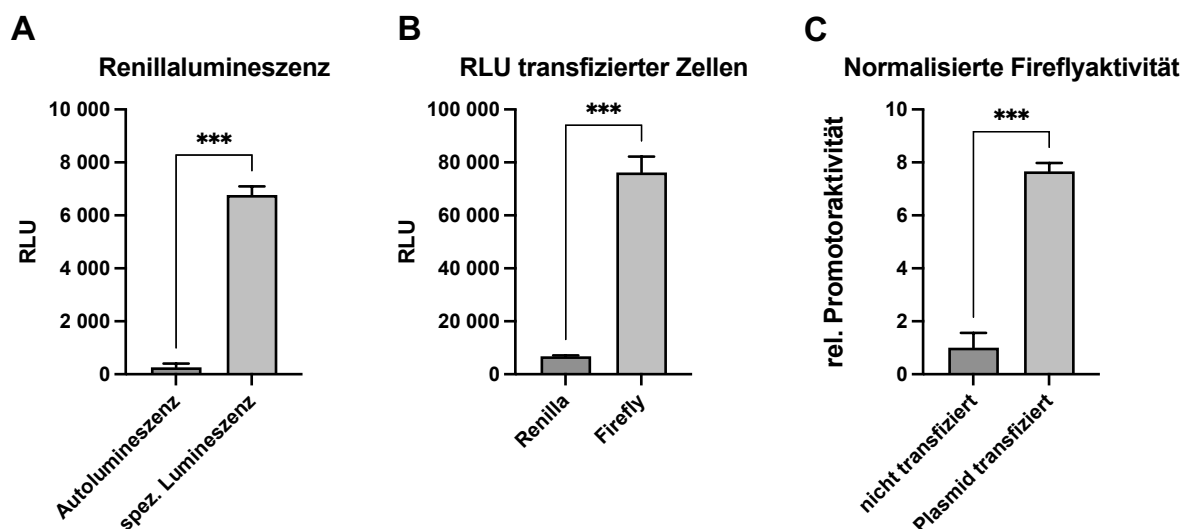


Abbildung 24: Nachweis von Renilla- und Firefly-Lumineszenz in HNSCC-Sphäroiden mittels passiver Lyse.

Die Transfektion erfolgte in adhärennten HNSCC-Zellen. Anschließend wurden für drei Tage Sphäroide à 25.000 Zellen generiert. Pro Probe wurden 40 Sphäroide analysiert. Lysiert wurde mittels passiver Lyse (100 μ l PLB/Probe, Einsatz von 50 μ l/Messung). **A** Vergleich von Autolumineszenz (Inkubation von Transfektionsreagenz ohne Plasmid) mit spez. Lumineszenz (Transfektion mit Renilla-Plasmid). Dargestellt werden die Rohwerte in relativen *light units* (RLU). **B** Vergleich von Renilla und Firefly-Luciferase in transfizierten Zellen. Dargestellt werden die Rohwerte in RLU. **C** Vergleich der normalisierten Firefly-Luciferase-Aktivität von nicht transfizierten und Plasmid-transfizierten Zellen. Normalisiert wurde die Firefly-Luciferase-Aktivität (F) auf die Renilla-Luciferase-Aktivität (R) (F/R). Dargestellt wird die relative (rel.) Promotoraktivität. N=3. *Unpaired t-test*. ***p<0,001.

In 2D-Zellkultur werden die Zellen adhärenent als einzellige Schicht kultiviert. Hier erfolgt die Exposition gegenüber dem eingesetzten Lysepuffer in allen Zellen gleichmäßig. Wenn man davon ausgeht, dass bei adhärenentem Wachstum alle Zellen vollständig lysiert werden, gilt die Lyse von 2D-Zellkultur als Optimum. Hierbei ergibt sich bei vitalen Zellen ein linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und gemessener Renilla-Luciferase-Aktivität. Abbildung 25 zeigt den Vergleich der Lyseeffizienz zwischen 2D- und 3D-Zellkultur in Abhängigkeit der Zellzahl. In 2D besteht eine annähernd lineare Korrelation zwischen Zellzahl und Signalstärke. Eine genauere Betrachtung der Lysefähigkeit von 3D-Kultur bei unterschiedlicher Sphäroidgröße ergab im Vergleich zu 2D-Zellkultur eine abgeflachte Kurve.

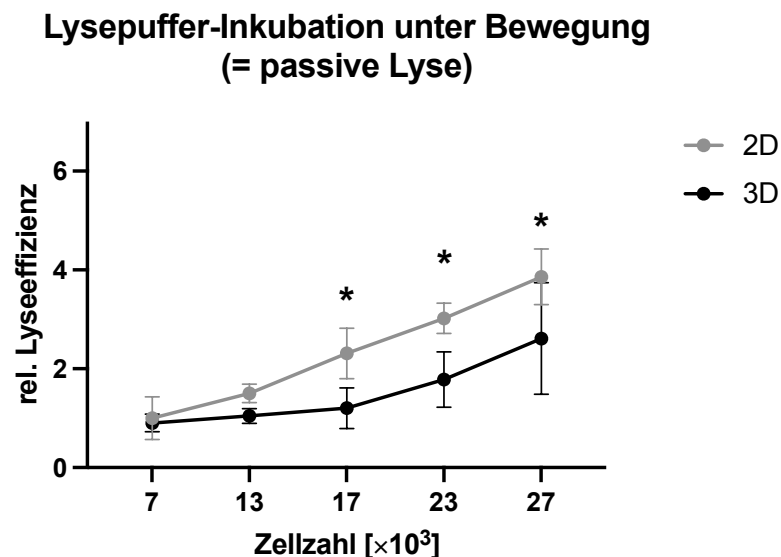


Abbildung 25: Einfluss der Zellzahl auf Renilla Luciferase-Signalzunahme in 2D- und 3D-Zellkultur.

Die Transfektion erfolgte in adhärenenten HNSCC-Zellen. Anschließend wurden für drei Tage Sphäroide (3D) mit 7.000, 13.000, 17.000, 23.000 und 27.000 Zellen generiert. Pro Probe wurden 40 Sphäroide analysiert. Für 2D-Experimente wurden 25.000, 45.000, 65.000, 85.000 und 105.000 Zellen in 6-Well Platten ausgesät. Lysiert wurde mittels passiver Lyse (2D: 300 μ l PLB/Probe; 3D: 100 μ l PLB/Probe; Einsatz von 50 μ l/Messung). Dargestellt wird die relative Lyseeffizienz, d.h. die relative Renilla-Luciferase-Aktivität; normalisiert wurde in beiden Gruppen auf den Mittelwert der niedrigsten eingesetzten Zellzahl. PLB: Passive Lysis Buffer. N=3. *Two-way* ANOVA mit Tukey's Korrektur. * $p < 0,05$.

Die geringere Steigung in 3D-Zellkultur gegenüber 2D-Zellkultur könnte entweder im Zusammenhang mit der Zunahme avitaler Zellen bei zunehmender Sphäroidgröße oder aber mit einer unzureichenden Lyse stehen.

Um eine Optimierung der Lyse von Sphäroiden herbeizuführen, erfolgte zusätzlich zur passiven Lyse der Einsatz zweimaligen Schockfrierens mit flüssigem Stickstoff (LN₂). Zusätzliches Schockfrieren diente der mechanischen Unterstützung der enzymatischen Lyse und wurde hier als aktive Lyse bezeichnet. In Abbildung 26 A wurde die Lyseeffizienz der passiven Lyse mit und ohne den Einsatz von LN₂ verglichen. Die Lyseeffizienz von adhärennten Zellen (2D), dargestellt als gestrichelte Linie, diente als interne Kontrolle für das Erreichen des Lyseeffizienz-Optimums. Beim Einsatz von LN₂ in 3D-Zellkultur zeigte sich eine leichte Optimierung der Lyse in großen Sphäroiden. Ausschlaggebend für den letztendlichen Einsatz der aktiven Lyse war jedoch die gemessene Lyseeffizienz (indirekt dargestellt anhand der Renilla-Luciferase-Aktivität), die sowohl in Tumorsphäroiden (B) als auch Mischsphäroiden (C) signifikant höher war.

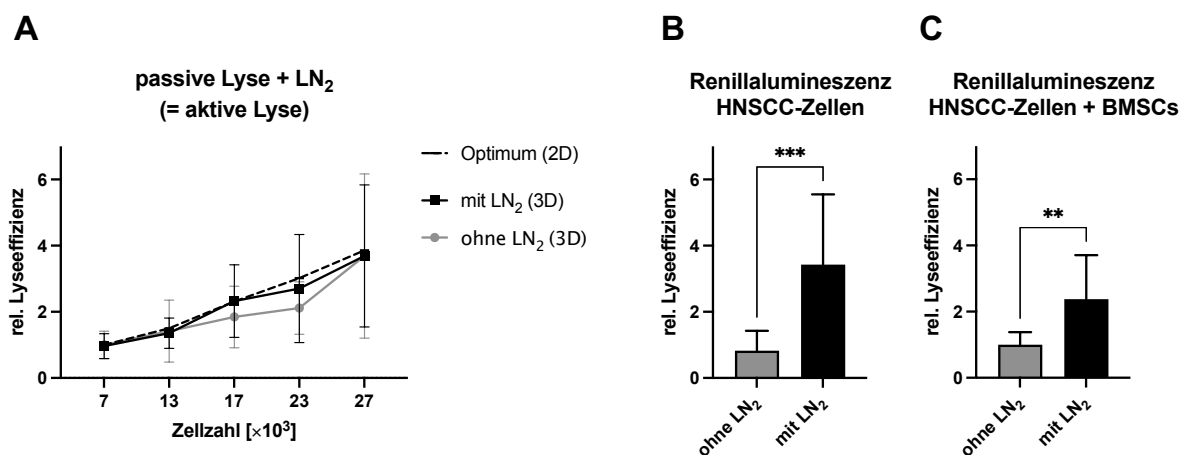


Abbildung 26: Optimierung der 3D-Zellyse durch zusätzliche Anwendung von LN₂ (aktive Lyse).

Die Transfektion erfolgte in adhärennten HNSCC-Zellen. Anschließend wurden für drei Tage Sphäroide (3D) mit 7.000, 13.000, 17.000, 23.000 und 27.000 Zellen generiert. Pro Probe wurden 30 Sphäroide analysiert. Lysiert wurde mittels passiver Lyse (100 μ l PLB/Probe; Einsatz von 50 μ l/Messung) sowie zweimaligen Schockfrierens mit flüssigem Stickstoff (LN₂). Dargestellt wird die relative Lyseeffizienz anhand der gemessenen relativen Renilla-Luciferase-Aktivität. **A** Normalisiert wurde in beiden Gruppen auf den Mittelwert der niedrigsten eingesetzten Zellzahl (rel. Lyseeffizienz). Die Lyseeffizienz von adhärennten Zellen (2D), dargestellt als gestrichelte Linie (aus Abbildung 25), diente als interne Kontrolle für das Erreichen des Lyseeffizienz-Optimums. **B** Optimierung der Lyseeffizienz in Sphäroiden aus Tumorzellen (HNSCC-Zellen) und **C** Mischsphäroiden (HNSCC-Zellen + BMSCs). Normalisiert wurde jeweils auf den Mittelwert aller mit passiver Lyse behandelten Zellen (rel. Lyseeffizienz). Paired *t*-test. N=3. **p<0,01; ***p<0,001.

Um zu prüfen, ob eine weitere Verbesserung der Lyse möglich sei, erfolgte in Abbildung 27 A zusätzlich zur etablierten aktiven Lyse die Lyse der Sphäroide mittels Ultraschallbehandlung (Sonifizierung). Der Einsatz von Ultraschallwellen zusätzlich zu einer aktiven Lyse erbrachte keine signifikante Besserung der Renilla-Luciferase-Aktivität. Die Lyseeffizienz konnte in Abhängigkeit von der Sphäroidgröße durch den zusätzlichen Einsatz von Ultraschall nicht gesteigert werden. Als Kontrolle für das Erreichen des Lyseeffizienz-Optimums diente die Lyseeffizienz von adhärennten Zellen (2D), dargestellt als gestrichelte Linie.

Abbildung 27 B und C verdeutlichen, dass die relative Lyseeffizienz sowohl in Tumorsphäroiden als auch Mischsphäroiden vor und nach Sonifizierung annähernd identisch waren.

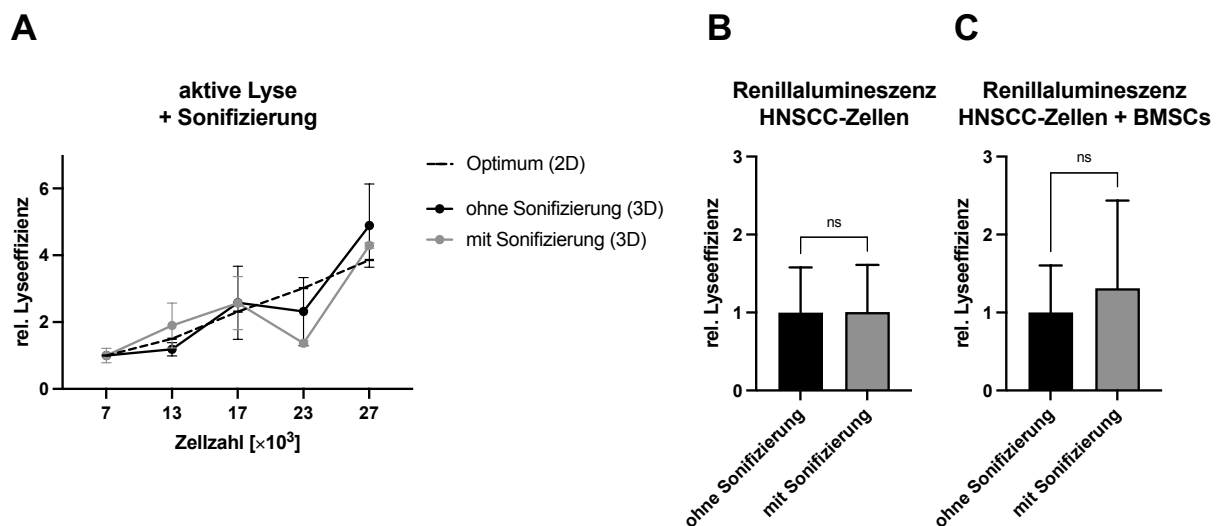


Abbildung 27: Lyseeffizienz in 3D-Zellkultur nach Einsatz von Ultraschallwellen zusätzlich zur aktiven Lyse.

Die Transfektion erfolgte in adhärennten HNSCC-Zellen. Anschließend wurden für drei Tage Sphäroide (3D) mit 7.000, 13.000, 17.000, 23.000 und 27.000 Zellen generiert. Pro Probe wurden 30 Sphäroide analysiert. Lysiert wurde mittels passiver Lyse (100 μ l PLB/Probe; Einsatz von 50 μ l/Messung), zweimaligen Schockfrierens (aktive Lyse) sowie Ultraschallwellenbehandlung (Sonifizierung) (50 % Intensität, 20 s, im Intervall). Dargestellt wird die relative Lyseeffizienz, d.h. die gemessene relative Renilla-Luciferase-Aktivität. **A** Normalisiert wurde in beiden Gruppen auf den Mittelwert der niedrigsten eingesetzten Zellzahl (rel. Lyseeffizienz). Die Lyseeffizienz von adhärennten Zellen (2D), dargestellt als gestrichelte Linie (aus Abbildung 25), diente als interne Kontrolle für das Erreichen des Lyseeffizienz-Optimums. **B** Optimierung der Lyseeffizienz in Sphäroiden aus Tumorzellen (HNSCC-Zellen) und **C** Mischsphäroiden (HNSCC-Zellen + BMSCs). Normalisiert wurde jeweils auf den Mittelwert aller mit passiver Lyse behandelten Zellen (rel. Lyseeffizienz). *Paired t-test*. N=3. Ns $p \geq 0,05$.

3.1.2 Ermittlung der MMP-9 Promotoraktivität in HNSCC-Zellen

Um die Initiierung der Neusynthese von MMP-9 in Tumorzellen im Vergleich zwischen 2D- und 3D-Zellkultur in den HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68 zu ermitteln, erfolgte die Berechnung der jeweiligen relativen Promotoraktivität. Als Referenz diente die MMP-9 Promotoraktivität der Zelllinie PCI 1 aus 2D-Zellkultur. Abbildung 28 zeigt in allen untersuchten Zelllinien eine nachweisbare MMP-9 Promotoraktivität. Das basale Level der MMP-9 Transkription unterschied sich allerdings von 2D- zu 3D-Kultivierung sowie im Vergleich der untersuchten HNSCC-Zelllinien untereinander.

In 2D-Zellkultur zeigten die adhärent kultivierten HNSCC-Zelllinien PCI 1 und PCI 13 eine vergleichbare MMP-9 Promotoraktivität, die sich kaum voneinander unterschied. Im Vergleich zu Zelllinie PCI 1 und PCI 13 zeigte die HNSCC-Zelllinie PCI 68 eine deutlich geringere MMP-9 Promotoraktivität. Diese war um 42 % (SD \pm 0,13) geringer. Dieser Unterschied erwies sich als signifikant.

Bei Kultivierung in 3D kam es zu einer signifikanten Verringerung der Promotoraktivität in den Zelllinien PCI 1 (78 % SD \pm 0,16) und PCI 13 (52 % SD \pm 0,31) im Vergleich zur 2D-Zellkultur. Dagegen erhöhte sich die Aktivität in der Zelllinien PCI 68 um das 4,2-fache (SD \pm 1,44) und zeigte die höchste MMP-9 Promotoraktivität unter den drei untersuchten HNSCC-Zelllinien.

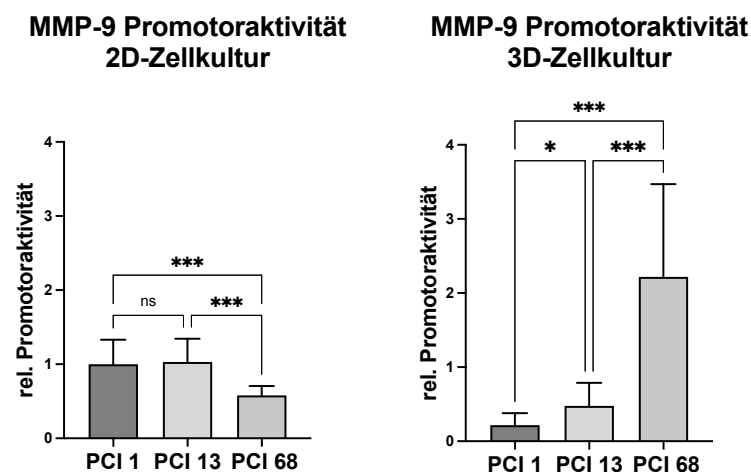


Abbildung 28: Relative MMP-9 Promotoraktivität in HNSCC-Zellen aus 2D- und 3D-Zellkultur.

Die Berechnung der relativen Promotoraktivität in 2D- (links) und 3D-Zellkultur (rechts) erfolgte in Relation zur Promotoraktivität in der HNSCC-Zelllinie PCI 1 aus 2D-Zellkultur. Adhärenente Zellen wurden subkonfluent geerntet, für 3D-Zellkultur wurden Sphäroide drei Tage lang kultiviert. Statistische Auswertung: *Ordinary one-way ANOVA*, Mehrfachvergleich mit Tukey's Korrektur. Ns $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. $N \geq 30$.

3.1.3 Änderung der MMP-9 Promotoraktivität in HNSCC-Zellen bei Co-Kultivierung mit BMSCs

Um zu untersuchen, ob sich die MMP-9 Promotoraktivität in HNSCC-Zellen bei Kontakt mit BMSCs ändert, wurde neben HNSCC-Zellen in Monokultur auch HNSCC-Zellen in Co-Kultur mit BMSCs analysiert. Dies erfolgte sowohl in 2D- als auch in 3D-Zellkultur. In den folgenden Versuchen wurden die HNSCC-Zelllinien mit dem Luciferase-Reporter transfiziert, nicht jedoch die BMSCs.

Abbildung 29 zeigt, dass die Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen mit BMSCs zu einer Verringerung der MMP-9 Promotoraktivität in HNSCCs führte. Diese Beobachtung zeigte sich sowohl in 2D- als auch in 3D-Kultivierung. In adhärent kultivierten HNSCC-Zellen (2D-Zellkultur) der Zelllinien PCI 1 und PCI 68 war die Verringerung MMP-9 Promotoraktivität signifikant, wenn diese zusammen mit BMSCs kultiviert wurden. Die Zelllinie PCI 13 zeigte eine Tendenz zur Verringerung der MMP-9 Promotoraktivität in Mischkultur. Diese war jedoch nicht signifikant ($p=0,073$). Die Verringerung der relativen Promotoraktivität war in allen Zelllinien ähnlich (0,58-0,81).

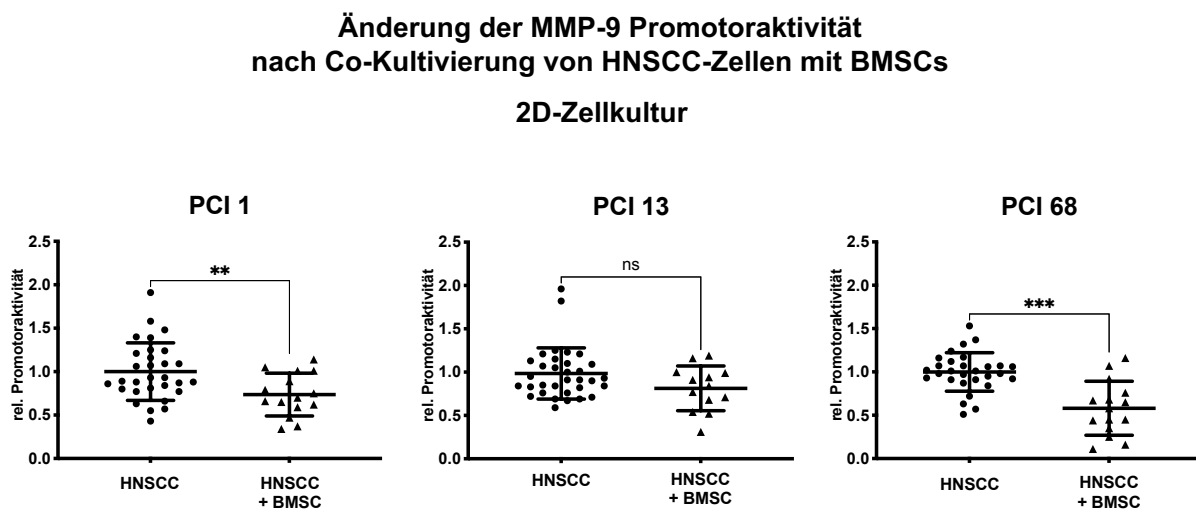


Abbildung 29: Änderung der MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen (HNSCC) bei Co-Kultivierung mit BMSCs, 2D-Zellkultur

Errechnet wurde die relative MMP-9 Promotoraktivität der HNSCC Zelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68 bei Co-Kultivierung mit BMSCs. Deren Aktivität wurde verglichen mit der MMP-9 Promotoraktivität von HNSCCs in Monokultur. Alle untersuchten Zellen stammten aus 2D-Zellkultivierung. Die relative Promotoraktivität wurde in Relation zum Mittelwert der Aktivität aus 2D-Monokultur der jeweiligen Zelllinien berechnet. Statistische Auswertung: *Unpaired t-test*. $ns\ p\geq 0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$. $N=30$.

Ähnlich wie die Ergebnisse der Zellen in 2D-Kultur zeigten auch die 3D-kultivierten HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 13, PCI 68 bei Co-Kultivierung mit BMSCs eine signifikant verringerte Aktivität des MMP-9 Promotors im Vergleich zu Tumorsphäroiden aus Monokultur. Dies wird in Abbildung 30 deutlich. Die gemessene MMP-9 Promotoraktivität war bei Zelllinie PCI 13 in Co-Kultur mit BMSCs besonders stark erniedrigt (0,18; SD \pm 0,10).

Änderung der MMP-9 Promotoraktivität nach Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen mit BMSCs 3D-Zellkultur

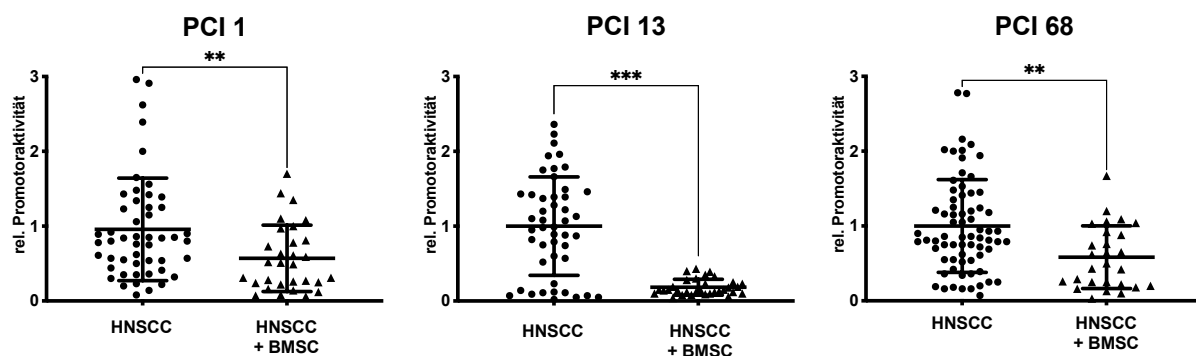


Abbildung 30: Änderung der MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen (HNSCC) bei Co-Kultivierung mit BMSCs, 3D-Zellkultur

Errechnet wurde die relative MMP-9 Promotoraktivität der HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68 bei Co-Kultivierung mit BMSCs. Deren Aktivität wurde verglichen mit der MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen in Monokultur. Alle Zellen stammten aus 3D-Zellkultivierung. Die relative Promotoraktivität wurde mit Bezug auf den Mittelwert der Promotoraktivität aus 3D-Monokultur der jeweiligen Zelllinien errechnet. Statistische Auswertung: *Unpaired t-test*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $N \geq 30$.

3.1.4 Einfluss des Verhältnisses aus HNSCC-Zellen und BMSCs auf die MMP-9 Promotoraktivität

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Konfluenz der adhärent kultivierten HNSCC-Zelllinien sowie die Zelldichte der 3D kultivierten Sphäroidpopulationen Einfluss auf die MMP-9 Promotoraktivität haben. Zudem sollte geprüft werden, ob bei Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen und BMSCs das Verhältnis zwischen HNSCC-Zellen und BMSCs Einfluss auf die Änderung der MMP-9 Promotoraktivität hat. Die Zellzahl der BMSCs wurde konstant gehalten, während die Zellzahl der HNSCCs variierte.

3.1.4.1 Einfluss von Konfluenz und BMSC-Zahl auf die MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen in 2D-Zellkultivierung

Für Experimente in 2D-Zellkultur wurden Zellzahlen von insgesamt 25.000 bis 105.000 Zellen pro 6-Well ausgesät, die zum Erntezeitpunkt Konfluenzen von etwa 50-100 % entsprachen. Bei Co-Kultivierung wurde die Zellzahl der BMSCs bei 15.000 Zellen pro 6-Well gehalten, wobei die Zellzahl der HNSCC-Zellen zwischen 10.000 und 90.000 Zellen pro Well variierte. Die Gesamtzellzahlen bei Co-Kultivierung entsprachen denen der Monokultur von HNSCC-Zellen, um einen direkten Vergleich des Mischungsverhältnisses bei identischer Konfluenz zu ermöglichen.

Die Analyse von HNSCC-Zellen in Monokultur (links) zeigte einen Einfluss der Konfluenz auf die MMP-9 Promotoraktivität. Abbildung 31 veranschaulicht, dass die MMP-9 Promotoraktivität abnahm, je größer die initial ausgesäte Zellzahl und damit die Zelldichte bei der Ernte war. Bei sehr hoher Konfluenz, nach einer Aussaat von 85.000 und 105.000 HNSCC-Zellen, erwies sich diese Beobachtung als signifikant ($p=0,02$ und $p=0,002$).

In Mischpopulationen aus HNSCC-Zellen und BMSCs hatte eine Erhöhung der ausgesäten Zahl an HNSCC-Zellen bei gleichbleibender Zahl an ausgesäten BMSCs keinen signifikanten Einfluss auf die Promotoraktivität. Gegenüber der Monokultur aus HNSCC-Zellen zeigte die Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen und BMSCs eine generell erniedrigte MMP-9 Promotoraktivität (vergleiche Abbildung 29 oben). Dieser Effekt wird bei Änderung des Mischungsverhältnisses aufgehoben, wenn die Zahl der HNSCC-Zellen die der BMSCs deutlich übersteigt. Dies wurde ab einem Mischungsverhältnis von HNSCC-Zellen und BMSCs von 2:1 bis 6:1 beobachtet.

MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen in Abhängigkeit von Konfluenz und BMSC-Zahl 2D-Zellkultur

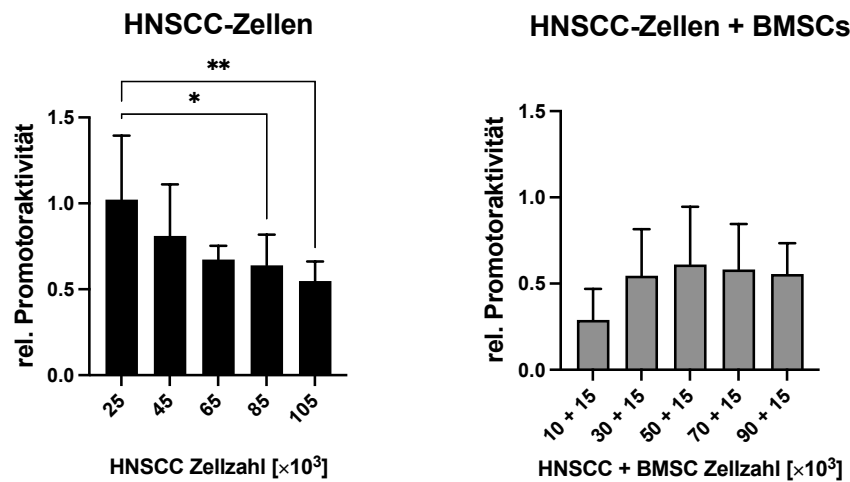


Abbildung 31: MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen in Abhängigkeit von Konfluenz und dem Verhältnis von BMSCs zu HNSCC-Zellen, 2D-Zellkultur.

Errechnet wurde die relative MMP-9 Promotoraktivität der HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68 in Monokultur (links) und Co-Kultivierung mit BMSCs (rechts), in Abhängigkeit von Konfluenz und Mischungsverhältnis. Alle Zellen stammten aus 2D-Zellkultivierung. Es wurden 25.000, 45.000, 65.000, 85.000 und 105.000 Zellen ausgesät. Dabei wurden bei Co-Kultur anteilig immer 15.000 BMSCs ausgesät. Die relative Promotoraktivität wurde in Bezug auf den Mittelwert der Promotoraktivität aus 2D-Monokultur mit 25.000 Zellen der jeweiligen Zelllinien errechnet. Die drei HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68 wurden gemittelt. Statistische Auswertung: *Ordinary one-way ANOVA*, Mehrfachvergleich mit Tukey's Korrektur. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. $N=9$.

3.1.4.2 Einfluss von Sphäroidgröße und BMSC-Zahl auf die MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen in 3D-Zellkultivierung

Für Experimente in 3D-Zellkultur wurden Sphäroidpopulationen mit Zellzahlen von 7.000 bis 27.000 Zellen pro Sphäroid generiert. Diese Zellzahlen führten bis zum Erntezeitpunkt zur Bildung eines unterversorgten und nekrotischen Sphäroidkerns bei einer Zellzahl von 27.000. Bei Co-Kultivierung wurde die Zellzahl der BMSCs bei 4.000 Zellen pro Sphäroid gehalten, wobei die Zellzahl der HNSCC-Zellen zwischen 3.000 und 23.000 Zellen pro Sphäroid variierte. Die Gesamtzellzahlen bei Co-Kultivierung entsprachen denen der Monokultur von HNSCC-Zellen in 3D, um einen direkten Vergleich des Mischungsverhältnisses bei identischer Sphäroidgröße zu ermöglichen.

Abbildung 32 zeigt, dass die Sphäroidgröße bei HNSCC-Zellen in Monokultur signifikanten Einfluss auf die MMP-9 Promotoraktivität hat. Bei zunehmender Sphäroidgröße nimmt die MMP-9 Promotoraktivität zu, unabhängig davon, ob die untersuchten HNSCC-Zellen in Monokultur oder in Co-Kultur mit BMSCs waren. Wie auch in 2D-Kultur zeigte die Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen und BMSCs in 3D-Kultur eine generell erniedrigte MMP-9 Promotoraktivität im Vergleich zur HNSCC-Monokultur (vergleiche Abbildung 30 oben). Dieser Effekt zeigte sich unabhängig von der Sphäroidgröße und des Anteils an BMSCs an den Sphäroiden.

MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen in Abhängigkeit von Sphäroidgröße und BMSC-Zahl 3D-Zellkultur

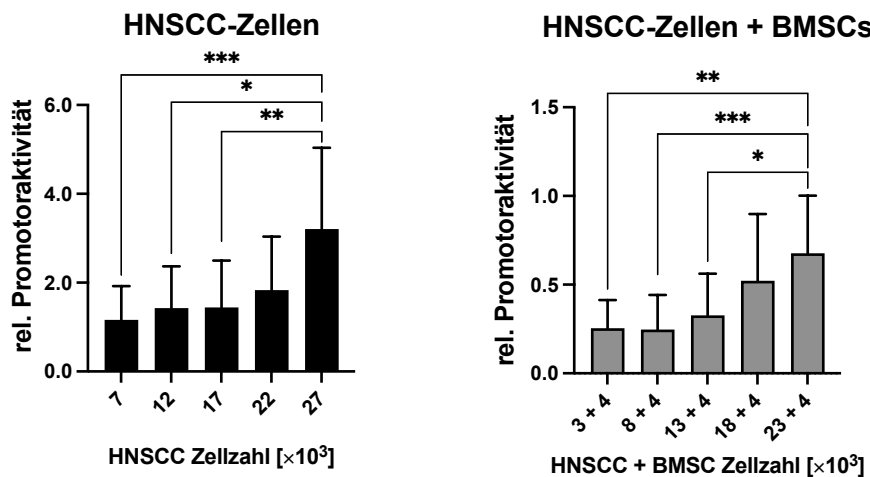


Abbildung 32: MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen (HNSCC) in Abhängigkeit von Sphäroidgröße und dem Verhältnis von BMSCs zu HNSCC-Zellen, 3D-Kultur.

Errechnet wurde die relative MMP-9 Promotoraktivität der HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68 in Monokultur (links) und Co-Kultivierung mit BMSCs (rechts), in Abhängigkeit von Sphäroidgröße und Mischungsverhältnis. Alle Zellen stammten aus 3D-Zellkultivierung. Es wurden 7.000, 12.000, 17.000, 22.000 und 27.000 Zellen ausgesät. Dabei wurden bei Co-Kultur anteilig immer 4.000 BMSCs ausgesät. Die relative Promotoraktivität wurde mit Bezug auf den Mittelwert der Promotoraktivität aus 3D-Monokultur mit 7000 HNSCC-Zellen der jeweiligen Zelllinien errechnet. Die drei HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68 wurden gemittelt. Statistische Auswertung: Kruskal-Wallis Test, Dunn's Korrektur bei Mehrfachvergleich. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. N=9.

3.2 MMP-9 Proteinexpression in HNSCC-, BMSC- und in Mischsphäroiden

Eine Promotoraktivität von MMP-9 konnte bereits in allen drei untersuchten HNSCC-Zelllinien sowohl in Mono- als auch in Mischkultur mit BMSCs nachgewiesen werden. Um die Fähigkeit von HNSCC-Zellen zur Proteinexpression und Aktivität von MMP-9 nachzuweisen, wurde im Anschluss eine Zymographie durchgeführt, bei der bei Anwesenheit von MMPs ein detektierbarer Abbau von Gelatine im Acrylamidgel erfolgte. Da eine Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen mit BMSCs in einer Verringerung der MMP-9 Promotoraktivität resultierte, war nachfolgend von Interesse, ob auch die MMP-9 Proteinexpression und Aktivität von HNSCC-Zellen in Co-Kultivierung angepasst wird.

3.2.1 Ermittlung der MMP-9 Proteinexpression mittels Zymographie

Um die MMP-9 Proteinexpression und Aktivität von HNSCC-Zellen in Co-Kultivierung mit BMSCs zu untersuchen, erfolgte die Detektion von MMP-9 sowie deren Vorstufen mittels Gelatine-Zymographie. Bei Anwesenheit von funktionellen Gelatinasen (MMPs) wird Gelatine im Acrylamidgel verdaut. Stellen, an denen es zum Gelatineverdau kam, sind im Anschluss nicht mehr färbbar und als durchsichtige Banden im Gel detektierbar und quantifizierbar. Auf diese Weise wurden die HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68 mit jeweils drei BMSC-Spendern untersucht. Als Kontrollen dienten HNSCC-Zellen und BMSCs jeweils in Monokultur. Analysiert wurde die MMP-9 Proteinexpression, -sekretion und Aktivität sowohl in serumfreiem Medium (Überstand) als auch in Zelllysat. Da sich die Ergebnisse zwischen Überständen und Zelllysaten kaum unterschieden, wird im Folgenden nur die Zymographie mit Zellüberstand gezeigt. Für die Analyse wurden nur Proteine ab einem Molekulargewicht von 50 kDa berücksichtigt. Der Einsatz von rekombinantem MMP-9 diente zur Orientierung. Ebenfalls wurde rekombinantes MMP-2 im Zymogramm eingesetzt, da es sich bei MMP-2 und MMP-9 um die beiden dominierenden Enzyme des Gelatineverdaus handelt. Eine orientierende Unterscheidung zwischen MMP-9 und MMP-2 ist nur über das Molekulargewicht möglich. Banden unterschiedlichen Molekulargewichts deuten ebenfalls auf die Anwesenheit unterschiedlicher MMP-Formen hin, wobei pro-MMPs als Vorstufe aktiver MMPs, ein höheres Molekulargewicht besitzen. Aktive MMPs, die enzymatisch modifiziert wurden, besitzen ein geringeres Molekulargewicht.

Abbildung 33 zeigt ein repräsentatives Zymogramm aus Zellüberstand. Mischsphäroide aus HNSCC-Zellen und BMSCs zeichneten sich durch eine deutlich erhöhte pro-MMP-9 Expression im Vergleich zu HNSCCs in Monokultur aus. In HNSCC-Zell-Sphäroiden war eine Proteinexpression von MMP-9 kaum detektierbar. Dies zeigte sich auch in BMSCs aus Monokultur. In BMSC-Sphäroiden zeigte sich besonders eine pro-MMP-2 Aktivität, welche in Mischsphäroiden ebenfalls gezeigt werden konnte, diese fiel jedoch schwächer aus. Eine MMP-2 Expression war in HNSCC-Zellen kaum nachweisbar. Die Sphäroidgröße hatte in BMSCs keinen nachweisbaren Einfluss auf die Menge an sezernierten Gelatinasen. HNSCC-Zell-Sphäroide zeigten mit Zunahme der Zellzahl je Sphäroid ebenfalls eine Zunahme der Gelatinasen-Aktivität.

Die MMP-9 Proteinexpression unterschied sich zwischen Zelllysaten (nicht gezeigt) und untersuchtem konditioniertem Medium (Überstand) nicht.

Zymographie zur Ermittlung der MMP Aktivität in HNSCC -, BMSC- und Mischsphäroiden

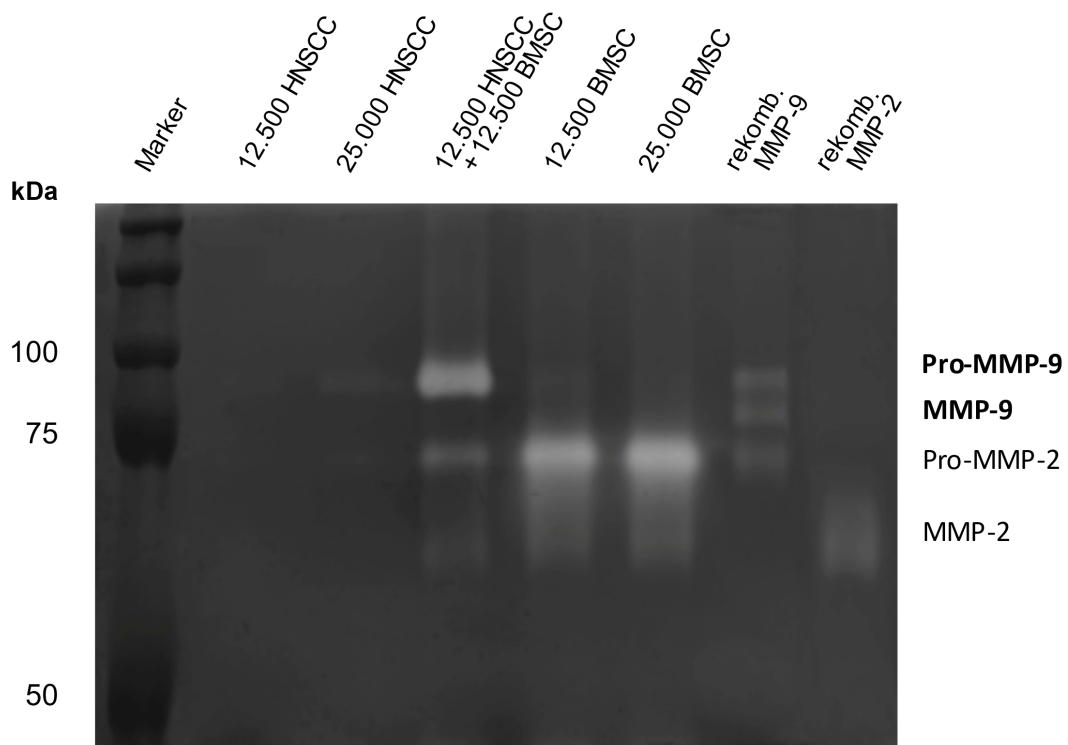


Abbildung 33: Ermittlung der MMP-9 Proteinexpression, -sekretion und Aktivität in HNSCC-Zellen und/oder BMSCs mittels Zymographie im Überstand.

Die Abbildung zeigt eine exemplarische Zymographie mit Detektion von MMP-9 und MMP-2 in BMSC-, HNSCC- und Mischsphäroiden. Gel: 10 % Acrylamid, 0,1 % Gelatine. Die Zellen wurden über drei Tage zu Sphäroiden geformt. 24 h vor Ernte der Sphäroide erfolgte ein Mediumwechsel zu serumfreiem Medium, um Hintergrundsignal bei der zymographischen MMP-Detektion zu eliminieren. Als Proben wurden serumfreie Überstände der Sphäroide verwendet. Probemenge: 2 µg. Marker: *Precision Plus Protein Dual Color* (Bio-Rad). Rekombinantes Protein: MMP-9 0,05 ng (0,1 mg/ml) und MMP-2 0,5 ng (0,1 mg/ml). Die Zymographie wurde jeweils mit drei verschiedenen BMSC-Spendern und den drei HNSCC-Zelllinien PCI 1, 13 und 68 durchgeführt.

3.2.2 MMP-9 siRNA Knockdown zur Ermittlung des verantwortlichen Zelltyps für die MMP-9 Synthese in Mischsphäroiden

Um den Einfluss auf die erhöhte Sekretion von MMP-9 in den Mischsphäroiden durch HNSCC-Zellen und BMSCs näher zu untersuchen, wurde ein Knockdown (KD) von MMP-9 mittels siRNA Transfektion sowohl in HNSCC-Zellen als auch in BMSCs durchgeführt. Als Kontrolle diente eine Transfektion mit *non-targeting* siRNA (NT). Der KD wurde in den PCI-Zelllinien 1, 13 und 68 sowie in BMSCs von drei verschiedenen Spendern durchgeführt. Die entsprechend transfizierten Zellen wurden als Mischsphäroide in einem Verhältnis von 1:1 für drei Tage kultiviert. Die Überstände der Sphäroide wurden anschließend in der Gelatine-Zymographie auf die Sekretion von Gelatinasen, insbesondere MMP-9, hin analysiert.

In den Mischsphäroiden resultierte der MMP-9 KD in BMSCs in einer kaum noch detektierbaren MMP-9 Aktivität. Die mit NT-siRNA transfizierten Kontrollen wiesen weiterhin eine deutliche MMP-9 Aktivität auf, wie sie auch in gänzlich unbehandelten Mischsphäroiden zu sehen war. Die Aktivität von MMP-2 blieb, unverändert. In Sphäroiden mit MMP-9 KD in HNSCC-Zellen zeigten dagegen sowohl transfizierte Mischsphäroide als auch die mit *non-targeting* siRNA transfizierte Kontrolle eine Sekretion von MMP-9. Auch die MMP-2 Aktivität blieb unverändert. Die Abbildung 34 zeigt ein beispielhaftes Zymogramm nach MMP-9 KD in BMSCs und HNSCC-Zellen. Diese Daten fanden Eingang in die Publikation Wessely et. al. (239).

Zymographie zur Ermittlung des verantwortlichen Zelltyps für die MMP-9 Synthese in Mischsphäroiden

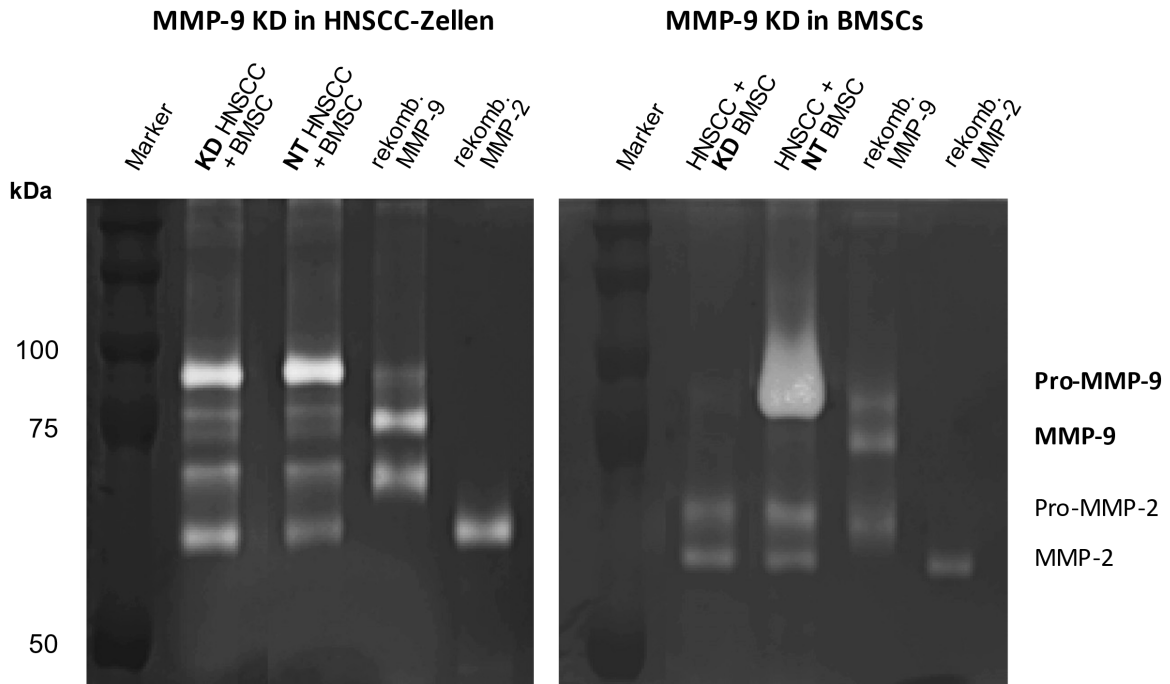


Abbildung 34: Nachweis der MMP-9 Aktivität in Mischsphäroiden nach MMP-9 siRNA KD in BMSCs bzw. HNSCC-Zellen mittels Zymographie.

Die Abbildung zeigt eine exemplarische Zymographie nach MMP-9 siRNA KD in BMSCs (rechts) und HNSCC-Zellen (links) in Mischsphäroiden zur Ermittlung des verantwortlichen Zelltyps für die MMP-9 Synthese. Als Kontrolle diente die Transfektion mit NT-siRNA. Gel: 10 % Acrylamid, 0,1 % Gelatine. Als Proben wurden serumfreie Überstände der Sphäroide verwendet. Probemenge: 2 µg. Marker: *Precision Plus Protein Dual Color* (Bio-Rad). KD = Transfektion mit spezifischer MMP-9 siRNA, NT= Transfektion mit *non-targeting* siRNA. Rekombinantes Protein: 0,05 ng (0,1 mg/ml) MMP-9 und 0,5 ng (0,1 mg/ml) MMP-2. Das Experiment wurde jeweils mit drei verschiedenen BMSC-Spendern und drei PCI-Zellreihen durchgeführt. Diese Abbildung wurde publiziert in Wessely et. al. (239).

Abbildung 35 zeigt die semiquantitative Analyse der MMP-9 Aktivität in Mischsphäroiden nach KD von MMP-9 durch siRNA. Als Kontrolle diente eine Transfektion mit *non-targeting* siRNA (NT). Der KD wurde in den PCI-Zelllinien 1, 13 und 68 sowie in BMSCs von drei verschiedenen Spendern durchgeführt. Die entsprechend transfizierten Zellen wurden als Mischsphäroide in einem Verhältnis von 1:1 für drei Tage kultiviert. Die Überstände der Sphäroide wurden anschließend in der Gelatine-Zymographie auf die Sekretion von MMP-9 hin analysiert. Die semiquantitative Analyse erfolgte nach fotografischen Aufnahmen der Gelatine-Zymographie durch Vergleich der Dichte der Banden innerhalb eines Gels. Normalisiert wurde jeder gemessene Dichtewert auf die im jeweiligen Zymogramm vorhandene Dichte an rekombinanten MMP-9. Die so gemessene relative Proteinexpression an MMP-9 spiegelt die visuellen Ergebnisse aus der Zymographie (siehe auch Abbildung 34 oben). Es erfolgte eine signifikante Reduktion ($p=0,008$) der MMP-9 Aktivität nach KD in BMSCs (rechts). Die MMP-9 Aktivität nach KD in HNSCC-Zellen reduzierte sich dagegen nicht signifikant ($p=0,653$) verglichen mit den Kontrollen nach KD mit NT siRNA (links).

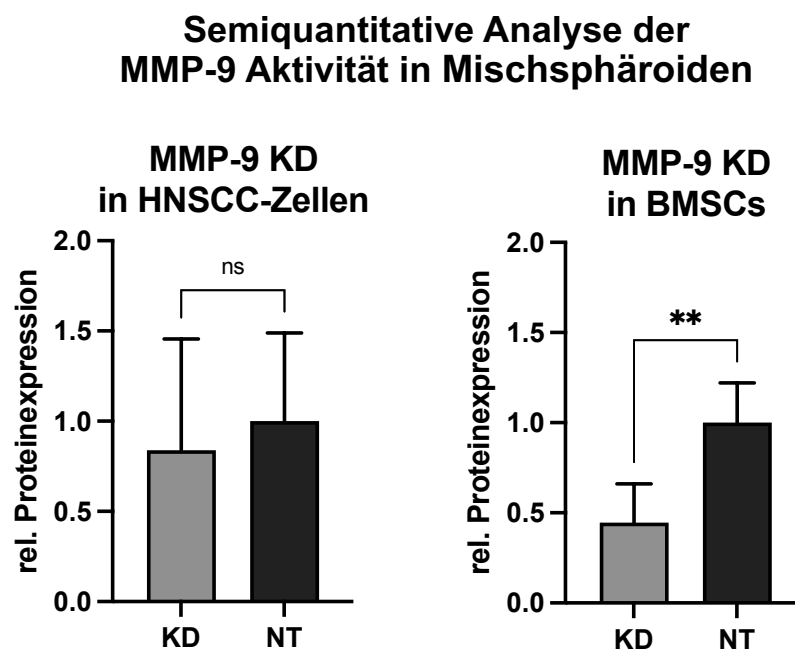


Abbildung 35: Quantifizierung der im Zymogramm detektierten MMP-9 Aktivität in Mischsphäroiden nach MMP-9 KD.

Gezeigt wird die semiquantitative Analyse der MMP-9 Proteinexpression nach MMP-9 siRNA KD in BMSCs (rechts) und HNSCC-Zellen (links) in Mischsphäroiden zur Ermittlung des verantwortlichen Zelltyps für die MMP-9 Synthese. KD = Transfektion mit spezifischer MMP-9 siRNA, NT = Transfektion mit *non-targeting* siRNA. Die jeweilige NT-Kontrolle diente als Referenz. *Paired t-test*. Ns $p \geq 0,05$; ** $p < 0,01$. N=3.

3.2.3 Analyse der MMP-9 Synthese in Mischsphäroiden nach Runx2 siRNA Knockdown in HNSCC-Zellen

Um den Einfluss von Runx2 auf die erhöhte Sekretion von MMP-9 in den Mischsphäroiden aus HNSCC-Zellen und BMSCs zu untersuchen, wurde ein Knockdown (KD) von Runx2 mittels siRNA Transfektion in HNSCCs durchgeführt. Bei Runx2 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der durch Bindung an die MMP-9 Promotorregion die MMP-9 Expression initiieren kann (204). Als Kontrolle diente eine Transfektion mit *non-targeting* siRNA (NT). Der KD wurde in den PCI-Zelllinien 1, 13 und 68 sowie in BMSCs von drei verschiedenen Spendern durchgeführt. Die entsprechend transfizierten Zellen wurden als Mischsphäroide in einem Verhältnis von 1:1 für drei Tage kultiviert. Die Überstände der Sphäroide wurden anschließend in der Gelatine-Zymographie auf die Sekretion von Gelatinasen, insbesondere MMP-9, hin analysiert.

In den Mischsphäroiden resultierte der Runx2 KD in einer leicht reduzierten MMP-9 Aktivität. Die mit NT-siRNA transfizierten Kontrollen wiesen weiterhin eine deutliche MMP-9 Aktivität auf. Die Aktivität von MMP-2 blieb unverändert. Die Abbildung 36 A zeigt ein beispielhaftes Zymogramm nach Runx2 KD in BMSCs und HNSCC-Zellen. Die semiquantitative Analyse der MMP-9 Aktivität in Abbildung 36 B zeigt ebenfalls eine leichte Reduktion der MMP-9 Synthese nach Runx2 KD in HNSCC-Zellen. Diese war jedoch nicht signifikant ($p=0,1$). Die semiquantitative Analyse erfolgte nach fotografischen Aufnahmen der Gelatine-Zymographie durch Vergleich der Dichte der Banden innerhalb eines Gels. Normalisiert wurde jeder gemessene Dichtewert auf die im jeweiligen Zymogramm vorhandene Dichte an rekombinanten MMP-9.

Ermittlung der MMP-9 Synthese in Mischsphäroiden nach KD von Runx2 in HNSCC-Zellen

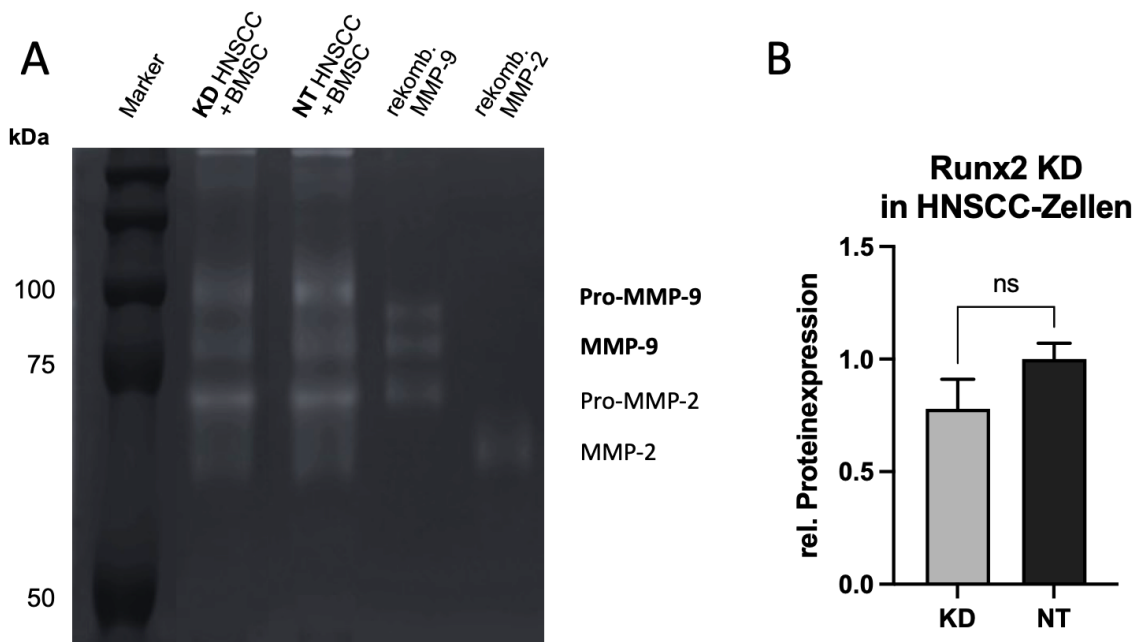


Abbildung 36: Nachweis (A) und semiquantitative Analyse (B) der MMP-9 Aktivität in Mischsphäroiden nach Runx2 siRNA KD in HNSCC-Zellen mittels Zymographie

A zeigt eine exemplarische Zymographie nach Runx2 siRNA KD in HNSCC-Zellen in Mischsphäroiden. Als Kontrolle diente die Transfektion mit NT siRNA. Gel: 10 % Acrylamid, 0,1 % Gelatine. Als Proben wurden serumfreie Überstände der Sphäroide verwendet. Probemenge: 2 µg. Marker: *Precision Plus Protein Dual Color* (Bio-Rad). KD = Transfektion mit spezifischer MMP-9 siRNA, NT = Transfektion mit *non-targeting* siRNA. Rekombinantes Protein: 0,05 ng (0,1 mg/ml) MMP-9 und 0,5 ng (0,1 mg/ml) MMP-2. Das Experiment wurde jeweils mit drei verschiedenen BMSC-Spendern und drei PCI-Zellreihen durchgeführt. B Zeigt die semiquantitative Analyse der MMP-9 Proteinexpression nach Runx2 siRNA KD in HNSCCs in Mischsphäroiden. KD = Transfektion mit spezifischer Runx2 siRNA, NT= Transfektion mit *non-targeting* siRNA. Die jeweilige NT-Kontrolle diente als Referenz. *Paired t-test*. Ns $p \geq 0,05$. N=3.

3.3 Ausbreitungsverhalten von HNSCC-, BMSC- und Mischpopulationen auf Matrigel®

Um die Interaktionsfähigkeit von HNSCCs mit der Basalmembran zu überprüfen, wurden Tumorzellen auf Matrigel® ausgesät und deren Ausbreitungsverhalten beobachtet.

Dafür wurde eine 48-Well Platte mit Matrigel® beschichtet. Bei Matrigel® handelt es sich um eine Matrix bestehend aus extrazellulären Proteinen wie Laminin, Kollagen IV, Entactin und Heparansulfatproteoglykan, die so der Imitation einer Basalmembran *in vitro* dient (253–255). Bei den verwendeten Tumorzellen handelte es sich um die HNSCC-Zelllinien PCI 1 und PCI 13. Ebenfalls getestet wurde das Ausbreitungsverhalten von Tumorzellen in Co-Kultur mit BMSCs. Als Kontrolle wurden ausschließlich BMSCs verwendet. Die Zellen wurden vor Beginn des *Spreadingassays* zu Sphäroiden geformt und 72 h lang in 3D-Kultur kultiviert. Im Anschluss wurde jeweils ein Sphäroid in ein beschichtetes Well übersiedelt und das Ausbreitungspotential über einen Zeitraum von 96 h beobachtet. Die von den Zellen eingenommene Fläche wurde sowohl direkt nach der Umsiedlung als auch folgend alle 24 h durch fotografische Aufnahmen am Lichtmikroskop dokumentiert und quantifiziert (Abbildung 37 und Abbildung 38).

Die repräsentativen lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 37 zeigten, dass die Ausbreitung auf Matrigel® abhängig vom Zelltyp ist. Tumorsphäroide besaßen nicht die Möglichkeit mit der Matrix zu interagieren, adhärirten kaum und blieben über den beobachteten Zeitraum in ihrer ursprünglichen Sphäroidform bestehen. Wurden die Tumorzellen gemeinsam mit BMSCs inkubiert, adhärirten die Sphäroide und breiteten sich kontinuierlich über den beobachteten Zeitraum in der Zellkulturschale aus. Diese Beobachtung wurde ebenfalls für BMSC-Sphäroiden gemacht.

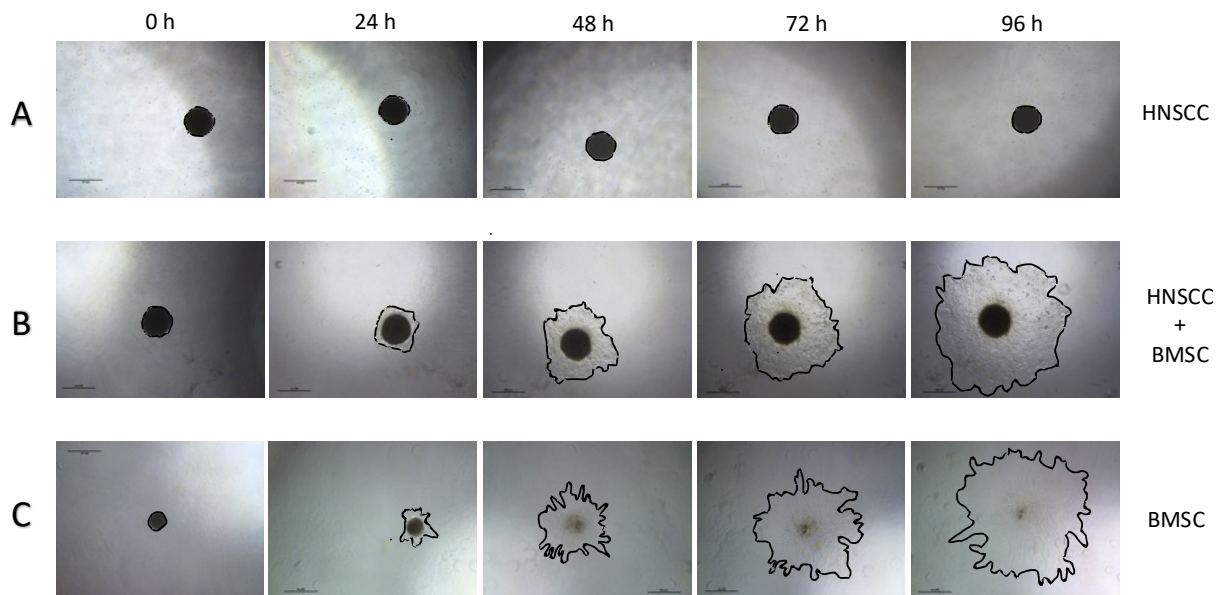


Abbildung 37: Ausbreitungsverhalten von HNSCC-Zellen in Abhängigkeit von BMSCs.

Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen des Wachstums von Tumorsphäroiden aus HNSCC-Zellen (HNSCC), heterogenen Mischsphäroiden aus HNSCC-Zellen mit BMSCs (HNSCC + BMSCs) und BMSCs nach 0, 24, 48, 72 und 96 h auf Matrigel®. Vierfache Vergrößerung. Der Maßstab entspricht 500 μm . **A** zeigt ein exemplarisches HNSCC-Tumorsphäroid der Zelllinie PCI 1 aus 18.000 Zellen. **B** zeigt ein exemplarisches Mischsphäroid aus BMSCs und HNSCC-Zellen mit einer Gesamtzellzahl von 22.000 Zellen, bestehend aus 4.000 BMSCs und 18.000 HNSCC-Zellen der Zelllinie PCI 13. **C** zeigt ein exemplarisches BMSCs-Sphäroid aus 4.000 Zellen. N=3.

Abbildung 38 zeigt die Quantifizierung der Flächenänderung im *Spreadingassay*. Für die Bestimmung des Ausbreitungspotentials ist nicht nur allein die von Zellen eingenommene Fläche zum Endzeitpunkt des Experiments entscheidend. Um die Flächenänderung korrekt zu bestimmen, muss die eingenommene Fläche zum Endzeitpunkt in Abhängigkeit von der ausgesiedelten Sphäroidgröße betrachtet werden (relative Flächenänderung).

Tumorzellen zeigten im Vergleich zum Mix mit BMSCs ($p < 0,0001$) sowie ausschließlich BMSCs ($p < 0,0001$) eine signifikant verringerte Flächenausbreitung. Die Flächenausbreitung zwischen Tumorzellen mit BMSCs in Co-Kultur sowie BMSCs zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,3076$), die Flächenausbreitung war allerdings in der BMSC-Population tendenziell größer.

Quantifizierung des Spreadingassays

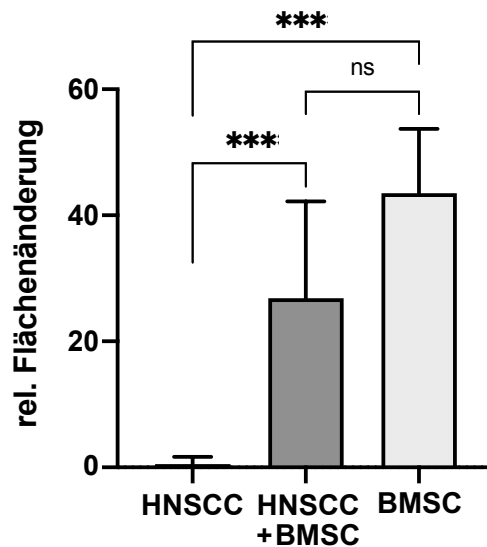


Abbildung 38: Quantifizierung der Flächenänderung im Spreadingassay.

Dargestellt ist die relative Flächenänderung der Zellen von Experimentbeginn bis zum Experimentende nach 96 h in μm^2 . Die Fläche wurde mit der Software Fiji bestimmt. Verglichen werden Tumor-, Misch- und BMSC-Sphäroide. Die Tumorzellen stammten aus den HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68. Die Berechnung der relativen Flächenänderung erfolgte durch Errechnung der Differenz zwischen der Fläche zum Endzeitpunkt und der Fläche bei Aussaat. Statistische Auswertung: *Ordinary one-way ANOVA*, Mehrfachvergleich mit Tukey's Korrektur. Ns $p \geq 0,05$; *** $p < 0,001$. N=30.

Neben unterschiedlichen Ausbreitungsfähigkeiten der verschiedenen Sphäroidpopulationen zeigten sich auch zellmorphologische Unterschiede. Diese werden in Abbildung 39 hervorgehoben. **A** Tumorsphäroide, die nicht migrierten, verblieben in einem engen Zellverband und grenzten sich scharf zur Matrix und der Umgebung hin ab. **C** Sphäroide, bestehend aus BMSCs, präsentierten sich bei Ausbreitung als Zellen mit überwiegend spindelförmiger Morphologie mit spitz auslaufenden Zellfortsätzen und schmalen, länglichen Zellkörpern. Die Fläche, die von migrierten BMSCs eingenommen wurde, hatte im Vergleich zur Mischpopulation mehr Ausläufer und präsentierte sich daher zerklüfteter. Aus dem ursprünglich dichten Ausbreitungszentrum wuchs der überwiegende Anteil der Zellen aus. **B** Dagegen erschien der Rand von Mischsphäroiden weniger zerklüftet mit nur vereinzelt schmal auslaufenden Zellfortsätzen. Der Zellverband der migrierenden Zellen setzte sich aus überwiegend rundlichen Zellen sowie einigen spindelförmigen Zellen zusammen. Aus dem ursprünglich dichten Ausbreitungszentrum wuchsen ebenfalls Zellen aus, dennoch war die Sphäroidform noch sichtbar.

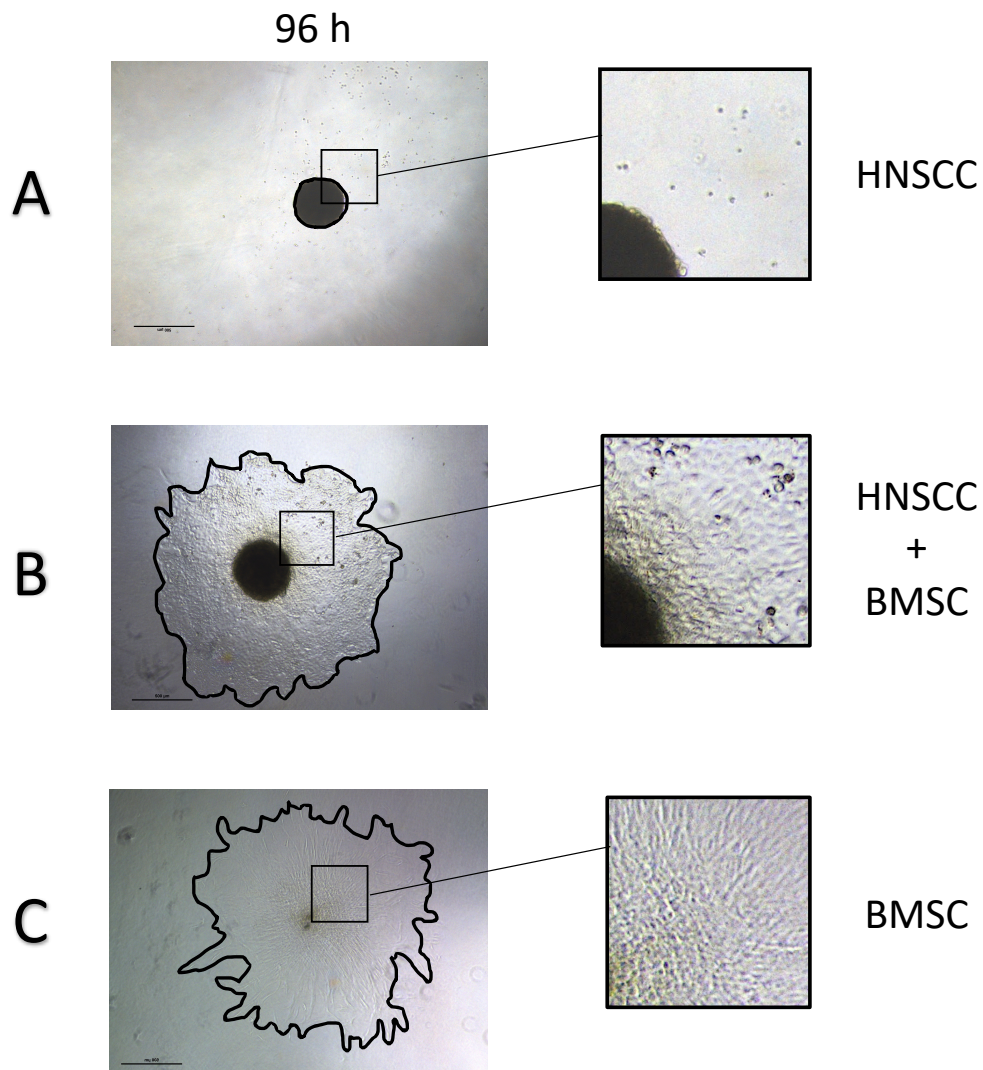


Abbildung 39: Zellmorphologien im *Spreadingassay*.

Bildausschnitte repräsentativer lichtmikroskopischer Aufnahmen von HNSCC-Zellen (HNSCC) (A), heterogenen Mischsphäroiden aus HNSCC-Zellen und BMSCs (B) und BMSCs (C) zum Endzeitpunkt des *Spreadingassays* auf Matrigel® nach 96 h Beobachtungszeit. Die dargestellten Aufnahmen entsprechen denen in Abbildung 37 nach 96 h und heben die Zellmorphologie hervor.

Im *Spreadingassay* auf Matrigel® zeigte sich, dass ein Kontakt von HNSCC-Zellen mit BMSCs die Ausbreitung von HNSCC-Zellen fördert. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt abhängig von dem Mischverhältnis von Tumorzellen zu BMSCs ist, wurden eine definierte Anzahl an BMSCs (4.000 Zellen) mit unterschiedlichen Tumorzellzahlen (3.000, 8.000, 13.000, 18.000 und 23.000 Zellen) kombiniert und deren Ausbreitungsverhalten beobachtet. Die relative Quantifizierung wird in Abbildung 40 gezeigt.

A Zellen der Mischsphäroide, bestehend aus HNSCC-Zellen und BMSCs, konnten in jedem Zellverhältnis auf Matrigel® migrieren. Dennoch gab es zwischen den unterschiedlichen Mischungsverhältnissen Unterschiede in der Ausbreitung. Je höher der Anteil an BMSCs im Mischsphäroid war (3.000 HNSCC-Zellen mit 4.000 BMSCs), desto größer war die durch Ausbreitung eingenommene Fläche. Das Mischungsverhältnis aus 18.000 bzw. 23.000 HNSCC-Zellen auf 4.000 BMSCs führte zu einer signifikanten Verringerung der Ausbreitung. Um zu prüfen, ob auch allein die Zunahme der Tumorzellzahl die Ausbreitung fördert, wurden homogene Tumorsphäroide in den gleichen Gesamtzellzahlen wie die Mischsphäroide untersucht. **B** Tumorsphäroide zeigten ein im Allgemeinen geringes Ausbreitungspotential. Die Sphäroidgröße hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbreitungsfähigkeit. Tumorsphäroide in hoher Zellzahl (27.000 HNSCC-Zellen) begannen sich vereinzelt auf Matrigel® auszubreiten.

C Der Vergleich zwischen Tumor- und Mischsphäroiden zeigte in allen Mischungsverhältnissen bei unterschiedlichen Gesamtzellzahlen einen signifikanten Unterschied, wobei die Mischsphäroide signifikant mehr Ausbreitung über den Beobachtungszeitraum von 96 h zeigten als die Tumorsphäroide.

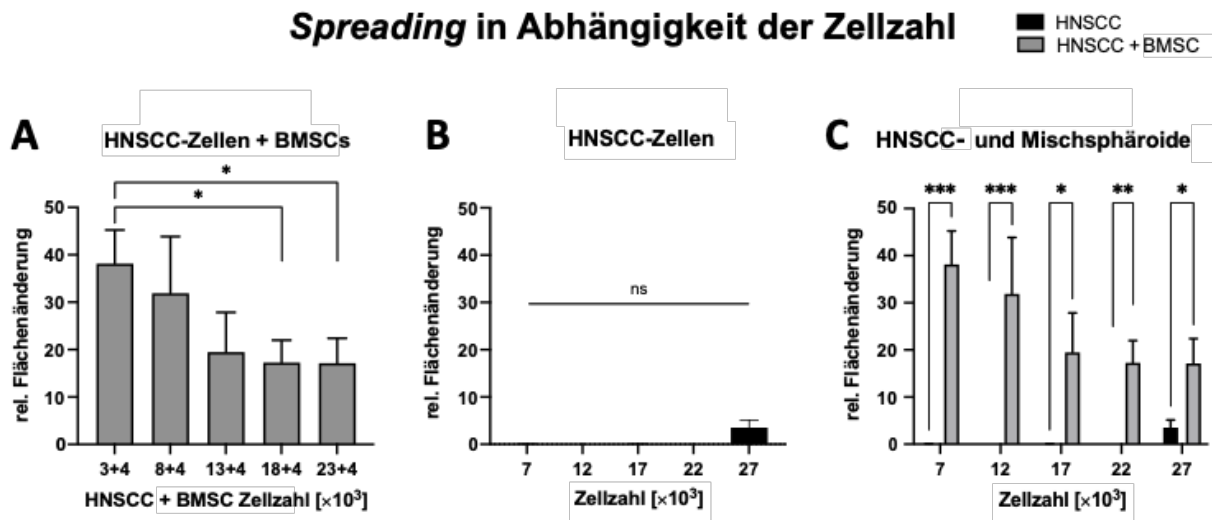


Abbildung 40: Ausbreitungsfähigkeit in Abhängigkeit von Zellzahl und Mischungsverhältnis aus HNSCCs mit BMSCs.

Spreadingassay auf Matrigel® mit unterschiedlichen Gesamtzellzahlen und Mischungsverhältnissen. Die Berechnung der relativen Flächenänderung erfolgte durch Errechnung der Differenz zwischen der Fläche zum Endzeitpunkt (96 h) und der Fläche bei Aussaat (0 h). **A** Bei dem Mischsphäroiden aus HNSCC-Zellen mit BMSCs lag die Anzahl der BMSCs konstant bei 4.000 Zellen, während die Anzahl der Tumorzellen variierte (3.000, 8.000, 13.000, 18.000 und 23.000 Zellen). **B** Als Kontrolle wurden ausschließlich Tumorzellen in unterschiedlichen Zellzahlen untersucht, die den Gesamtzellzahlen der Mischsphäroide entsprachen. Tumorzellen stammten aus den HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68. **C** Vergleich von Tumor- und Mischsphäroiden aus HNSCC-Zellen mit BMSCs in korrespondierenden Zellzahlen (7.000, 12.000, 17.000, 22.000 und 27.000 Zellen als Gesamtzellzahl). Auswertung lichtmikroskopischer Aufnahmen und Vermessung der migrierten Fläche in Fiji mittels Polygonauswahl. Statistische Auswertung: **A, B** *Ordinary one-way* ANOVA, Mehrfachvergleich mit Tukey's Korrektur **C** *Two-way* ANOVA mit Tukey Korrektur. Ns $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $N \geq 9$.

3.4 Ausbreitungsverhalten von Mischpopulationen auf Levamisol-haltigem Matrigel®

Es konnte bereits auf Genexpressionsebene eine signifikant erhöhte Expression von alkalischer Phosphatase (ALP) in Mischsphäroiden verglichen mit Tumorsphäroiden gezeigt werden (239). Dies wurde durch einen ALP-Aktivitätsassay bestätigt. Auch zeigte sich in einem Boyden-Kammer Invasionstest eine deutlich vermehrte Invasion von Mischsphäroiden aus BMSCs und HNSCC-Zellen. Um Auswirkungen der erhöhten Expression von ALP in Mischsphäroiden bezüglich der tumorfördernden Eigenschaften zu untersuchen, wurden jeweils Mischsphäroide unterschiedlicher Verhältnisse (3+4, 8+4, 13+4, 18+4, 23+4) auf einer mit dem ALP-Inhibitor Levamisol behandelten Matrigel® beschichteten 48-Well Platte ausgesät. Ihre Flächenänderung wurde über 96 h beobachtet (Abbildung 41) und deren Ausbreitungsverhalten quantifiziert (Abbildung 42). Diese Daten fanden Eingang in die Publikation Wessely et. al. (239).

Abbildung 41 zeigt exemplarische Fotoaufnahmen dreier Sphäroide nach 96 h Inkubation auf Levamisol-haltigem Matrigel®. Levamisol wurde mit zwei Konzentrationen dem Matrigel® beigemischt (10 µM, 50 µM). Als Kontrolle diente unbehandeltes Matrigel® (0 µM). Sphäroide zeigten bei Anwesenheit von Levamisol eine geringere Flächenausbreitung auf Matrigel®. Bei Einsatz von 10 µM Levamisol war die Flächenausbreitung, verglichen zur Kontrolle, deutlich eingeschränkt. Dieser Effekt zeigte aber keine Korrelation mit einer Erhöhung der eingesetzten Menge an Levamisol auf 50 µM.

Spreadingassay nach Inhibition der ALP-Aktivität

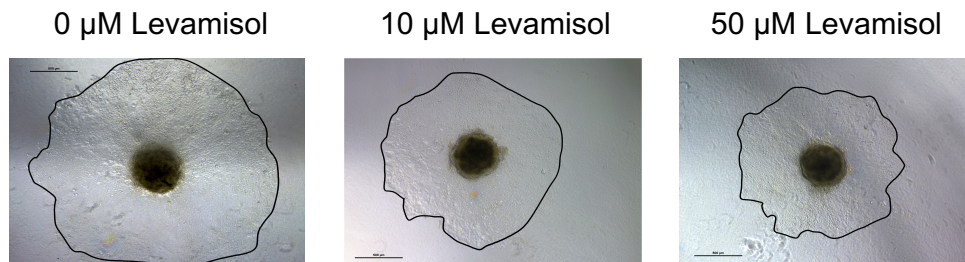


Abbildung 41: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Mischsphäroiden nach Inhibition der ALP-Aktivität durch Levamisol im *Spreadingassay*.

Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Ausbreitung von Mischsphäroiden (HNSCC-Zellen + BMSCs) auf mit unterschiedlichen Konzentrationen von Levamisol (ALP-Inhibitor) behandeltem Matrigel® 96 h nach Aussaat. Der abgebildete Maßstab entspricht einer Länge von 500 μm . Die gezeigten Mischsphäroide wurden in einem Verhältnis von 18.000 HNSCC-Zellen der Zelllinie PCI 1 und 4.000 BMSCs (18+4) generiert. Levamisol wurde in einer Konzentration von 10 μM und 50 μM unter das Matrigel® gemischt. Als Kontrolle diente Matrigel® ohne Levamisol (0 μM). Um die eingenommene Fläche zu kennzeichnen, wurde der jeweilige Rand schwarz markiert. N=3. Die Abbildung wurde publiziert in Wessely et. al. (239).

Abbildung 42 zeigt die Quantifizierung der Flächenausbreitung von Mischsphäroiden im *Spreadingassay* nach Inhibition der ALP-Aktivität durch Levamisol (siehe Abbildung 41). Levamisol war in einer Konzentration von 10 μM und 50 μM im Matrigel® vorhanden. Als Kontrolle diente Matrigel® ohne Levamisol (0 μM). Die Flächenänderung wurde für 96 h beobachtet. Der Einfluss von Levamisol auf das Ausbreitungsverhalten wurde nicht nur abhängig von der Konzentration, sondern auch abhängig vom Verhältnis aus HNSCC-Zellen und BMSCs in den Mischsphäroiden untersucht.

Es zeigte sich eine generelle Verlangsamung der Ausbreitung der Sphäroide auf Matrigel® nach Inhibition der ALP-Aktivität durch Levamisol im Vergleich zur Kontrolle. Die Erhöhung der Levamisol Konzentration von 10 μM auf 50 μM zeigte keine nachweisbare Zunahme dieses Effekts. Das Mischverhältnis von HNSCC-Zellen und BMSCs hatte keinen Einfluss auf die Wirkung des ALP-Inhibitors Levamisol.

Spreading von Mischsphäroiden nach Inhibition von ALP durch Levamisol

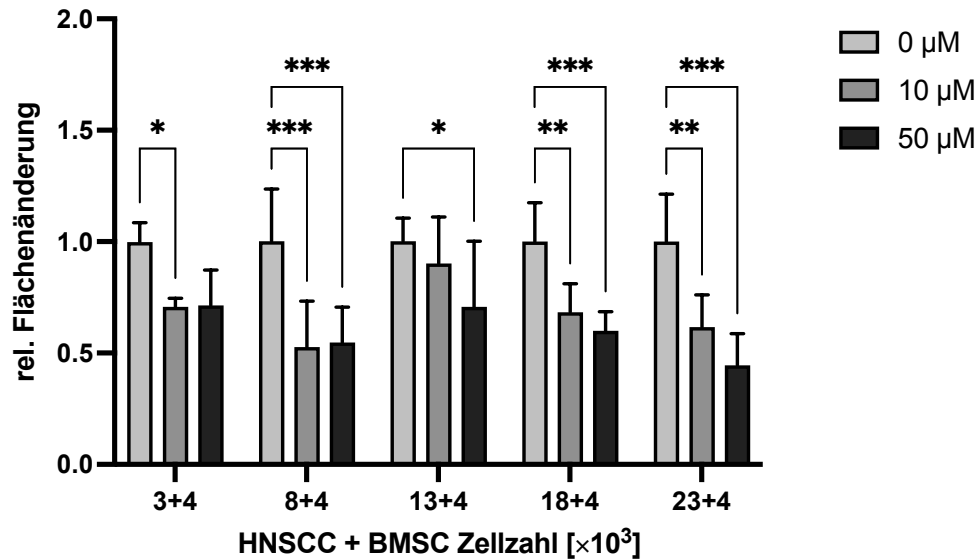


Abbildung 42: Quantifizierung der Flächenausbreitung von Mischsphäroiden nach Inhibition der ALP-Aktivität durch Levamisol.

Quantifizierung lichtmikroskopischer Aufnahmen der Ausbreitung von Mischsphäroiden (HNSCC + BMSC) auf mit unterschiedlichen Konzentrationen von Levamisol (ALP-Inhibitor) behandeltem Matrigel® 96 h nach Aussaat. Die Vermessung der Sphäroidfläche erfolgte durch Polygonauswahl in der Software *Fiji* getreu dem Maßstab in μm^2 . Die Berechnung der finalen Flächenänderung erfolgte durch Errechnung der Differenz zwischen der Fläche zum Endzeitpunkt (96 h) und der Fläche bei Aussaat (0 h). Dargestellt ist die nach 96 h eingenommene relative Flächenänderung. Normalisiert wurde auf den jeweiligen Mittelwert unbehandelter Sphäroide. Der Alkalische Phosphatase Inhibitor Levamisol (0 μM = unbehandelt, 10 μM , 50 μM) hemmt in verschiedenen Konzentrationen die Ausbreitung von Tumormischsphäroiden mit unterschiedlichen Verhältnissen von BMSCs zu HNSCC-Zellen. Die erste Zahl entspricht der Zahl an HNSCCs in den Sphäroiden. N=6. *Two-way* ANOVA mit Tukey Korrektur. Ns $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Teile dieser Daten fanden Eingang in die Publikation Wessely et. al. (239).

4 Diskussion

Trotz der medizinischen Fortschritte hat sich die 5-JÜLR bei Patienten mit HNSCC die letzten Jahrzehnte kaum verbessert. Besonders Patienten in fortgeschrittenen Stadien weisen Überlebensraten von weniger als 40 % auf (42). Oftmals kommt es hier zur Destruktion angrenzender Gewebestrukturen. Zusammen mit der *depth of invasion* (DOI) steht auch die Invasion von Knochengewebe in engem Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose und einem aggressiven Tumorprogress (257). Zudem weisen diese Patienten meist okkulte Metastasen in Halslymphknoten auf und entwickeln in über 50 % Lokalrezidive und Fernmetastasen (56). Das Ausbleiben einer Wende in der Therapiemöglichkeit ist mitunter der Tatsache geschuldet, dass die Mechanismen, die zu ebenjener Invasion, Metastasierung und Rezidivierung von HNSCCs führen, bisher unzureichend verstanden sind. Immer größere Bedeutung für Tumorprogression und Therapieresistenzen wird im letzten Jahrzehnt der Tumormikroumgebung zugeschrieben. Um vielversprechendere Therapieansätze entwickeln zu können, besteht der dringende Bedarf, grundlegende Interaktionen von Zellen im Tumornetzwerk weiter aufzuklären.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (BMSCs) auf Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs zu untersuchen. MSCs wandern im gesunden Organismus im Rahmen von Wundheilung und Gewebsumbau in eine Vielzahl von Geweben ein (258,259). Darüber hinaus wird häufig eine Einwanderung von lokalen und fernen BMSCs in die Tumorumgebung nachgewiesen, was auch als *Tumorhoming* bezeichnet wird (105). In diesem Zusammenhang konnten MSCs der Tumormikroumgebung in Studien sowohl ein Einfluss auf die Tumorprogression als auch auf die Tumoringhibition zugeschrieben werden (237). Die Bestrahlung von Tumoren, welche bei der Behandlung vom HNSCC zur Standardtherapie zählt, verstärkt nachgewiesen die Einwanderung von MSCs in die TME (117). Vor dem Hintergrund, dass die Bestrahlung von HNSCCs eine der tragenden Therapiesäulen darstellt (4), gilt es den Einfluss von MSCs auf HNSCC-Zellen genauer aufzuklären. So lag der Fokus dieser Arbeit auf Tumorprogression vermittelnden Eigenschaften von MSCs auf HNSCC-Zellen. Insbesondere das Metastasierungspotential, welches sich durch die Befähigung von Tumorzellen zu Migration und Invasion äußert, wurde hier näher untersucht.

Aus der Arbeitsgruppe Bauer war bereits bekannt, dass es bei Co-Kultivierung von BMSCs und HNSCC-Zellen in 3D-Zellkultur zu einer erhöhten Gen- und Proteinexpression von osteogenen Differenzierungsmarkern kam. Adipogene und chondrogene Differenzierungsmarker zeigten hingegen keine Veränderung bei Co-Kultur von HNSCC-Zellen und BMSCs. Dies lässt auf eine osteogene Differenzierung von MSCs bei Co-Kultivierung mit HNSCC-Zellen schließen. Untersucht wurden im Speziellen die osteogenen Differenzierungsmarker Runx2 und ALP (alkalische Phosphatase). Neben ihrer Funktion in der osteogenen Differenzierung konnten sowohl Runx2 als auch ALP mit einer Tumorprogression in verschiedenen Tumorentitäten assoziiert werden (241,260). ALP und Runx2 sind ihrerseits weiterhin auch durch Beeinflussung der EMT, Invasion und Metastasierung von Tumoren an einer Progression beteiligt (240,261). Erhöhte Spiegel an ALP aus Patientenserum korrelieren mit fortgeschrittenen Tumorstadien des HNSCC sowie der Knocheninvasion (260). Aktuell wird ALP in verschiedenen Tumorentitäten als potenzieller Biomarker diskutiert (262). Eine Dysregulation von Runx2 konnte in HNSCCs mit Lymphknoten-Metastasen nachgewiesen werden und ging mit einer schlechten Prognose einher (263). Zudem konnte ALP als Zielgen von Runx2 identifiziert werden (264). Daneben reguliert Runx2 als Transkriptionsfaktor auch die Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9 (204). Diese gehen, wie in vielen anderen Tumoren, auch in HNSCCs mit einer schlechten Prognose einher und sind eine der am meist untersuchten Proteinase-Gruppe im Zusammenhang mit Invasion und Metastasierung (223). In Arbeiten von Wessely et. al. konnte in dem verwendeten 3D *in vitro* Tumormodell aus HNSCC und BMSCs sowohl eine erhöhte Genexpression als auch eine erhöhte Proteinexpression an MMP-9 festgestellt werden (239). Untersuchung des Einflusses der Co-Kultivierung zeigte eine MMP-9 abhängige Invasion von Mischsphäroiden.

Die bisherigen Experimente lassen jedoch keinen Schluss auf den Ursprung der erhöhten MMP-9 Expression in Co-Kultur zu. Das detektierte MMP-9 könnte von BMSCs als auch durch HNSCC-Zellen sezerniert worden sein. Um diese Frage zu beantworten, sollte in dieser Arbeit eine Untersuchung der MMP-9 Promotoraktivität in einem Dual-Luciferase® Reporter Assay erfolgen. Um die Regulation der MMP-9 Synthese weiter aufzuklären, wurde eine Runx2 bedingte Überexpression von MMP-9 untersucht. In Vorarbeiten war ein KD von Runx2 in BMSCs durchgeführt worden, bei dem sich zeigte, dass eine vermehrte Expression von Runx2 in BMSCs nicht der Ursprung der MMP-9 Überexpression in Mischsphäroiden war. Um den Einfluss von Runx2 mit Ursprung aus HNSCC-Zellen auf die MMP-9 Proteinexpression zu

untersuchen, wurde in dieser Arbeit ergänzend ein siRNA KD von Runx2 in HNSSC-Zellen durchgeführt.

Um den funktionellen Einfluss von BMSCs und HNSCC-Zellen im Rahmen einer Co-Kultivierung in 3D-Zellkultur auf die Migrationsfähigkeit auf laminin-reicher Matrix zu untersuchen, erfolgte die Durchführung eines *Spreadingassays* auf Matrigel®. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit der Einfluss der erhöhten ALP-Expression auf das Migrationsverhalten von Mischsphäroiden durch eine Inhibition von ALP untersucht.

Im Folgenden werden die angewandte Methodik und die Ergebnisse der durchgeführten Experimente vor dem Hintergrund aktueller Forschungserkenntnisse im Detail beleuchtet.

4.1 Zellkultivierung

4.1.1 Auswahl geeigneter Zellen zur Durchführung der Experimente

Die Durchführung der Experimente erfolgte mit Tumorzelllinien. Diese eignen sich durch ihre gute Charakterisierung insbesondere zur Grundlagenforschung, welche die Aufklärung von Mechanismen auf Zellebene umfasst (265). Zudem sind Zelllinien oftmals gut zugänglich und ermöglichen reproduzierbare Forschung in unterschiedlichen Laboren. Um die Beobachtungen in den durchgeführten Experimenten in ihrer Aussagekraft zu stärken, wurde mit drei HPV-negativen HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68 gearbeitet. Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um Zellen aus Primärtumoren unterschiedlicher Lokalisationen und Spender sowie TNM-Stadien. Eine Metastasierung lag bei keinem Spender vor.

Zur Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen kamen BMSCs zum Einsatz. Die verwendeten BMSCs stammten aus je zwei weiblichen und männlichen Spendern. Akquiriert wurden die Spender der BMSCs im Rahmen einer Endoprothesen-Implantation der Hüfte in Kooperation mit der orthopädischen Klinik Bad Abbach und der experimentellen Orthopädie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Susanne Grässel. Die MSCs wurden aus Knochenmark gewonnen. Bei MSCs handelt es sich um multipotente Stammzellen, die sich unter anderem osteogen, adipogen und chondrogen differenzieren können. Eine initiale Differenzierung wurde durch standardisierte Überprüfung hMSC-spezifischer Marker (CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD14⁻, CD45⁻) ausgeschlossen. Die Marker wurden in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der *International Society for Cell & Gene Therapy* (ISCT) zur Identifizierung menschlicher MSCs verwendet, wie in Grässel et al. beschrieben (266). MSCs als multipotente Stammzellen neigen zu Differenzierung. Aus diesem Grund gilt es hMSCs in Kultur durch optimale Kulturbedingungen keinem vermehrtem Selektionsdruck auszusetzen (267). Ebenso gilt es eine übermäßige lange Kulturzeit und zu viele Passagen zu vermeiden. Es wurde bis zu Passage 7 kultiviert (268).

4.1.2 Vorteile von 3D- gegenüber 2D-Zellkultur

2D-Zellkulturen werden seit den frühen 1900er Jahren zur Kultivierung von Zellen verwendet und spielen seither eine wichtige Rolle in der Forschung. Doch aufgrund fehlender Repräsentativität von Gewebestrukturen haben 2D-Modelle auch Limitationen. 3D-Zellkulturmethoden, bei denen ein Tumorzellverband ein Sphäroid formt, haben sich daher als durchaus nützliche Modelle zur Untersuchung verschiedener Krebsarten, darunter auch dem HNSCC, etabliert (265,269,270).

Bisher werden immer noch teilweise bis 70 % der Tumorforschung in 2D-Zellkultur durchgeführt, bevor *in vivo* Experimente im Tiermodell oder klinische Studien angewandt werden (271). 3D-Zellkultur bietet hier eine praktikable und kostengünstige, alternative Kultivierungsmethode, um realitätsnahe Bedingungen eines Tumorgewebes zu imitieren. 3D-Zellkulturmethoden erfreuen sich deshalb zunehmender Beliebtheit und entwickeln sich rasch zur führenden Methode in der Krebsforschung. Abbildung 43 zeigt auf einer Zeitachse die in der Datenbank *PubMed* gelistete stetig steigende Anzahl an Veröffentlichungen pro Jahr von 1979 bis 2021 unter Verwendung von 3D-Tumormodellen.

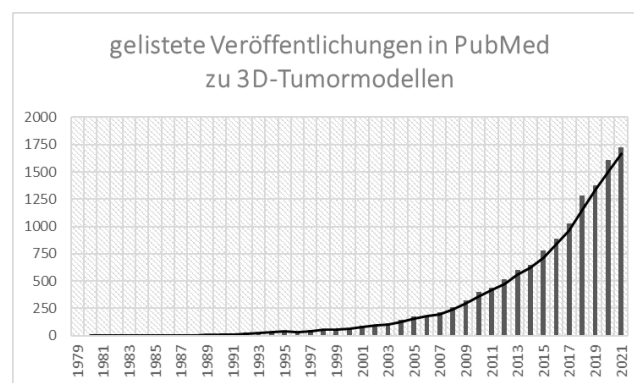


Abbildung 43: Anzahl an Veröffentlichungen zu 3D-Tumormodellen (272).

Die 3D-Zellkultur hat hier gegenüber der 2D-Zellkultur den Vorteil, Kultivierungsbedingungen zu schaffen, die *in vivo* Experimenten nahekommen (273). In 3D-Zellkultur wird Zellhypoxie im Zentrum des Zellverbandes simuliert, wie sie auch charakteristisch für Tumoren *in vivo* bei unkontrollierter Proliferation ist. Auch die Nährstoffversorgung des 3D-Zellverbandes entspricht der *in vivo*. Dort bildet sich durch Hypoxie und Nährstoffunterversorgung ein nekrotisches Zentrum. Je größer die Gesamtzellzahl bei der Aussaat des Sphäroids und je länger

die Dauer der Sphäroidinkubation ist, desto stärker sind die genannten Effekte und somit der Selektionsdruck auf die Zellen. Abbildung 44 veranschaulicht schematisch die Untergliederung eines Sphäroids in die äußere Proliferationszone, die mittlere Inaktivitätszone und die innere nekrotische Zone. Diese Zonen bilden sich entlang eines Gradienten aus zunehmender Kohlenstoffdioxidkonzentration, Azidität und metabolischen Abfallprodukten sowie der gleichzeitigen Abnahme von Nährstoffen, Sauerstoff und Energie in Form von ATP aus. Bei 3D-Kultivierung werden die Zellen nicht nur durch Zell-Zell-Kontakt, sondern auch durch den Kontakt zu EZM stimuliert. 3D-Zellkultur kann die im Körper vorhandenen EZM um die Zellen imitieren. Bei der EZM handelt es sich um eine Mikroumgebung, die durch Proteine, Wachstumsfaktoren, Nährstoffe und andere Zellen nicht nur den Phänotypen und deren Verhalten beeinflussen, sondern auch Proteinfunktionen und DNA-Strukturen funktionell verändern kann (274).

3D-Tumorsphäroid

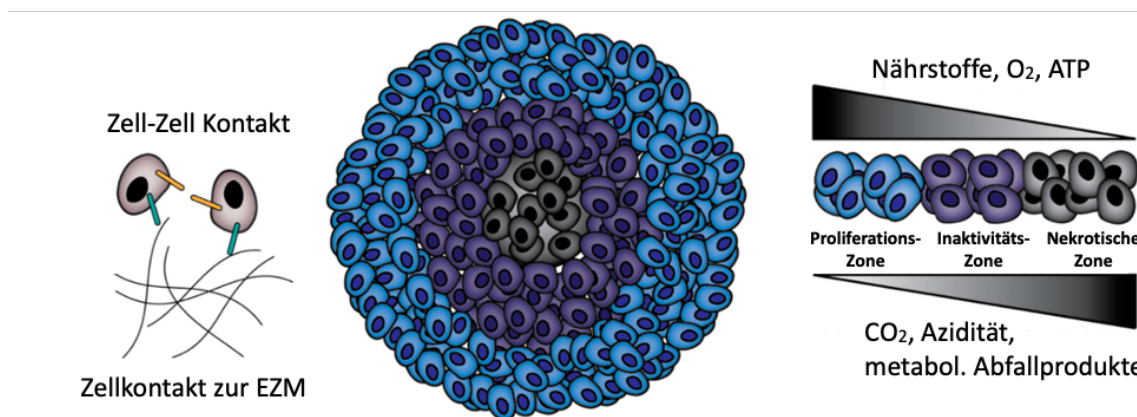


Abbildung 44: Erzeugte Effekte bei der 3D-Tumorsphäroid Generierung. Unterversorgung und Anhäufung metabolischer Stoffwechselprodukte führt zur Bildung einer proliferativen, einer inaktiven und einer nekrotischen Zone innerhalb des Sphäroids, die hier farblich gekennzeichnet sind. Modifiziert nach Kamatar et al. (275).

Durch die praktische Anwendung von 3D-Tumorsphäroiden auf Scaffolds und Matrices sowie die Fortschritte in Bildgebung und Analysesystemen werden Zellen für Experimente zunehmend dreidimensional gezüchtet. 3D-Tumorsphäroide können problemlos auf unterschiedlichen Beschichtungen platziert werden, um so die Zellen gezielt mit Bestandteilen der EZM wie Laminin, Kollagenen oder Fibronectin zu stimulieren. In dieser Arbeit wurden

Sphäroide auf Matrigel[®] platziert, einem biologisch aktivem Matrixmaterial, das der zellulären Basalmatrix von Säugetieren ähnelt. Von dort aus konnten sich die Zellen, je nach Migrationspotential, konzentrisch ausbreiten.

Außerdem ermöglicht eine genauere Nachahmung der Mikroumgebung des Tumors durch 3D-Zellkulturen es den Zellen, ihre Genexpression und ihr Verhalten ähnlich wie Zellen *in vivo* zu verändern und somit eine natürlichere Reaktion auf Medikamente hervorzurufen (276,277). In dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit bestimmter Medikamente zwar nicht untersucht, dennoch könnte die Wirksamkeit bestimmter Inhibitoren MMP-9 initiiertender Signalwege für zukünftige Experimente von Relevanz sein.

4.1.3 Auswahl der unterschiedlichen Gesamtzellzahlen für Sphäroide

Neben einer Vielzahl anderer Möglichkeiten Sphäroide zu generieren (278), erweist sich die in dieser Arbeit angewandte *Hanging Drop*-Methode als günstige, praktikable Methode, die ebenfalls zur Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen geeignet ist. Lediglich ein Mediumwechsel gestaltet sich als schwierig und es gibt Einschränkungen bei der gewählten Gesamtzellzahl eines Sphäroids (269).

Die Größe der Sphäroide wurde so gewählt, dass eine initiale Nährstoffversorgung im Kern der Sphäroide bei Formung gegeben war. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass eine maximale Sphäroidgröße von 30.000 Zellen je Sphäroid möglich war, ohne große nekrotische Areale im Sphäroidkern in Kauf nehmen zu müssen (279). Weitere Experimente hatten eine Zellzahl von 25.000 Zellen als optimal ergeben, da teilweise auch bei der in der Literatur beschriebenen Sphäroidgröße von 30.000 Zellen eine vermehrte Nekrose auftrat (280). Der Einsatz von Sphäroiden von mehr als 30.000 Zellen müsste eine Erhöhung des Mediumvolumens nach sich ziehen, um eine ausgedehnte Nekrose zu umgehen. Dies ist bei der verwendeten *Hanging Drop*-Methode aufgrund der Schwerkraft und Oberflächenspannung erschwert möglich. Alternativ könnte beispielsweise die Aussaat von Sphäroiden in speziellen 96-Well Platten mit Rundboden und einer Anti-Haft-Beschichtung durchgeführt werden (engl.: *ultralow cell attachment*, ULA) (281). Jedoch zeigten Vordaten mit den verwendeten HNSCC-Zellen, dass diese Methode sich als ungeeignet erwies, da ein erheblicher Teil trotzdem anhafteten. Hierbei wäre bei zunehmender Sphäroidgröße von Tumorsphäroiden auch mit einer

Zunahme des nekrotischen Kerns zu rechnen (282). Toxische Stoffwechselprodukte durch tote Zellen könnten die Zellumgebung aus dem angestrebten Gleichgewicht bringen. Bei zu großer Gesamtzellzahl überwiegen toten Zellen im Sphäroid, die zu einer Lockerung und Auflösung des Zellverbandes führen. Im Gegensatz zu HNSCC-Sphäroiden entgegenseitigen Sphäroide aus MSCs dem durch eine Lockerung des Zellverbandes und scheinen keinen nekrotischen Kern auszubilden (283). Gearbeitet wurde jedoch mit Sphäroiden aus mehrheitlich Tumorzellen.

Aus der Arbeitsgruppe war bekannt, dass die minimale Zellzahl, die zu einer Sphäroid Formierung verwendet werden kann, 4.000 Zellen beträgt. Zudem wäre ein Medienwechsel bei Sphäroiden, die kleiner als 4.000 Zellen sind technisch nicht möglich gewesen. Ein Sphäroid von 4.000 Zellen misst in etwa 200 μm im Durchmesser. Das menschliche Auge kann Objekte bis zu einer Größe von 20 μm sehen. Bedenkt man den Arbeitsabstand und die optischen Reflexionen bei Arbeiten unter der Sterilbank, handelt es sich hierbei um ein gerade noch mit dem bloßen Auge detektierbares Objekt. Zudem war festzustellen, dass eine zu geringe Anzahl an Zellen zu einem Ausbleiben einer Sphäroidformierung führt (284). Lediglich einzelne Zellaggregate schwimmen dann im Medium. Die Durchführung reproduzierbarer Experimente ist damit nicht möglich.

Es gilt eine unkontrollierbare Beeinflussung des Experimentaufbaus zu vermeiden, um Reproduzierbarkeit zu schaffen (285). So wurden eine minimale und maximale Sphäroidgröße definiert, innerhalb derer die Experimente durchgeführt wurden. Um nun den Einfluss von BMSCs auf HNSCC-Zellen zu untersuchen, wurde als Startpunkt eine Zellzahl von 4.000 BMSCs gewählt und die Zellzahl in Schritten von 5.000 Zellen erhöht.

4.1.4 Gewählte Verhältnisse aus BMSCs und HNSCC-Zellen

Atiya et al. gehen in ihrem Review auf die unterschiedlichen Einflüsse von MSCs auf Tumorzellen ein (74). Sie bestätigen, dass es zwar Beispiele für die suppressive Wirkung von MSCs auf Tumoren gibt, die meisten Belege allerdings darauf hindeuten, dass MSCs auf Tumoren eine eher tumorfördernde Wirkung haben. Dennoch können Forschungsergebnisse zur tumorsuppressiven Wirkung von MSCs auf Tumoren nicht einfach ignoriert werden. Atiya et al. postulieren, dass die Wirkung von MSCs auf Tumoren vielmehr kontextabhängig betrachtet werden muss, wobei das Verhältnis von Tumorzellen und MSCs ein entscheidender

Faktor ist. Eine tumorsuppressive Wirkung wird bei höheren Verhältnissen von MSCs zu Tumorzellen (~2:1 und mehr) beobachtet. Dies wurde auch im Tumormodell gezeigt, wenn die MSC-Population im Tumorgewebe überwiegt (171,286,287). Diese Beobachtung stützt die Entwicklung und den Einsatz von *ex-vivo*-MSCs für therapeutische Zwecke, lässt aber die physiologische Relevanz vermissen, die für das natürliche Tumormilieu repräsentativ ist.

In dieser Arbeit wurden nicht nur Sphäroide unterschiedlicher Gesamtzellzahl untersucht, sondern auch verschiedene Verhältnisse aus HNSCC-Zellen und BMSCs. Ziel war es, auf diese Weise ein größeres Spektrum natürlicher Verhältnisse abzudecken.

4.1.5 Co-Kultivierung und konditioniertes Medium

In dieser Arbeit wurde für die Zusammenführung von HNSCC-Zellen mit BMSCs die Co-Kultivierung im 3D-Modell nach *Hanging Drop*-Methode gewählt, die den direkten Kontakt der beiden Zelltypen zulässt. Alternativ zur Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen mit BMSCs im 3D-Modell, bei der der direkte Kontakt der Zellen zueinander besteht, wurde in Vorarbeiten ebenfalls die Auswirkung der Kultivierung von Zellen in konditioniertem Medium getestet.

Bei der Kultivierung in konditioniertem Medium kann ein Zelltyp mit den löslichen Substanzen, die vom anderen Zelltyp sezerniert wurden, stimuliert werden. Hier wurden entweder HNSCC-Zellen mit dem Medium stimuliert, in dem zuvor BMSCs kultiviert wurden, oder umgekehrt. Um einige der möglichen löslichen Faktoren aufzuzählen, wird hier Forschungsarbeit genannt, die in der Co-Kultur von HNSCC-Zellen und MSCs eine Erhöhung von IL-6 festgestellt hat (288). Es konnte gezeigt werden, dass IL-6 die Expression von MMP-9 und MMP-2 hochreguliert und so Migration und Invasion fördert (289–291). Neben ihrer Rolle in der enzymatisch vermittelten Migration und Invasion, sind sie an der Aktivierung verschiedener Liganden wie TGF- β , Chemokinen und der Spaltung von Oberflächenrezeptoren beteiligt (292). Auch die Rolle von Exosomen rückt nun immer mehr in den Fokus der Forschung (173). Im Magenkarzinom konnte bereits gezeigt werden, dass MSC-Exosomen die Expression des Stammmarkers CD133 in Tumorzellen induzieren und so Chemoresistenz fördern (293).

Ein Nachteil bei der Durchführung von Experimenten mit konditioniertem Medium ist, dass bestimmte sezernierte Substanzen, wie beispielsweise Zytokine und Chemokine, unter

Umständen schon innerhalb weniger Stunden degradiert werden (294). Der Stimulus kann sich daher unter Umständen während der Durchführung des Experiments verändern. Zudem sezernieren BMSCs in Monokultur, ohne selbst einen externen Stimulus durch andere Zellen zu erfahren, andere Substanzen als bei direktem Kontakt zu HNSCC-Zellen.

Um das Milieu von HNSCC-Zellen und MSCs zu vereinen, ohne einen direkten Kontakt herzustellen, können die Zellen in separierten Kompartimenten kultiviert werden, die mit einer für das Medium permeablen Membran verbunden ist (295). Hier können ohne direkten Zellkontakt lösliche Substanzen beider Zelltypen ausgetauscht werden. Vorarbeiten haben allerdings gezeigt, dass die löslichen Substanzen, die von BMSCs sezerniert wurden, keinen Einfluss auf die Expression von ALP von HNSCC-Zellen und BMSCs haben (296). Folglich ist die Aufklärung der hier gestellten Fragestellungen, wie unter anderem die Änderung der ALP-Expression, der direkte Zellkontakt zwischen HNSCC-Zellen und BMSCs nötig.

Daher wurde in dieser Arbeit nicht mit konditioniertem Medium gearbeitet, sondern HNSCC-Zellen mit BMSCs ausschließlich in Co-Kultur mit direktem Kontakt vereint. Der Nachteil direkter Co-Kultivierung ist es, die Zellen im Anschluss für weitere Analysen wieder voneinander zu trennen, um unterscheiden zu können welcher der beiden Zelltypen Veränderungen in Gen- und Proteinexpression zeigt.

4.2 Zellulärer Ursprung der erhöhten MMP-9 Expression in Mischsphäroiden

Ziel dieser Arbeit war es, die Tumorprogression-vermittelnden Eigenschaften von BMSCs auf HNSCC-Zellen weiter zu beleuchten. Tumorprogression zeichnet sich durch eine Reihe zufällig auftretender Mutationen aus, die durch ein Zusammenspiel von wiedergewonnenen embryonalen Eigenschaften, der Aktivierung von Onkogenen und dem Verlust von Tumorsuppressorgenen gekennzeichnet ist. Dabei wird die Metastasierung als ein Teil der Progression maßgeblich durch die Tumorfähigkeit zur Invasion und Migration bestimmt.

Der entscheidende Schritt bei der Progression eines Tumors von lokal begrenzt (Cis) zu invasiv mit potenzieller Metastasierung stellt das Durchbrechen der Basalmembran dar (297). Die Basalmembran fungiert als physikalische Barriere in epithelialen Tumoren wie dem HNSCC, um eine Invasion in umliegendes Gewebe zu verhindern und die potenzielle Metastasierung zu limitieren (298). Darüber hinaus steuert die Basalmembran über parakrine Signale die Differenzierung und Migration von Zellen (26). Essenzielle Bestandteile der Basalmembran sind Laminin und Kollagen IV. Um die Basalmembran zu durchbrechen, müssen Tumorzellen ihre Zell-Zell-Adhäsion, die sie umgebende EZM und ihre Motilität verändern (26).

Der Durchbruch der Basalmembran und eine Tumorerinvasion ist in Tumoren mit einer schlechten Prognose assoziiert, so auch bei Mammakarzinom, kolorektalem Karzinom, Prostatakarzinom und auch dem HNSCC (292). Matrixmetalloproteasen wird hierin eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Besonders MMP-9 mit seiner Fähigkeit Kollagen IV abzubauen wird dabei mit einer erhöhten Invasivität (226) des HNSCCs und der Korrelation mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium (299) in Verbindung gebracht.

Als Grundlage für die folgenden Experimente dienten Arbeiten aus Wessely et. al., in denen eine erheblich erhöhte MMP-9 Genexpression in Mischsphäroiden gemessen wurde (239). Dies hatte auch Auswirkungen auf die Invasion von Mischsphäroiden. In einem durchgeführten Invasionsassay zeigten Mischsphäroide nach Inhibition von MMP-9 eine verminderte Invasionskapazität. Jedoch konnte noch nicht geklärt werden, ob die vermehrte Produktion von MMP-9 durch BMSCs oder HNSCC-Zellen erwirkt wurde.

4.2.1 Ermittlung der MMP-9 Promotoraktivität mittels Dual-Luciferase[®] Reporter Assay

Um die generelle Fähigkeit der Tumorzellen zur Produktion von Matrixmetalloproteasen zu evaluieren, sollte die MMP-9 Expression in HNSCC-Zellen auf Gen- und Proteinexpressions-ebene nachgewiesen werden.

Initial wurde zur Ermittlung der MMP-9 Promotoraktivität ein Luciferaseassay durchgeführt. Dieser dient der Untersuchung einer spezifischen Promotorregion mittels Biolumineszenz. Dabei wird das Luciferase-Gen mit der zu untersuchenden Promotorsequenz verknüpft, um so die Aktivierung desselben mittels eines Luminometers messen zu können (300). Der Vorteil dieses Experiments ist, dass die Promotoraktivität gezielt von einer aus zwei Zelltypen in Co-Kultur bestimmt werden kann, da die jeweiligen Zellen vor der Co-Kultivierung mit dem Luciferase-Plasmid transfiziert werden.

4.2.1.1 Etablierung des Luciferaseassays in 3D-Zellkultur

Die Analyse der Promotoraktivität von Zellen in 3D-Zellkultur gestaltete sich zu Beginn schwierig und setzte einige Etablierungsarbeit voraus. Um die Promotoraktivität in Zellen messen zu können, müssen diese ausreichend lysiert werden. Die Renilla-Luciferase dient im Luciferase Assay zur Bestimmung der Promotoraktivität als Transfektionskontrolle zur Normalisierung des spezifischen Firefly-Luciferase-Signals. Die eingesetzte Zellzahl transfizierter Zellen korreliert bei optimaler Lyse linear mit dem Renilla-Luciferase-Signal. Vor allem zur Messung schwer lysierbarer Sphäroide waren zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente kaum methodische Anleitungen in der Literatur vorhanden. Wenn es darum geht, aussagekräftige und reproduzierbare Daten zu generieren, sind Forscher im Moment noch auf sich allein gestellt, denn bisher gibt es keine allgemein akzeptierten Protokolle zur Durchführung und Analyse von 3D-Tumormodellen (301).

Nach herkömmlicher enzymatischer Lyse mit Lysepuffer (passiver Lyse) zeigten 3D-kultivierte Zellen im Vergleich zu adhärent kultivierten Zellen nur ein sehr schwach detektierbares Signal der Renilla-Luciferase. Für diese Beobachtung könnte es zwei Gründe geben: Zum einen könnten die Zellen in 3D-Zellkultur im Vergleich zu Zellen in 2D-Zellkultur schlechter transfiziert worden sein. Zum anderen könnte die Transfektion zwar in allen Zellen

gleich erfolgreich verlaufen sein, doch die Zugänglichkeit der Luciferase während der Messung könnte sich zwischen der Kultivierung im *Hanging Drop* und adhärenen Zellen unterscheiden haben.

Die Transfektion selbst konnte als Grund für das geringere Signal in 3D-kultivierten Zellen ausgeschlossen werden. Unabhängig davon, ob Zellen im Hauptexperiment adhären in 2D oder als Sphäroide kultiviert wurden, erfolgte die Transfektion mit dem Renilla- bzw. Firefly-Luciferase-Plasmid mit adhärenen Zellen, bevor diese für das Hauptexperiment in entsprechender Zellzahl in neue Kulturschalen verteilt wurden. Die vorhandene Menge an transfiziertem Plasmid war mit dem standardisierten Transfektionsprotokoll daher in allen Zellen gleich und unabhängig davon, ob die Zellen im Anschluss in 2D oder 3D kultiviert wurden. Transfektionskontrollen dienten als Beweis für eine erfolgreiche Transfektion.

Die geringere Detektierbarkeit der Renilla-Luciferase lag somit primär an ihrer erschwerten Zugänglichkeit in 3D-kultivierten Zellen. Eine einzellige Schicht adhärenen Zellen auf dem Boden einer Zellkulturschale ist für den eingesetzten Lysepuffer gut zugänglich. Zellen in 2D-Zellkultur können somit problemlos und homogen lysiert werden. Die Lyse von Sphäroiden gestaltet sich hingegen schwieriger. Im Vergleich zu adhären 2D-kultivierten Zellen zeichnen sich Zellen, die in 3D-Zellkultur generiert wurden, durch einen stärkeren Zell-Zell-Kontakt aus. Dieser Effekt ist unter anderem abhängig von der Sphäroidgröße, der verwendeten Zelllinie und deren Differenzierungsgrad bzw. deren molekularer Ausstattung. Zelllinien, die sich beispielsweise durch eine erhöhte Expression von glykosylierten membranständigen Zelladhäsionsproteinen, wie E-Cadherin, auszeichnen, sind am äußeren Rand des Sphäroids für den Lysepuffer leicht zugänglich, während der Sphäroidkern unter Umständen unberührt bleibt (302). Unsere Beobachtung, dass Sphäroide in Co-Kultur mit BMSCs schwerer zu lysieren sind als HNSCC-Sphäroide in Monokultur, lässt vermuten, dass der Zell-Zell-Kontakt und damit auch die Expression von E-Cadherin von HNSCC-Zellen zunimmt.

Um die Lyse von Sphäroiden zu optimieren, kann diese mechanisch unterstützt werden. In dieser Arbeit wurde die zusätzliche Anwendung von Schockfrieren mit flüssigem Stickstoff und Ultraschall getestet. Zweimaliges Schockfrieren erhöhte im Gegensatz zur Behandlung mit Ultraschall die detektierbare Signalstärke der Renilla-Luciferase. Die Behandlung mit flüssigem Stickstoff wurde daher für die Lyse von Sphäroiden standardmäßig in das Protokoll übernommen. Die mechanische Unterstützung der Lyse durch Stickstoff zusätzlich zur passiven Lyse wurde hier als *aktive Lyse* bezeichnet.

Als Versuchskontrollen zur Bestätigung der erfolgreichen Lyse von Sphäroiden diente in Abbildung 24 der Vergleich der Signalstärke der Renilla-Luciferase in transfizierten Zellen mit der durch Autolumineszenz verursachten RLU nicht transfizierter Zellen. Da die mit Renilla-Luciferase transfizierten Zellen eine um ein Vielfaches stärkere RLU ergab, wurde hier der erste Beweis erbracht, dass in den Sphäroiden eine Lyse stattfand. Da in der untersuchten Zelllinie das Firefly-Luciferase-Signal stärker als das Renilla-Signal war, konnte auch die vorhandene MMP-9 Promotoraktivität erfolgreich detektiert werden. Auch nach Normalisierung des Firefly-Signals auf das Renilla-Signal war eine relative Promotoraktivität in transfizierten Zellen nachweisbar.

In Abbildung 25 wird die relative Lyseeffizienz von Zellen in 2D- und 3D-Zellkultur verglichen. Streng genommen ist kein direkter Vergleich zwischen 2D- und 3D-Zellkultur möglich. Das detektierbare Signal ist abhängig von der eingesetzten Zellzahl. Für die Sphäroide wurden 7.000, 13.000, 17.000, 23.000 und 27.000 Zellen ausgesiedelt. Die exakte Zellzahl der einzelnen Sphäroide zum Zeitpunkt der Messung war allerdings nicht bekannt. Hier wäre eine Zellzählung nötig gewesen, die allerdings praktisch nicht umsetzbar war, da für die Zellzählung Zellen vereinzelt hätten werden müssen. Einmal als Sphäroid kultivierte Zellen lassen sich nicht mehr vereinzeln, ohne die Zellintegrität zu gefährden. Zellen hingegen, die für das Etablierungs-Experiment in 2D ausgesiedelt wurden, wurden in 6-Well-Platten kultiviert. Es wurden fünf unterschiedliche Zellzahlen ausgesät, die fünf verschiedenen Konfluenzen entsprachen. Gezählt wurden die Zellen vor der Messung nicht. Um einen Vergleich zwischen 2D und 3D im selben Diagramm möglich zu machen, wurden die Rohwerte der einzelnen Gruppen jeweils auf die niedrigste ausgesäte Zellzahl normalisiert. So konnte die Steigung $[f(x)=mx+t]$ der beiden Kurven verglichen werden. Bei einer Zellkultivierung in 2D war diese nahezu linear. Bei Kultivierung in 3D war diese flacher. Die Signalstärke in 3D ist bei alleiniger Anwendung der passiven Lyse daher nachweislich geringer als das detektierbare Signal in 2D. Grund hierfür kann der zunehmende Anteil nekrotischer Zellen oder eine unzureichende Lyse sein. Vermutlich beeinflussen beide Faktoren die Signalstärke. Der Versuch, eine Optimierung der Lyse zu erreichen, zeigt in Abbildung 26 eine Zunahme der relativen Lyseeffizienz nach zusätzlicher Anwendung von zweimaligem Schockfrieren. Die Anwendung von Ultraschall, dargestellt in Abbildung 27, führte zu keiner weiteren Steigerung der relativen Lyseeffizienz der aktiven Lyse und wurde daher nicht ins Protokoll übernommen.

4.2.1.2 MMP-9 Promotoraktivität in HNSCC-Zellen aus Tumor- und Mischsphäroiden

In diesem Assay konnte eine Promotoraktivität von MMP-9 in allen untersuchten HNSCC-Zelllinien, PCI 1, PCI 13 und PCI 68, nachgewiesen werden. Ob jedoch nachfolgend tatsächlich ein funktionelles MMP-9 Protein exprimiert wurde, kann mit dem Nachweis einer Promotoraktivität nicht vorhergesagt werden. Denn bereits während und nach der Transkription kann mRNA noch vor der Proteintranslation degradiert werden. Auch translatierte Proteine müssen nicht zwangsläufig ihre Funktion ausüben (303). Auch sie können degradiert werden oder in einem inaktiven Zustand verweilen. Nichtsdestotrotz lieferte der Dual-Luciferase[®] Reporter Assay hier einen ersten Hinweis auf eine mögliche Proteinsynthese von MMP-9 in PCI 1, PCI 13 und PCI 68.

Ziel war es, mit dem Dual-Luciferase[®] Reporter Assay differenzieren zu können, ob die festgestellte erhöhte Gen- und Proteinexpression von MMP-9 in Mischsphäroiden einem der beiden Zelltypen zuzuschreiben sei. In der bisher angewandten Methodik (qPCR, Zymographie) konnte dazu keine Aussage getroffen werden. Eine Separierung der Zellen nach Zelltyp aus Sphäroiden wäre technisch zu aufwendig gewesen und wurde deshalb nicht in Betracht gezogen. Zudem kann die Etablierung des Dual-Luciferase[®] Reporter Assays in 3D-Kultur für nachfolgende Untersuchungen der Regulation von MMP-9 eingesetzt werden.

Das Experiment wurde sowohl in 2D-Kultur als auch 3D-Kultur durchgeführt. Ein direkter Vergleich von der Signalstärke aus 2D- und 3D-Kultur war jedoch nicht möglich, da aus technischen Gründen nicht die gleiche Zahl an Zellen zur Messung verwendet wurde.

In 2D-Zellkultur korrelierte die gemessene Promotoraktivität in Monokultur negativ mit der ausgesäten Zellzahl. In 3D-Kultur stand eine höhere Promotoraktivität im direkten Zusammenhang mit der Sphäroidgröße. Dass die Untersuchung derselben Fragestellung in zwei unterschiedlichen Modellen (2D vs. 3D) ein gegensätzliches Ergebnis zeigt, weist auf die Wichtigkeit der Modellwahl passend zur jeweiligen Fragestellung hin (304,305). Bei der Untersuchung von grundsätzlichen Tumormechanismen gilt es das Modell einerseits so einfach wie möglich zu halten aber andererseits möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen. Aus der falschen Modellwahl könnten sonst voreilige Schlüsse gezogen werden. Die 3D-Zellkultur ist hier in seiner Aussagekraft vermutlich verlässlicher, da in 2D-Kultur als einzellige

Schicht eine artifizielle Zellumgebung geschaffen wird. 3D-Zellkultur bildet eine physiologische EZM, Zell-Zell-Kontakte, Nähr- und Sauerstoffversorgung nach (276,306,307).

Sowohl in 2D- als auch 3D-Zellkultur zeigten HNSCC-Zellen in Mischkultur eine signifikant niedrigere Promotoraktivität als in Monokultur. Dabei war die Promotoraktivität in 3D-Kultur stärker reduziert als in 2D-Kultur. Die Promotoraktivität wurde zudem bei unterschiedlichen Verhältnissen von HNSCC-Zellen zu BMSCs gemessen. Die Anzahl der BMSCs blieb immer identisch, während die Anzahl der HNSCC-Zellen variiert wurde. In 2D-Zellkultur zeigte sich die Promotoraktivität in Mischkultur besonders bei einem hohen Anteil an BMSCs stark erniedrigt. Dieser Effekt eliminierte sich bei hoher Anzahl an HNSCC-Zellen. In 3D-Kultur dagegen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Promotoraktivität in allen BMSC: HNSCC-Verhältnissen. Tendenziell war aber auch hier die Promotoraktivität bei hohem Anteil an BMSCs geringer. Dies könnte auf einen suppressiven Effekt von BMSCs auf die MMP-9 Promotoraktivität in HNSCC-Zellen hindeuten. Gu et. al. dagegen konnten nach Co-Kultur von NSCLC-Zellen und MSCs eine Induktion von MMP-9 mRNA Expression, MMP-9 Proteinexpression und -aktivität in NSCLC-Zellen feststellen (308).

Ein alternatives experimentelles Setup wäre ein gleichbleibendes Verhältnis an BMSCs zu HNSCC-Zellen bei steigender Zellzahldichte, um den Einfluss der Zelldichte und Sphäroidgröße in Mischsphäroiden näher zu untersuchen.

Die Genexpression von MMP-9 ist in den meisten Geweben physiologisch niedrig. In einer Vielzahl an Tumoren konnte jedoch gezeigt werden, dass es zu einer erhöhten Expression von MMP-9 kommt. Dies geht mit einem invasiven Phänotyp und einer schlechten Prognose einher (309–311). So auch in HNSCCs und OSCCs (312,313). Dabei muss die Sekretion von MMP-9 nicht zwangsläufig durch die Tumorzellen selbst erfolgen. Auch durch Zellen der Tumormikroumgebung konnte eine vermehrte MMP-9 Expression nachgewiesen werden. So weisen insbesondere TAFs und Fibroblasten hohe MMP-9 Level auf (314). Auch in Melanomen konnte gezeigt werden, dass umgebende Keratinozyten der Ursprung der vermehrten MMP-9 Sekretion waren (315). Dies lässt vermuten, dass auch in unserem Tumormodell die erhöhte Aktivität an MMP-9 durch BMSCs generiert wurde.

4.2.1.3 Regulation von MMP-9 in Mischsphäroiden durch Runx2 (Runx2 KD in HNSCC-Zellen)

Aus Vorarbeiten war eine erhöhte Gen- und Proteinexpression von Runx2 in Mischsphäroiden bekannt. Bei Runx2 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl an Genen reguliert. Viele davon sind essenziell an Knochenformation (316) und der Differenzierung von Osteoblasten (317) und Chondrozyten (318) beteiligt. Runx2 spielt eine wichtige Rolle als osteogener Differenzierungsmarker von hMSCs (318,319). Daneben ist Runx2 mit Tumorprogression in Pankreaskarzinomen (320), Osteosarkomen (321), Ovarial-Karzinomen (322,323) und HNSCCs (241) assoziiert und wird als Tumorbiomarker diskutiert (242,324). Runx2 fördert die Metastasierung durch Induktion von EMT (324), Proliferation und Migration (261). In HNSCCs konnte eine Überexpression von Runx2 mit der vermehrten Expression von Parathyroidhormon-ähnlichem Hormon und einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden (325). Zudem konnte eine Dysregulation von Runx2 die Lymphknoten Metastasierung in HNSCCs vorantreiben (263).

Runx2 könnte die Toleranz von MSCs für hypoxische Bedingungen erhöhen und deren Rolle im Tumormilieu stärken (326). Sowohl MMP-9, MMP-2, als auch der ebenfalls untersuchte osteogene Differenzierungsmarker ALP werden durch den osteogenen Transkriptionsfaktor Runx2 reguliert (204,264,318).

Um einen regulatorischen Einfluss der erhöhten Expression von Runx2 insbesondere auf die vermehrte Proteinexpression von MMP-9 in Mischsphäroiden zu untersuchen, war bereits ein KD von Runx2 in BMSCs in Mono- und Co-Kultur und eine anschließende Analyse in der Zymographie erfolgt (296). Hierbei zeigte sich keine Änderung der MMP-9 Proteinexpression in Mischsphäroiden. Es ist davon auszugehen, dass eine Hochregulierung von Runx2 in BMSCs die MMP-9 Produktion nicht beeinflusst. Der Einfluss durch HNSCC-Zellen exprimierten Runx2 auf die Expression von MMP-9 war noch nicht untersucht worden. Hierzu wurde ebenfalls ein transientser KD mittels Runx2 siRNA in HNSCC-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich eine tendenzielle Reduktion der MMP-9 Aktivität (insbesondere der pro-MMP-9 Aktivität) in Mischsphäroiden. Diese war jedoch nicht signifikant. Dies lässt auf eine Runx2-unabhängige Regulation der MMP-9 Produktion in Mischsphäroiden aus HNSCC-Zellen und BMSCs schließen. Neben Runx2 kann eine Induktion der MMP-9 Genexpression auch durch inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IL-1 und TNF- α erfolgen.

Die proximale Promotorregion von MMP-9 umfasst ein TATA-ähnliches Motiv, zwei AP-1 Motive, ein NF- κ B Element, eine *polyomavirus enhancer activator 3* (PEA3) Stelle, eine CG

Box, ein TGF- β inhibierendes Element und eine *microsatellite d* (CA) Sequenz. Wobei die AP-1 und NF- κ B Bindestellen essenziell für die MMP-9 Expression sind (246).

Es konnte gezeigt werden, dass der AP-1 Komplex durch MAPK, ERK 1/2 und JNK Signalwege aktiviert wird. Für eine maximale Expression ist neben AP-1 jedoch NF- κ B notwendig. Um den regulatorischen Einfluss von HNSCC-Zellen und BMSCs weiter zu untersuchen, könnte der hier etablierte Dual-Luciferase[®] Reporter Assay in 3D-Kultur herangezogen werden.

Eine Unterdrückung der Genexpression von MMP-9 kann durch Expression von Kisspeptin (Kiss-1) erfolgen, das eine reduzierte Bindung von NF- κ B an den MMP-9 Promotor bewirkt (327). Auch das RECK-Protein kann eine MMP-9 Expression unterdrücken (328).

Daneben kann eine Regulation der MMP-9 Genexpression über Histon-Acetylierung, Histon-Methylierung, DNA-Methylierung und nicht kodierende RNAs (engl.: *non coding* RNAs, ncRNAs), wie beispielsweise zirkuläre (circ)RNA in OSCC, erfolgen (329). Diese Mechanismen könnten auch hier zu einer Unterdrückung der MMP-9 Promotoraktivität in HNSCC-Zellen geführt haben.

4.2.1.4 pcDNA Transfektion von BMSCs

Um die Promotoraktivität in HNSCC-Zellen mit der in BMSCs vergleichen zu können, sollte ebenfalls die Transfektion von BMSCs mit dem das MMP-9 Promotorgen und das Firefly-Luciferase-Gen enthaltenden Plasmid erfolgen. Erste Untersuchungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Nanocin-Transfektionsreagenz in BMSCs in 2D-Kultur zeigten eine gegenüber der Kontrolle (nicht transfizierte Zellen) höhere Firefly-Luciferase-Aktivität. Es wurde die gleiche Menge Plasmid wie in HNSCC-Zellen eingesetzt. Die gemessenen RLU der Renilla-Luciferase zeigte sich jedoch nicht signifikant höher im Vergleich zu unbehandelten BMSCs (Abbildung 48).

Auch eine Erhöhung der Lysezeit von 20 min auf 40 min ergab keine verbesserten RLU der Renilla-Luciferase (Abbildung 49). Auch die Zuhilfenahme von aktiver Lyse erhöhte die gemessenen RLUs nicht (Abbildung 50). Hierbei zeigten sich Firefly-Luciferase-Werte, die ebenfalls kaum über denen von unbehandelten Zellen lagen.

Es ist davon auszugehen, dass in BMSCs mit dem verwendeten Transfektionsreagenz keine ausreichende Transfektionseffizienz erreicht werden konnte. Darauf deuten insbesondere die stark schwankenden Firefly-Luciferase-Werte in Kombination mit Renilla-Luciferase-Werten, die sich nicht von denen aus unbehandelten Zellen unterschieden.

Wie auch andere Primärzellen sind hMSCs bekannt dafür schwer transfizierbar zu sein (330). Während im Laufe der Zeit verschiedenste Methoden für die Transfektion von MSCs herangezogen wurden, zeigten sich bei allen entweder Probleme bezüglich der Effizienz oder der Toxizität (331). Sodass bisher keine ideale Transfektionsmethode gefunden wurde. Die bis heute am häufigsten angewandte Methode der Transfektion von Nukleinsäuren in hMSCs stellt die Transfektion mittels viralen Vektors dar. So kann die virale Transfektion zwar eine hohe Effizienz vorweisen, wird aber durch ihr potenziell karzinogenes Risiko und Schwierigkeiten in der Vektorherstellung limitiert (332). Zudem stehen nicht-virale Transfektionsmethoden zur Verfügung.

Bei dem verwendeten Transfektionsreagenz handelt es sich um eine transiente Transfektion mittels Nanopartikel (333). Diese verspricht eine geringe Toxizität. Jedoch konnten in bisherigen Studien unter Verwendungen verschiedener Nanopartikel oftmals lediglich Transfektionseffizienzen von 15-20 % erreicht werden (330,334,335). Teilweise zeigte sich auch eine Effizienz von nur 6 % oder aber von 75 % (336). Es hat sich gezeigt, dass die Transfektion abhängig von Spender, Zellmorphologie und Passagenzahl ist (337–339). Dies könnte auch in der durchgeführten Transfektion von pDNA (Plasmid DNA) in BMSCs eine Rolle gespielt haben und letztendlich eine nicht ausreichende Transfektion verursacht haben. Neben der Nanopartikel-Transfektion könnte versucht werden mittels Elektroporation eine stabile Transfektion von pDNA herbeizuführen (340). Elektroporation und Nukleofektion weisen in bisherigen Studien deutlich höhere Transfektionseffizienzen auf. Es muss jedoch auf Zelltoxizität zu achten (341–343).

4.2.2 MMP-9 Proteinexpression mittels Zymographie

Um die Expression und Aktivität von MMP-9 Protein nachzuweisen, erfolgte die Durchführung einer Gelatine Zymographie. Die Zymographie ist eine Variante der klassischen SDS-Gelelektrophorese, in der durch Zusatz eines Substrates in einem Acrylamidgel, hier Gelatine, dieses von Enzymen verdaut werden kann. Neben aktiven Formen an MMPs lassen sich auch alle anderen Isoformen in der Zymographie nachweisen. Die latente Form des Enzyms wird durch die Denaturierung und Renaturierung aktiv und kann so gemessen werden (1). In der Zymographie sind Enzymmengen im Picogramm-Bereich detektierbar (1).

Während zur Abschätzung des Molekulargewichts der MMPs ein mitgeführter Proteinstandard herangezogen werden kann, so ist daraus kein definitiver Schluss auf das genaue Molekulargewicht zu ziehen. Dies resultiert aus der Zugabe eines Proteinsubstrates, welches die Wanderung des Proteins im Gel (nicht linear) verzögert und so die Molekulargewichtsbestimmung in der Zymographie erschwert (2). Die Bestimmung des genauen Molekulargewichts wäre allerdings essenziell für die genaue Zuordnung von MMP-Gruppen und dem MMP-Aktivierungsstatus. Daher werden zusätzlich rekombinante MMPs mit bekanntem Molekulargewicht mit auf das Gel aufgetragen.

Während MMP-9 auch 92 kDa Gelatinase und MMP-2 auch 72 kDa Gelatinase genannt werden, was Hinweise auf ihr molekulares Gewicht gibt, liegen MMPs oft in Form von pro-Enzymen oder als Dimere vor. Nach *UniProt*-Datenbank kann humanes, aktives MMP-9 nach Spaltung in einem Molekulargewicht von 67 kDa und 82 kDa (344,345) vorliegen, während MMP-2 sich in pro- und aktiver Form bei 72 kDa (345–347) bewegt.

Die Zuordnung der MMP-Formen erfolgte somit anhand der Banden von rekombinanten MMPs und deren Molekulargewichts anhand eines Standards. Eine beweisende Zuordnung der MMPs kann nur mittels Western Blot-Analyse erfolgen. Unter Annahme dieser Limitationen bietet die Zymographie dennoch ein kostengünstiges Verfahren, um mögliche Proteaseaktivität sowohl in Zelllysaten als auch in konditioniertem Medium (Überstand) zu detektieren.

4.2.2.1 Erhöhte MMP-9 Proteinexpression in Mischsphäroiden

In der Gelatine-Zymographie konnte eine erhöhte Proteinexpression einer 92 kDa schweren Gelatinase in Mischsphäroiden beobachtet werden. Dabei handelt es sich vermutlich um pro-MMP-9. Daneben zeigte sich enzymatische Aktivität bei ca. 70 kDa. Hierbei könnte es sich sowohl um MMP-9 als auch MMP-2 handeln. Sphäroide aus nur HNSCC-Zellen zeigten im Allgemeinen eine nur schwache Aktivität von Gelatinasen. Diese war kaum detektierbar. Dies deckt sich mit der ermittelten Gen- und Proteinexpression in HNSCC-Sphäroiden aus der AG Bauer (239). Zudem ist bekannt, dass Tumorzellen meist nur eine geringe Expression an MMP-9 aufweisen.

4.2.2.2 Erhöhte Expression von MMP-9 durch BMSCs in Mischsphäroiden

Nachdem auch die vorausgegangene Analyse der MMP-9 Promotoraktivität eine definitive Zuordnung der vermehrten MMP-9 Expression zu einem Zelltyp nicht zuließ, wurde ein transients KD von MMP-9 mittels spezifischer siRNA sowohl in HNSCC-Zellen als auch BMSCs durchgeführt und anschließend die Änderung der MMP-9 Proteinexpression in der Gelatine-Zymographie analysiert. Hierbei zeigte sich bei KD von MMP-9 in BMSCs eine über 50 %-ige Reduktion der MMP-9 Aktivität in Mischsphäroiden. Nach KD von MMP-9 in HNSCC-Zellen zeigte sich keine signifikante Reduktion der MMP-9 Aktivität in Mischsphäroiden.

Dies deckt sich mit der Analyse der MMP-9 Promotoraktivität in HNSCC-Zellen. HNSCC-Zellen zeigten dabei in Mischsphäroiden keine erhöhte Promotoraktivität im Vergleich zur Monokultur. Diese war sogar deutlich reduziert. Die Aktivität der ca. 70 kDa schweren Gelatinase blieb nach KD unverändert. So ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um MMP-2 handelt.

Dies legt nahe, dass die erhöhte Sekretion von MMP-9 in Mischsphäroiden durch BMSCs bei Kontakt mit HNSCC-Zellen erfolgt. HNSCC-Zellen könnten dabei BMSCs durch sezernierte Zytokine oder durch direkten Zell-Zell-Kontakt zu einer vermehrten MMP-9 Produktion anregen. Solche veränderten Zytokin-Expressionen könnten in Folgeexperimenten mittels ELISA näher untersucht werden. Die erhöhte MMP-9 Synthese könnte den HNSCC-Zellen die Invasion durch Degradation von EZM, im Speziellen der Basalmembran, ermöglichen und HNSCC-Zellen zu einem invasiven Phänotyp wandeln. Gaggioli et al. konnten zeigen, dass bei Co-Kultur aus Fibroblasten und Plattenepithelkarzinomzellen ausschließlich Fibroblasten die Invasionsfront bildeten und die Plattenepithelkarzinomzellen den Fibroblasten folgten (348).

4.3 Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen und BMSCs fördert das Ausbreitungsverhalten auf Matrigel®

Ziel des Experiments war es zu untersuchen, ob HNSCC-Zellen in Co-Kultur mit BMSCs ein anderes Ausbreitungsverhalten zeigen als HNSCC-Zellen in Monokultur. Der durchgeführte *Spreadingassay* eignet sich, um das Ausbreitungsverhalten von HNSCC-Zellen und BMSCs *in vitro* nachweisen zu können.

In diesem Experiment wurde das Ausbreitungspotenzial von 3D-Zellkulturen untersucht. Für den *Spreadingassay* erfuhren die Zellen durch die 3D-Kultivierung nicht nur Stimulation durch den Zell-Zell-Kontakt und Hypoxie, zudem wurde den Zellen mit der Platzierung auf Matrigel® der Stimulus einer extrazellulären Matrix in Form einer Basallamina gegeben. Um die Interaktion von HNSCC-Zellen mit der Basalmembran *in vitro* zu beobachten, kann mit Hilfe von Matrigel® eine Basalmembran imitiert werden. Matrigel® besteht überwiegend aus Laminin, Kollagen IV, Entactin und Heparansulfatproteoglykan (253–255). Analysiert wurden mikroskopische Aufnahmen von Zellen, die sich im *Spreadingassay* konzentrisch auf Matrigel® ausbreiteten (Abbildung 37).

Im Folgenden werden die Ergebnisse des *Spreadingassays* auf Matrigel® für das Ausbreitungsverhalten von HNSCC-Zellen und BMSCs diskutiert.

4.3.1 Adhäsion und Ausbreitung von HNSCC-Sphäroiden

Nach Darbietung eines äußeren Reizes durch die Platzierung auf dem Kollagen IV haltigen und laminin-reichen Matrigel® fand bei Zellen aus Tumorsphäroiden in Monokultur keine Ausbreitung statt. Auch eine Adhäsion auf Matrigel® gelang den HNSCC-Zell-Sphäroiden größtenteils nicht.

Lediglich Tumorzellen, die die molekularen Eigenschaften besitzen, die Matrix enzymatisch abzubauen, können die Basalmembran als nanoporöse Membran potenziell durchbrechen. MMPs wird dabei durch ihre enzymatische Aktivität eine enorm wichtige Rolle zugeschrieben (349). Dabei sind es insbesondere die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9, die die Spaltung von Kollagen IV ermöglichen (350). Neben ihrer Eigenschaft, die Basalmembran für Tumorzellen durchgängig zu machen, scheinen MMPs jedoch auch schon weitaus früher an der Tumorprogression beteiligt zu sein. Dies ist durch die Hochregulierung an MMPs in Tumoren bereits vor Durchbruch der Basalmembran anzunehmen und ein Hinweis auf die Tumormalignität (219).

Vorangehende Arbeiten zeigten in Sphäroiden aus Tumorzellen in Monokultur eine niedrige Genexpression von MMP-9 und MMP-2 (239). Dies könnte einen Erklärungsansatz für das eingeschränkte Ausbreitungspotenzial liefern. Die Zymographie-Experimente dieser Arbeit, mit denen die MMP-2 und MMP-9 Expression von Sphäroiden in Mono- und Mischkultur nachgewiesen wurde, bestätigte ebenfalls die geringe Expression von MMP-2 und MMP-9 in HNSCC-Zell-Sphäroiden.

Erst in Sphäroiden hoher Zellzahl (27.000 Zellen/Sphäroid) zeigten Tumorsphäroide gelegentlich eine Ausbreitung. Dies mag im Zusammenhang mit einem erhöhten Selektionsdruck durch einen ausgeprägteren Nähr- und Sauerstoffgradienten stehen, der die Zellen zur Auswanderung treibt.

Die ursprünglichen TNM-Stadien der verwendeten HNSCC-Zelllinien stimmen mit diesen Beobachtungen nur bedingt überein, denn es handelte sich um Zelllinien aus mittleren bis fortgeschrittenen Tumorstadien (UICC II-IVa). Fortgeschrittene Tumorstadien zeichnen sich durch ein erhöhtes Metastasierungspotenzial aus, welches mit einer hohen Expression an MMP-9 korreliert (351,352).

4.3.2 Adhäsion und Ausbreitung von Mischsphäroiden

Im Gegensatz zu HNSCC-Zell-Sphäroiden kam es bei Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen mit BMSCs zu einer signifikanten Zunahme der Ausbreitung auf Matrigel® im Beobachtungszeitraum. In der Zymographie konnte, passend zu dieser Beobachtung, eine deutlich erhöhte Proteinexpression und Aktivität von MMP-9 und auch MMP-2 in Mischsphäroiden nachgewiesen werden. Die hier untersuchten HNSCC-Zellen allein zeigten weder eine hohe Promotoraktivität, noch eine hohe Genexpression oder Proteinexpression von MMP-9. Dies korrelierte auch mit den Beobachtungen im durchgeführten *Spreadingassay* auf Matrigel®. Hier zeigten die untersuchten HNSCC-Zell-Sphäroide keine Migration.

Ein in Vorarbeiten durchgeführter Invasionsassay zeigte bei Mischsphäroiden ebenfalls ein hohes Invasionspotenzial. Dieses konnte nach Inhibition von MMP-9 signifikant herabgesetzt werden (296). Folglich scheint MMP-9 für die Migration und Invasion von Mischsphäroiden essenziell zu sein. MSCs, die bekannt für die Synthese von Matrixmetalloproteasen sind, könnten hier in der Tumormikroumgebung eine wichtige Rolle spielen (110,353,354). In dem von uns durchgeführten KD von MMP-9 in HNSCC-Zellen und BMSCs konnten tatsächlich die BMSCs als hauptverantwortliche Zellen für die MMP-9 Synthese ermittelt werden.

Der für die Invasion und Migration von HNSCC-Zellen *in vivo* und *in vitro* am besten untersuchte Rezeptor ist der EGF-Rezeptor. Dieser kann über den PI3K/Akt und ERK/AP-1 Signalweg die Expression von Matrixmetalloproteasen wie MMP-9 erhöhen (292). Darüber hinaus erfolgt über EGFR/MMP-9 die Degradation von E-Cadherin und die Verminderung der Zell-Zell Adhäsion und vermehrte Invasion (355). Es konnte gezeigt werden, dass MSCs durch Botenstoffe die EMT in Tumoren einleiten können, unter anderem über den PI3K/Akt Signalweg (143,356,357). Folgeexperimente, bei denen nach Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen mit BMSCs die Änderung bestimmter Expressionsmuster im HNSCC gezeigt werden, können weiteren Aufschluss darüber geben, welcher Mechanismus der gesteigerten Motilität der untersuchten Sphäroide zugrunde liegt.

Eine gesteigerte Motilität von HNSCC-Zellen nach Co-Kultivierung mit BMSCs konnten auch Liu und Kollegen im Transmigrationsassay beobachten (115). Auch erwiesen sie, dass aus dem Knochenmark stammende BMSCs die Proliferation und Invasion von Kopf-Hals-Tumoren sowie die Chemoresistenz gegen Paclitaxel *in vitro* und *in vivo* fördern (115). HNSCC-Zellen wurden hier auf zwei verschiedene Arten mit BMSCs stimuliert: durch direkten Kontakt von

BMSCs mit HNSCC-Zellen oder durch Inkubation von HNSCC-Zellen in konditioniertem MSC-Medium. Mittels RNA-Sequenzierung und Proteinanalysen konnten Liu et al. belegen, dass der direkte Kontakt zwischen HNSCC-Zellen und BMSCs die EMT förderte. Sowohl die Expression von β -Catenin an der Plasmamembran als auch Vimentin steigerten gleichzeitig die Zellmotilität.

Ein Prozess, der die Tumorprogression, Invasion und Metastasierung von HNSCCs fördern kann, ist die epitheliale-mesenchymale Transition. Gekennzeichnet ist die EMT unter anderem auch durch den Verlust von E-Cadherin, einem transmembranen Glykoprotein, das den Zell-Zell-Kontakt fördert. Die E-Cadherin-Expression korreliert mit dem Grad der Differenzierung, wobei am wenigsten differenzierte Tumoren eine reduzierte E-Cadherin-Expression aufwiesen (358). Böhrnsen und Kollegen fanden in Experimenten mit der HNSCC-Zelllinie PCI 13 in Co-Kultur mit MSCs heraus, dass die Expression von E-Cadherin in PCI 13 herunterreguliert wurde, während andere EMT-Marker nach Co-Kultivierung insgesamt eher auf eine Unterdrückung der EMT schließen ließen. Auch eine verringerte Expression von MMP-14 bei Co-Kultivierung von PCI 13 mit hMSCs wurde beobachtet (359). MMP-14 ist dafür bekannt, die Proliferation und Invasion in Tumoren zu fördern, darunter auch in HNSCCs (360).

Während der Verlust von E-Cadherin bei der Tumorprogression für das Verlassen des Tumorzellverbandes entscheidend ist, findet auch während der Wundheilung eine physiologische Herunterregulation von E-Cadherin statt. Dies ermöglicht Epithelzellen die Migration, um verletztes Gewebe zu ersetzen. Dieser Prozess kann durch die Anwesenheit von MSCs verstärkt werden (361). Die Reduzierung von E-Cadherin in Tumorzellen ist also möglicherweise nicht ausschließlich an eine beginnende epitheliale-mesenchymale Transition gekoppelt.

In dieser Arbeit wurde die Expressionsänderung von E-Cadherin und anderen EMT-Markern im HNSCC nach Co-Kultivierung mit BMSCs bisher noch nicht näher untersucht. Dennoch können Arbeiten dieser Arbeitsgruppe die Aussage von Böhrnsen und Kollegen unterstützen, dass es sich bei PCI 13 um eine eher differenzierte HNSCC-Zelllinie mit epithelialelem Charakter und hoher E-Cadherin Expression in Monokultur handelt (362).

Weiterführende Experimente, die die Änderung der molekularen Expression bestimmter Marker im HNSCC nach Co-Kultivierung mit BMSCs näher betrachten, wären daher durchaus interessant.

4.3.3 Adhäsion und Ausbreitung von BMSC-Sphäroiden

Auch die Kontrollen mit Sphäroiden aus BMSCs in Monokultur migrierten auf Matrigel®. Dies ist insoweit nicht verwunderlich, da MSCs als Hauptakteure an der Wundheilung und Gefäßneubildung beteiligt sind. Xing et al. konnten demonstrieren, dass BMSCs auf Basalmembranen deutlich zur Migration angeregt werden. Dies erfolgte durch die vermehrte Expression der Intergine α_3 und α_{11} und deren Bindung an die Basalmembranproteine Laminin und Kollagen IV (363). So zeigte sich in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zwar, dass die MMP-9 Genexpression in BMSCs schwach war, doch durch Simulation einer Basalmembran konnte es vielleicht zu einer Stimulierung der BMSCs zur Migration auf Matrigel® sowie zur MMP-9 Produktion oder aber zur Umwandlung in einen Fibroblasten-ähnlichen Phänotypen kommen. Durch sogenannte TAFs konnte in Forschungsarbeiten besonders häufig eine erhöhte MMP-9 Sekretion beobachtet werden (364,365). Genauere Untersuchungen wären nötig, um zu überprüfen, ob es durch Kontakt zu Matrigel® zu einer Stimulation der MMP-9 Synthese kommen könnte.

Die Umwandlung in einen Fibroblasten-ähnlichen Phänotypen durch die Kulturbedingungen allein wurde durch Kontrolle der Marker FSP-1 und α -SMA mittels qPCR ausgeschlossen (Abbildung 46 und Abbildung 47).

Kultivierung und Passage hatten keinen Einfluss auf eine Differenzierung zu TAFs. Dies wurde mit einer qPCR-Analyse der Fibroblastenmarker α -SMA und FSP-1 in Passage 2 und Passage 6 von BMSCs untersucht. In Mischsphäroiden waren die Fibroblastenmarker im Vergleich zu BMSCs aus Monokultur ebenfalls nicht erhöht. Folglich hatte eine Co-Kultivierung im Kulturzeitraum auch keine TAF-Differenzierung induziert.

BMSCs weisen in Monokultur eine hohe Gen- und Proteinexpression an MMP-2 auf. Neben MMP-9 konnte auch MMP-2 an der invasiven Front von HNSCC-Zellen nachgewiesen werden. Wie MMP-9 konnte auch MMP-2 dort Kollagen IV-Ketten abbauen (299). Des Weiteren scheint MMP-2 in MSCs für deren Invasion und Chemotaxis essenziell zu sein (366,367).

Zu bemerken ist weiterhin, dass die relative Flächenausbreitung in Mischsphäroiden unter Zunahme des Anteils an Tumorzellen abnahm. Dies könnte darauf hinweisen, dass primär BMSCs die Ausbreitung vorantreiben.

4.3.4 Zellmorphologische Beobachtungen

Ausschlaggebend für die Beantwortung der Frage, ob der Kontakt von HNSCC-Zellen zu BMSCs die Migration der HNSCC-Zellen förderte, wäre die auswandernden Zellen zu identifizieren. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten bei BMSC-Sphäroiden auswandernde Zellen in überwiegend spindelförmiger mesenchymaler Morphologie (368). Bei Mischsphäroiden hingegen zeigte sich fast ausschließlich eine Auswanderung von rundlichen Zellen epithelialer Morphologie, wie sie sich typischerweise auch in den verwendeten PCI-Zellreihen in 2D-Kultur zeigten. Daneben fanden sich dort auch vereinzelt spindelförmige Zellen mit mesenchymaler Charakteristik, bei den davon auszugehen ist, dass es sich um BMSCs handelt. BMSCs sind jedoch keine eindeutigen morphologischen Kriterien zugeteilt. Sie können von spindelförmig bis zu kuboidal erscheinen (369). Auch bei den vereinzelt migrierenden HNSCC-Zell-Sphäroiden in hoher Zellzahl zeigten sich zellmorphologisch ausschließlich rundliche Zellkörper. Dies lässt zunächst auf verstärktes Auswandern von HNSCC-Zellen aus dem Mischsphäroid schließen.

Dies muss in zukünftigen Arbeiten geklärt werden. Um eindeutig nachzuweisen, welcher Zelltyp aus dem Sphäroid auswandert, sind Folgeexperimente denkbar, bei denen HNSCC-Zellen und BMSCs fluoreszenzmarkiert werden (z.B. GFP) und somit eindeutig in einer Co-Kultur identifizierbar sind (370).

Jedoch ist es ebenfalls denkbar, dass BMSCs nach Co-Kultivierung mit HNSCC-Zellen ihre Morphologie wie bei Liu et al. von einer spindelförmigen, mesenchymalen Gestalt zu einer rundlicheren Form verändern und ohne HNSCC-Zellen aus dem Sphäroid auswandern.

Liu et al. konnten nach Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen (SCC-25) und hMSCs im gleichen Verhältnis nach vier Tagen in 1,6 % der Fälle eine spontane Zellfusion von HNSCC-Zellen und MSCs nachweisen (115). Diese fusionierten Zellen wurden mit einem Zellsorter separiert und auf eine poly-L-Lysin beschichtete Platte ausgesät. In Abbildung 45 werden mikroskopische Aufnahmen einer immunfluoreszenten Phalloidin-Färbung von F-Actin präsentiert. Diese Aufnahmen zeigen die morphologischen Unterschiede zwischen fusionierten Zellen und der HNSCC-Zelllinie SCC-25 und hMSCs in Monokultur. Nach der Fusion konnte eine morphologische Änderung mit dem Auftreten von Zellen mit mehreren Zellkernen nachgewiesen werden. Anfänglich zeigten fusionierte Zellen entweder eine HNSCC- oder MSC-ähnliche Morphologie, wobei die epitheliale Morphologie die Vorherrschende war.

Innerhalb von 10 Tagen wiesen fast alle fusionierten Zellen eine epitheliale Morphologie auf. Dies stellt, soweit bekannt, ein seltenes Ereignis dar (371).

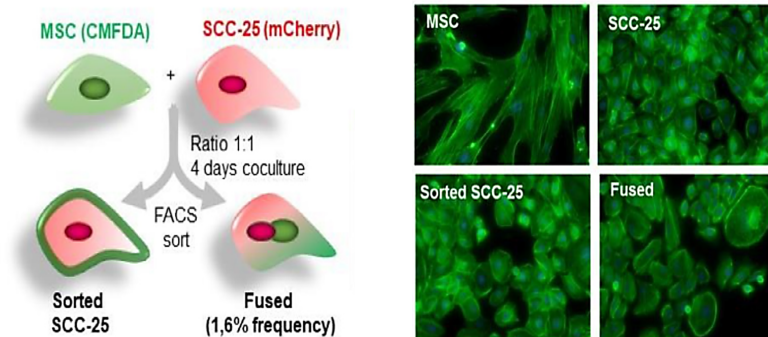


Abbildung 45: Zellfusion von HNSCC und hMSC nach Co-Kultivierung (aus Liu et al. (115)).

Ebenfalls denkbar wäre, dass sich HNSCC-Zellen bei der Invasion die molekulare Ausstattung der BMSCs, wie z.B. die Sekretion von Matrixmetalloproteasen, zunutze machen und den BMSCs, die sich den Weg durch Gewebe bahnen, folgen. Dies setzt jedoch zumindest die Migrationsfähigkeit der HNSCC-Zellen voraus. Gaggioli et al. erwiesen, dass in Co-Kultur von SCC-Zellen mit Fibroblasten die Invasionsfront aus Fibroblasten gebildet wurde (348). Auch Saénz-de-Santa-María et al. konnten Zellen mesenchymalen Phänotyps als *Leader*-Zellen im Verband mit HNSCC-Zellen in der Migration detektieren (372).

4.3.5 Limitationen des *Spreadingassays*

Ein zusätzlicher Proliferationsassay, mit dem durch Reagenzien wie MTT (373) oder Resazurin (374) die Zellzahl bestimmt wird, könnte nach Beendigung des *Spreadingassays* klären, ob es sich bei der Zellausbreitung auf Matrigel® ausschließlich um migrierende Zellen oder stattdessen um eine Ausbreitung durch Proliferation handelt. In den Experimenten von Liu et al. war IL-6 nach Co-Kultivierung das am höchsten exprimierte Zytokin. Sie nahmen an, dass hMSCs durch parakrine Signalweiterleitung in HNSCC-Zellen den Akt-PI3K-Signalweg stimulierten und so die Proliferation von HNSCC-Zellen förderten (115). Es konnte außerdem eine Erhöhung von IL-6 in HNSCC Patienten als proinflammatorisches Zytokin festgestellt werden (375). Bei Interleukin-6 (IL-6) handelt es sich um ein Zytokin, welches in der Immunregulation und Hämatopoese eine Rolle spielt. Es wird direkt mit einer vermehrten Fähigkeit zur Invasion und Proliferation von HNSCCs in Verbindung gebracht.

Während der Einsatz von Matrigel® eine annähernd gute Simulation der Basalmembran zulässt, so unterscheidet es sich doch deutlich in seiner Konsistenz und durch das Vorhandensein von nur einer Laminin-Isoform zur physiologischen Basalmembran (298). Diese Abweichung vom physiologischen Reiz kann zu einer veränderten oder auch ausbleibenden potenziellen Ausbreitung von Zellen führen.

4.4 ALP beeinflusst die Ausbreitung von Mischsphäroiden

Neben einer erhöhten Proteinexpression von Runx2 in Mischsphäroiden konnte in Arbeiten der AG Bauer ebenfalls eine erhöhte ALP-Aktivität in Mischsphäroiden detektiert werden, nicht jedoch in Tumor- und BMSC-Sphäroiden in Monokultur (239). Bei ALP handelt es sich, ebenso wie bei Runx2, um einen osteogenen Differenzierungsmarker von hMSCs (376).

Eine erhöhte Aktivität von ALP in Tumorzellen wird mit tumorfördernden Eigenschaften wie Proliferation, Metastasierung, Invasion und epithelialer Plastizität assoziiert (204,240). In Prostatakarzinom Zellen stellte sich nach KD von ALP eine vermehrte mesenchymale zu epithelialer Transition (MET), ein Anstieg an toten Zellen und eine verminderte Migrationsfähigkeit (240) heraus. So wird ALP aktuell auch als Tumorbiomarker für Patienten mit Osteosarkomen (377), kolorektalen Karzinomen (378), hepatozellulären Karzinomen (379) und Knochenmetastasen (262,380) diskutiert. Erhöhte ALP-Werte konnten ebenfalls bei OSCC-Patienten in fortgeschrittenen Stadien nachgewiesen werden (260). Diese zeigten sich insbesondere bei Metastasierung in den Knochen signifikant erhöht (260,381). Eine Metastasierung in Knochengewebe stellt, nach einer Metastasierung in Lungengewebe, den zweithäufigsten (19,1 % - 29,7 %) Metastasierungsort in allen HNSCC-Patienten dar (382,383) und geht mit einer schlechten Prognose einher (384). Ebenso verhält es sich mit der häufig auftretenden lokalen Invasion von Knochengewebe (292). Konträr zeigten Lou et al. eine ALP-abhängige Inhibition der Metastasierung in Lungenkarzinomen (385).

Um einen Zusammenhang der erhöhten ALP-Aktivität auf die Migrationsfähigkeit von Mischsphäroiden zu untersuchen, erfolgte die Durchführung eines *Spreadingassays* auf Matrigel® mit spezifischer Inhibition der ALP-Aktivität durch Levamisol.

Bei Levamisol handelt es sich um ein Arzneimittel aus der Gruppe der Imidazothiazole, das als Antihelminthikum in der Tiermedizin verwendet wird und bis in die 1990er Jahre wegen seiner immunmodulatorischen und tumorhemmenden Wirkung als Adjuvans in der Therapie des Kolonkarzinoms zum Einsatz kam (386). Levamisol hat besonders starke Affinität zur *liver/bone/kidney* (L/B/K) ALP, nicht aber zu anderen Isoformen der ALP (387).

Im *Spreadingassay* präsentierte sich eine bis zu 50 %-ige Reduktion der Migration von Mischsphäroiden unter Einsatz von 50 µM Levamisol. Die Inhibition der Migrationsfähigkeit erwies sich unabhängig von der eingesetzten Konzentration an Levamisol. Tendenziell erfolgte jedoch

eine stärkere Inhibition bei einer höheren Konzentration an Levamisol. Unter Umständen könnten weitere Levamisol-Konzentrationen getestet werden.

Die Inhibition der Ausbreitungsfähigkeit von Mischsphäroiden lässt vermuten, dass die ALP-Aktivität eine Rolle in der Migration von Tumorsphäroiden spielt. Dies könnte auf einem synergistischen Effekt zusammen mit der festgestellten Überexpression von MMP-9 und der MMP-9 vermittelten Invasion von Mischsphäroiden beruhen. Han et al. konnten zeigen, dass ALP-Level positiv mit der Expression von MMP-9 sowie Lungenmetastasen in Osteosarkom-Patienten korrelierten (388). In der Zusammenschau der erhöhten Expression von sowohl Runx2 als auch ALP in Mischsphäroiden lässt dies eine osteogene Differenzierung der BMSCs vermuten. Wessely et al. konnten die Hochregulierung der osteogenen Differenzierungsmarker Runx2 und ALP bei Co-Kultivierung von HNSCC-Zellen und BMSCs nachweisen (239). Vallet et al. zeigten, dass Vorläuferstufen von Osteoblasten aus BMSCs die Migration von Brustkrebszellen fördern (389). Daneben können auch Tumorzellen im Rahmen von sogenanntem Osteomimikry den Expressionscharakter von mesenchymaler Stammzellen und von Osteoblasten annehmen (390,391). Zu diesem zählen unter anderem auch ALP und Runx2 (392).

Yang et al. konnten aufzeigen, dass Osteomimikry in einer Reihe von Tumoren, wie auch dem HNSCC, mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer schlechten Prognose assoziiert ist (393). Bisher wurde Osteomimikry überwiegend in Mamma- und Prostatakarzinomen im Zusammenhang mit Knocheninvasion und Knochenmetastasen beschrieben (394–396). So könnten aber auch HNSCC-Zellen sich eine osteogene Differenzierung aneignen.

Während MSCs nicht nur durch chemische Reize im Medium und durch Zell-Zell-Kontakte zur Differenzierung angeregt werden können, können auch physikalische Faktoren wie Nanostrukturen Differenzierung induzieren (397). Folglich könnte bereits die Kultivierung in 2D in Kulturflaschen die BMSCs zu einer Differenzierung angeregt haben. In Vorarbeiten zeigten BMSCs in Monokultur jedoch eine niedrige Expression und Aktivität von ALP und Runx2 bis hin zur Passage 7. Dies lässt keine Differenzierung von BMSCs durch Kulturbedingungen *in vitro* vermuten.

Dennoch könnte das Platzieren von BMSCs auf Matrigel[®] diese aber zu einer osteogenen Differenzierung anregen und zu einer vermehrten Expression osteogener Differenzierungsmarker führen (398) und so den Effekt der Inhibition von ALP durch Levamisol verstärken. Ob

die Umsiedlung von BMSC-Sphäroiden tatsächlich Einfluss auf die Differenzierung nimmt, könnte in Folgeexperimenten näher untersucht werden.

Vor allem aber sollte in Folgeexperimente eingehender untersucht werden, welchem Zelltyp aus der Co-Kultivierung die vermehrte Expression von ALP zuzuschreiben ist und, ob eine direkte Beeinflussung von ALP durch Runx2 erfolgt. Zudem sollte geklärt werden, welcher Zelltyp primär für die vermehrte Migration verantwortlich ist. Experimente der AG Bauer haben demonstriert, dass die untersuchten HNSCC-Zellen vor der Co-Kultivierung noch nicht die molekulare Ausstattung besitzen um in Matrigel® zu invadieren. Eine hohe E-Cadherin Expression und die geringe Expression von Vimentin und N-Cadherin bei den HNSCC-Zelllinien PCI 1 und PCI 13, bei denen es sich um Zelllinien mit ausgeprägter epithelialer Charakteristik handelt, gehen mit dieser Beobachtung im funktionellen Assay einher (362,399). Ein Nachweis der Expressionsänderung von Proteinen, die mit der EMT assoziiert sind, kann Aufschluss darüber geben ob HNSCC-Zellen nach Co-Kultivierung die EMT einleiten und damit an Migrations- und Invasionspotenzial gewinnen. Problematisch ist es lediglich die Zellen nach der Co-Kultivierung wieder für weitere Analysen wie der Western Blot-Analyse voneinander zu separieren. Hier könnten Methoden wie die magnetische Zellseparierung (MACS) oder die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) herangezogen werden. Zudem gibt es Veröffentlichungen, die die Fusion von MSCs und Tumorzellen unter bestimmten Umständen der Co-Kultivierung beschreiben (371). Die HNSCC-Zellen könnten nach Fusion MSCs ggf. als Vehikel bei der Migration und Invasion nutzen.

5 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome stellen die häufigste Malignität im Kopf- und Halsbereich dar. Trotz Intensivierung von Forschung und Entwicklung an erweiterten und neuen Therapieansätzen hat sich die Überlebensprognose von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, vorwiegend in fortgeschrittenen Stadien, bisher nicht wesentlich verbessert. Die Metastasierung ins Knochengewebe stellt, nach der Metastasierung ins Lungengewebe, den zweithäufigsten Metastasierungsort in allen HNSCC-Patienten dar und geht mit einer besonders schlechten Prognose einher. Hier wird die Dringlichkeit deutlich, grundlegende Interaktionen von Zellen im Tumornetzwerk weiter aufzuklären und zu verstehen. Bis heute ist noch nicht vollständig geklärt, wie Tumorzellen ihre Umgebung beeinflussen und welche Interaktionen zwischen Tumorzellen und der Tumormikroumgebung das Tumorwachstum begünstigen. Vor allen in weiter fortgeschrittenen Stadien konnten unter anderem mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (BMSCs) im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung der Wechselwirkung zwischen HNSCC-Zellen und BMSCs auf MMP-9 Expression und Funktion weiter aufzuklären. Diesen Stammzellen werden sowohl tumorhemmende als auch tumorprogressive Eigenschaften zugeschrieben. Ihre Auswirkung auf Tumorzellen und die Tumormikroumgebung ist bis heute jedoch nicht eindeutig geklärt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die aktuellen Forschungsergebnisse bieten derzeit überwiegend Hinweise auf die Förderung aggressiver Tumoreigenschaften durch die Infiltration mesenchymaler Stammzellen.

Aus der Arbeitsgruppe war bekannt, dass es bei Co-Kultivierung von BMSCs und HNSCC-Zellen in 3D-Zellkultur zu einer erhöhten Gen- und Proteinexpression der osteogenen Differenzierungsmarker Runx2 und ALP kam. Neben der osteogenen Differenzierung konnten sowohl Runx2 als auch ALP eine Beeinflussung der EMT, Invasion und Metastasierung von Tumoren zugeschrieben werden. In dieser Arbeit wurde die Rolle von ALP bei der Ausbreitung von co-kultivierten Sphäroiden untersucht. Um eine möglichst realitätsnahe Wachstums- und Versorgungsumgebung zu ermöglichen, stand besonders die 3D-Kultivierung der untersuchten Zellen nach der sogenannten *Hanging Drop*-Methode, neben einer 2D-Kultivierung adhärenter Zellen, im Vordergrund. Es konnte gezeigt werden, dass ALP das Ausbreitungsverhalten von

HNSCC-Zellen begünstigt, da die Inhibition von ALP die Ausbreitung von Co-Kultur Sphäroiden auf Basallamina-ähnlichem Matrigel® hemmte.

Daten der Arbeitsgruppe konnten zudem eine erhöhte Expression und Sekretion von MMP-9 bei Kultivierung von HNSCC-Zellen zusammen mit BMSCs nachweisen. Bei MMP-9 handelt es sich um eine Gelatinase, die für den Abbau extrazellulärer Matrix verantwortlich ist und mit einer erhöhten Tumorinvasion und Metastasierung assoziiert ist. Der genaue zelluläre Ursprung einer erhöhten Expression von MMP-9 im Tumorgewebe war bisher nicht bekannt. Diese Arbeit konnte aufzeigen, dass die mesenchymalen Knochenmarkstammzellen Ursprung der erhöhten MMP-9 Expression bei Co-Kultivierung mit HNSCC-Zellen waren. Zur Beantwortung der Frage, ob HNSCC-Zellen nach Co-Kultivierung mit BMSCs eine erhöhte MMP-9 Promotoraktivität aufweisen, erfolgte die Durchführung eines Dual-Luciferase® Reporter Assays. Hierbei stellte sich heraus, dass in HNSCC-Zellen bei Co-Kultivierung mit BMSCs keine Steigerung der MMP-9 Promotoraktivität auftrat. Eine Analyse der MMP-9 Sekretion nach spezifischem MMP-9 siRNA Knockdown in BMSCs bzw. HNSCC-Zellen konnte nur nach Knockdown in BMSCs eine deutliche Reduktion der MMP-9 Expression herbeiführen.

Des Weiteren diene diese Arbeit der genaueren Erforschung der Regulation der MMP-9 Expression durch Runx2 aus HNSCC-Zellen. Dafür wurde ein Knockdown von Runx2 mittels spezifischer siRNA in HNSCC-Zellen durchgeführt. Es folgte die Analyse der MMP-9 Aktivität in der Gelatinase-Zymographie. Hierbei konnte kein eindeutiger Einfluss von Runx2 auf die MMP-9 Aktivität in Sphäroiden aus HNSCC-Zellen gezeigt werden. Hier sind weiterführende Untersuchungen zur Regulation von MMP-9 notwendig.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass BMSCs durch Sekretion von MMP-9 einen tumorprogressiven Einfluss auf HNSCC-Zellen ausüben und der osteogene Differenzierungsmarker ALP BMSCs und HNSCC-Zellen zur Interaktion mit Basallamina-ähnlichem Matrigel® befähigt und deren Ausbreitung begünstigt. Die durchgeführten Experimente lassen auf einen synergistischen Einfluss von MMP-9 und ALP auf die Migrations- und Invasionsfähigkeit von HNSCCs schließen.

6 Anhang

6.1 Zusätzliche Abbildungen

Um auszuschließen, dass die verwendeten Knochenmarksstammzellen während der Verwendung von Passage 2 zu Passage 6 differenzierten, wurde in Abbildung 46 die relative Genexpression der Fibroblastenmarker α -SMA (links) und FSP-1 (rechts) bei adhärenter Zellkultivierung untersucht. Die Expression an den mit TAF- und Fibroblasten-assoziierten Marker α -SMA und FSP-1 zeigte sich in BMCs unterschiedlicher Passagen nicht signifikant divergierend. Dies deutet darauf hin, dass innerhalb der verwendeten BMSC-Passagen keine Differenzierung der BMSCs erfolgte.

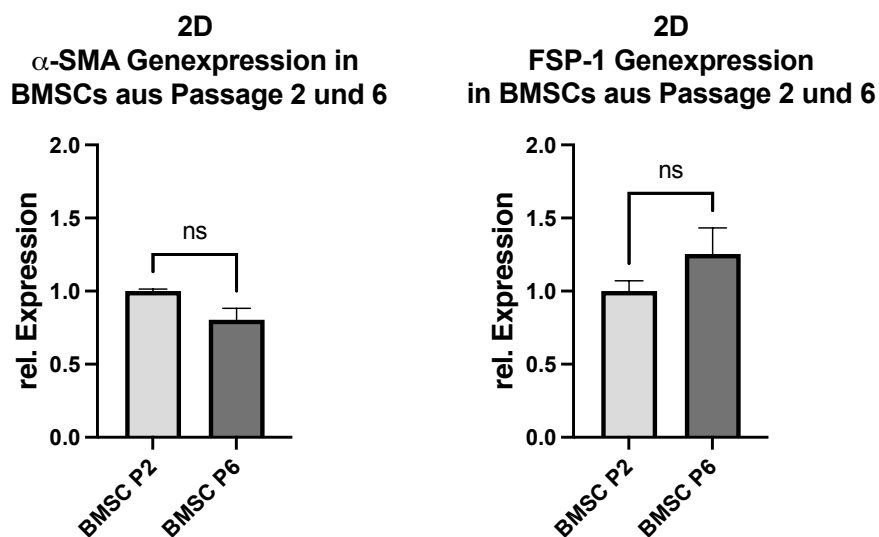


Abbildung 46: Relative Genexpression von Fibroblastenmarkern in BMSCs in 2D-Zellkultur.

Die Zellen wurden subkonfluent geerntet. Die Genexpression wurde mittels RTqPCR untersucht. Es wurden 50 ng cDNA pro Probe eingesetzt. Als Housekeeping Gen kam 18S-RNA zum Einsatz. Die Quantifizierung erfolgte nach der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode. Statistische Auswertung: *Ordinary one-way ANOVA*, Mehrfachvergleich mit Tukey's Korrektur. Ns $p \geq 0,05$. N=2.

Um zu ausschließen, dass die verwendeten Knochenmarksstammzellen während Co-Kultivierung HNSCC-Zellen differenzierten, wurde in Abbildung 47 die relative Genexpression der Fibroblastenmarker α -SMA (links) und FSP-1 (rechts) bei drei-

dimensionaler Zellkultivierung untersucht. Die Expression an den mit TAF-assoziierten Genen FSP-1 zeigte sich in Mischsphäroiden, BMSCs und HNSCC-Zellen nicht signifikant unterschiedlich. Die α -SMA-Genexpression zeigte sich in Mischsphäroiden und HNSCC-Zellen signifikant niedriger als in BMCs. Es ist anzunehmen, dass die verwendeten BMSCs bei Kontakt mit HNSCC-Zellen in 3D-Zellkultur keinen TAF-Phänotypen annahmen.

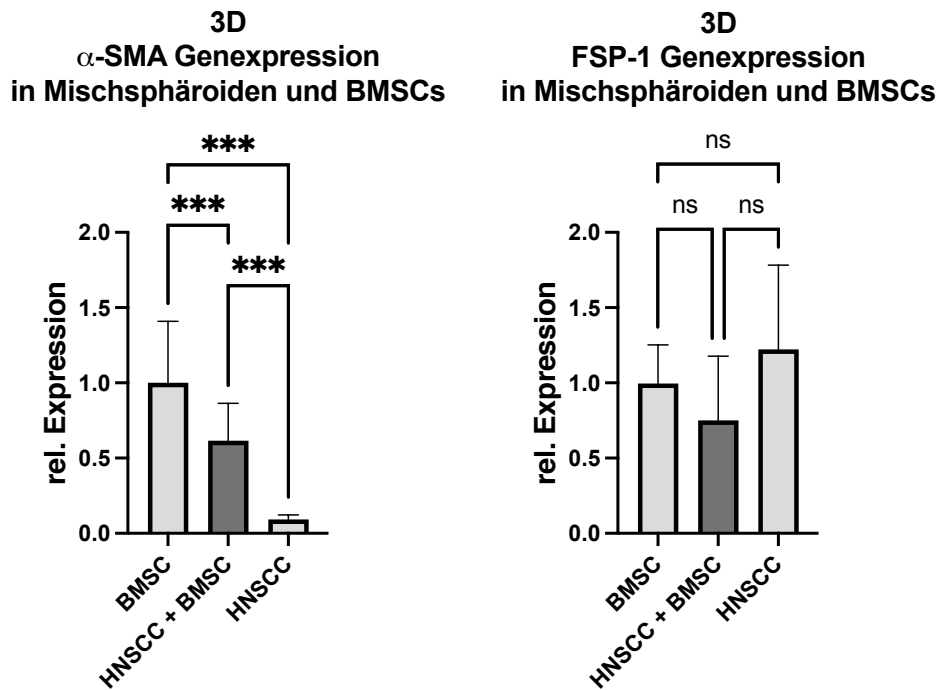


Abbildung 47: Relative Genexpression von Fibroblastenmarkern in Mischsphäroiden, BMSCs und HNSCC-Zellen aus 3D-Zellkultur.

Die Sphäroidgröße betrug 25.000 Zellen in Mischsphäroiden und 12.500 Zellen in BMSC- und HNSCC-Zell-Sphäroiden. Das Verhältnis von BMSCs zu HNSCC-Zellen in Mischsphäroiden betrug 1:1. Die Genexpression wurde mittels RTqPCR untersucht. Es wurde 50 ng cDNA eingesetzt. Als Housekeeping Gen kam 18S-RNA zum Einsatz. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte nach der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode. Statistische Auswertung: *Ordinary one-way ANOVA*, Mehrfachvergleich mit Tukey's Korrektur. Ns $p \geq 0,05$; *** $p < 0,001$. N=12.

Um die MMP-9 Promotoraktivität von BMSCs analog zu den verwendeten HNSCC-Zellen aus 3.1 mittels Dual-Luciferase-Assay untersuchen zu können wurde eine Transfektion von MMP-9 pDNA in BMSCs durchgeführt. Die Transfektion erfolgte in adhärennten BMSCs. Es wurden unterschiedliche Mengen an pDNA eingesetzt.

Es zeigte sich nach Transfektion von insgesamt 1250 ng pDNA eine signifikante MMP-9 Promotoraktivität in BMSCs im Vergleich zu unbehandelten BMSCs. Bei genauer Betrachtung der Renilla-Lumineszenz entsprach diese in transfizierten Zellen der nicht transfizierter Zellen. Es war somit von einer schlechten Lyse oder Transfektionseffizienz mit pDNA auszugehen.

Relative MMP-9 Promotoraktivität in BMSCs Renillalumineszenz in BMSCs

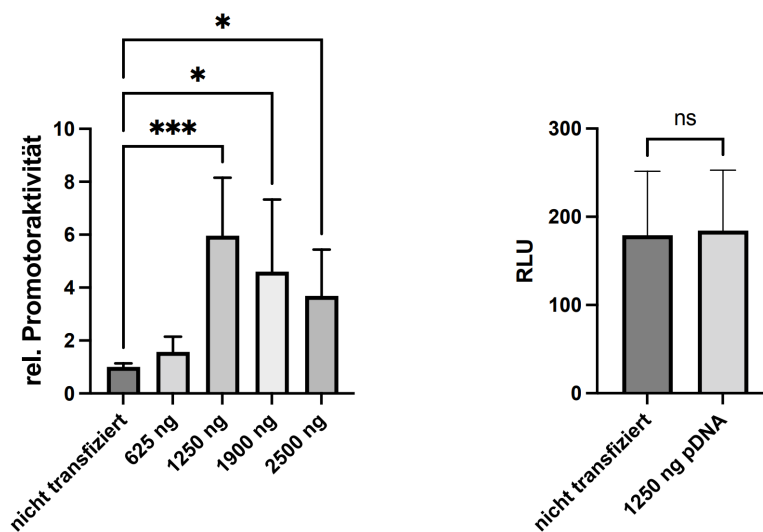
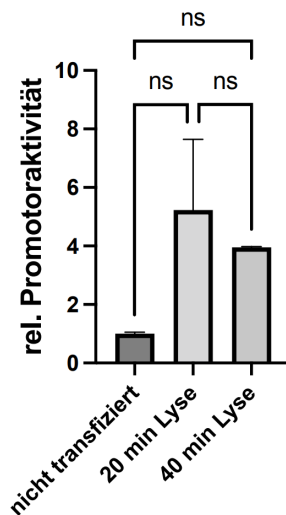


Abbildung 48: Transfektionseffizienz zur Ermittlung der MMP-9 Promotoraktivität von BMSCs.

Relative MMP-9 Promotoraktivität (links) und Renilla-Lumineszenz in RLU (rechts) in BMSCs nach Transfektion mit Nanocin-Transfektionsreagenz (Tecrea, London, Vereinigtes Königreich). Es wurden 50.000 Zellen pro Well einer 6-Well Platte ausgesät. Die Transfektion erfolgte nach Adhäsion der Zellen nach Nanocin-Protokoll. Die verwendete pDNA ist Tabelle 5 zu entnehmen. Lysiert wurde mittels passiver Lyse des Dual-Luciferase® Reporter Assays (Promega#) durchgeführt (20 min, 300 µl PLB/Probe, Einsatz von 100 µl/Messung). **Links:** Vergleich der normalisierten Firefly-Luciferase-Aktivität von nicht transfizierten und mit 625 ng, 1250 ng, 1900 ng und 2500 ng Plasmid-transfizierten Zellen. Normalisiert wurde die Firefly-Luciferase-Aktivität (F) auf die Renilla-Luciferase-Aktivität (R) (F/R). Dargestellt wird die relative (rel.) Promotoraktivität. **Rechts:** Vergleich der Renilla-Lumineszenz von nicht transfizierten Zellen (Inkubation von Transfektionsreagenz ohne Plasmid, Autolumineszenz) mit spez. Lumineszenz (Transfektion mit 1250 ng pDNA insgesamt). Dargestellt werden die Rohwerte in RLU. N=3. *Ordinary one-way ANOVA*, Mehrfachvergleich mit Tukey's Korrektur (links). *Unpaired t-test* (rechts). ns $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Um die Lyseeffizienz zu verbessern, wurde die passive Lysezeit auf 40 min erhöht. Eine Erhöhung der passiven Lysezeit von 20 min auf 40 min erbrachte keine höhere Renilla-Lumineszenz, wie aus Abbildung 49 zu entnehmen.

Relative MMP-9 Promotoraktivität in BMSCs nach 20 min und 40 min Lyse



Rennillalumineszenz in BMSCs nach 20 min und 40 min Lyse

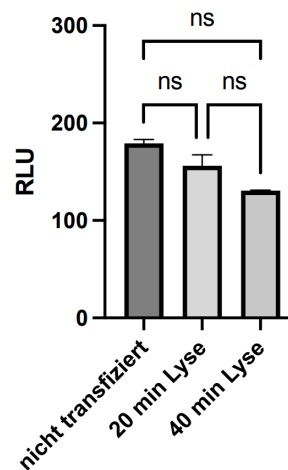


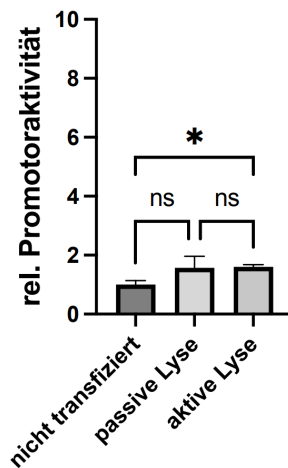
Abbildung 49: Transfektionseffizienz zur Ermittlung der MMP-9 Promotoraktivität von BMSCs nach Erhöhung der Lysezeit.

Relative MMP-9 Promotoraktivität (links) und Renilla-Lumineszenz gemessen in RLU in BMSCs nach Transfektion mit Nanocin-Transfektionsreagenz (Tecrea) nach 20 min und 40 min passiver Lyse. Die Transfektion erfolgte in adhärennten BMSCs. Es wurden 50.000 Zellen pro Well einer 6-Well Platte ausgesät. Die Transfektion erfolgte nach Adhäsion der Zellen nach Nanocin-Protokoll. Die verwendete pDNA ist Tabelle 5 zu entnehmen. Lysiert wurde mittels passiver Lyse des Dual-Luciferase® Reporter Assays (Promegadurchgeführt (20 min oder 40 min, 300 µl PLB/Probe, Einsatz von 100 µl/Messung).

Links: Vergleich der normalisierten Firefly-Luciferase-Aktivität von nicht transfizierten und mit 1250ng Plasmid-transfizierten Zellen nach 20 min und 40 min passiver Lyse. Normalisiert wurde die Firefly-Luciferase-Aktivität (F) auf die Renilla-Luciferase-Aktivität (R) (F/R). Dargestellt wird die relative (rel.) Promotoraktivität. **Rechts:** Vergleich der Renilla-Lumineszenz von nicht transfizierten Zellen (Inkubation von Transfektionsreagenz ohne Plasmid, Autolumineszenz) mit spez. Lumineszenz nach 20 min und 40 min passiver Lyse (Transfektion mit insgesamt 1250 ng pDNA). Dargestellt werden die Rohwerte in RLU. N=3. *Ordinary one-way* ANOVA, Mehrfachvergleich mit Tukey's Korrektur. Ns $p \geq 0,05$.

Um die Lyseeffizienz zu verbessern, wurde zusätzlich eine aktive Lyse durch zweimalige Behandlung der Zellen mit LN₂ eingesetzt. Abbildung 50 zeigt, dass auch der Einsatz von aktiver Lyse brachte keine Verbesserung der Renilla-Lumineszenz und relativen MMP-9 Promotoraktivität. Es ist davon auszugehen, dass die Transfektionseffizienz unzureichend war.

Relative MMP-9 Promotoraktivität in BMSCs nach aktiver und Passiver Lyse



Renillalumineszenz in BMSCs nach passiver und aktiver Lyse

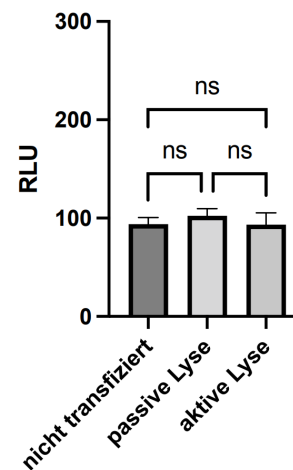


Abbildung 50: Transfektionseffizienz zur Ermittlung der MMP-9 Promotoraktivität von BMSCs mit aktiver Lyse.

Relative MMP-9 Promotoraktivität (links) und Renilla-Lumineszenz gemessen in RLU in BMSCs nach Transfektion mit Nanocin-Transfektionsreagenz (Tecrea) nach passiver und aktiver Lyse. Auch der Einsatz von aktiver Lyse Die Transfektion erfolgte in adhärennten BMSCs. Es wurden 50.000 Zellen pro Well einer 6-Well Platte ausgesät. Die Transfektion erfolgte nach Adhäsion der Zellen nach Nanocin-Protokoll. Die verwendete pDNA ist Tabelle 5 zu entnehmen. Lysiert wurde mittels passiver Lyse des Dual-Luciferase[®] Reporter Assays (Promega) durchgeführt (20 min, 300 µl PLB/Probe, Einsatz von 100 µl/Messung). Im Falle der aktiven Lyse wurde zusätzlich zur passiven Lyse eine zweimalige Behandlung der Zellen mit LN₂ durchgeführt. **Links:** Vergleich der normalisierten Firefly-Luciferase-Aktivität von nicht transfizierten und mit 1250ng Plasmid-transfizierten Zellen passiver und aktiver Lyse. Normalisiert wurde die Firefly-Luciferase-Aktivität (F) auf die Renilla-Luciferase-Aktivität (R) (F/R). Dargestellt wird die relative (rel.) Promotoraktivität. **Rechts:** Vergleich der Renilla-Lumineszenz von nicht transfizierten Zellen (Inkubation von Transfektionsreagenz ohne Plasmid, Autolumineszenz) mit spez. Lumineszenz nach passiver und aktiver Lyse (Transfektion mit insgesamt 1250 ng pDNA). Dargestellt werden die Rohwerte in RLU. N=3. *Ordinary one-way ANOVA*, Mehrfachvergleich mit Tukey's Korrektur. Ns p \geq 0,05; *p<0,05.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

-x	-fach
(B)MSC(s)	mesenchymale Stammzelle(n) (aus dem Knochenmark), engl.: (bone marrow-derived) human mesenchymal stem cell(s)
%	Prozent
°C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Akt	Proteinkinase B
ALP	alkalische Phosphatase
AP	Aktivator Protein
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure (engl.: bicinchoninic acid)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCL	CC-Chemokin Ligand
CD	Unterscheidungsgruppen, engl.: cluster of differentiation
CDKN	engl.: cyclin-dependent kinase inhibitor
cDNA	komplementäre DNA, engl.: complementary DNA
Cis	Carcinoma in situ
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomografie
Cu ²⁺	zweiwertiges Kupferion
CYP	Cytochrom
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	engl.: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl.: desoxyribonucleic acid
DOI	Infiltrationstiefe, engl.: depth of invasion
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EBV	Epstein-Barr Virus
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, engl.: epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ET-1	Endothelin-1
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor, engl.: Fibroblast Growth Factor
FKS/FBS	Fetales Kälberserum, engl.: Fetal Bovine Serum
FSP	Fibroblasten-spezifisches Protein

FSP	Fibroblasten spezifisches Protein
g	Gramm
GFP	grün floureszierendes Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HD	engl. hanging drop
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antien Dimer
HNSCC	Tumor des Kopf-, Halsbereich, engl.: head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papillomvirus
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IGF	engl.: Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
JLÜR	Jahres-Überlebensrate
k.A.	keine Angabe
KD	Knockdown
kDa	Kilodalton
l	Liter
LN ₂	Flüssiger Stickstoff, engl.: liquid nitrogen
m	männlich
mA	Milliampere
MACS	engl.: magnetic activated cell sorting
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	engl.: microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloprotease
MRT	Magnetresonanztomografie
MT-MMP	engl.: membrane-type MMP
NF-κB	engl.: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NNK	Nitrosaminketon aus Nikotin
NO	Stickstoffmonoxid
NOTCH	Neurogenic locus notch homolog
NT	Knockdown mit non-targeting siRNA
OD	Optische Dichte
OSCC	Orales Plattenepithelkarzinom, engl.: oral squamous cell carcinoma
P/S	Penicillin und Streptomycin
P53	Protein 53

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, engl.: phosphate buffered saline
pcDNA	Plasmid cDNA
PCI	Pittsburgh Cancer Institute
PD(L)-1	engl.: programmed cell death protein (ligand) -1
PDGF(R)	engl.: platlet-derived growth factor (receptor)
PDX	engl.: patient derived xenograft
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
pTNM	Pathologisch: Tumor, Nodus, Metastasen
RB1	Retinoblastomgen
rcf	relative Zentrifugalkraft, engl.: relative centrifugal force
RIPA Puffer	Radioimmunoprecipitation assay Puffer
RLU	Relative Lichteinheit, engl.: relative light unit
RNA	Ribonukleinsäure, engl.: ribonucleic acid
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl.: revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SDF	engl.: stromal cell-derived factor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH	Sulfhydrylgruppe
siRNA	engl.: small interfering RNA
SMA	engl.: Smooth muscle actin
STAT	engl.: Signal transducer and activator of transcription
STR	engl.: short tandem repeats
TAF	Tumor-assoziiertes Fibroblast
TAM	Tumor-assoziiertes Makrophage
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor, engl.: Transforming Growth Factor
TIMP	engl.: tissue inhibitor of metalloproteinases
TME	Tumor Mikroumgebung, engl.: tumor micro environment
TNF	Tumornekrosefaktor
UICC	franz.: Union international contre le cancer
VEGF	Endothelwachstumsfaktor, engl.: Vascular Endothelial Growth Factor
w	weiblich
ZO	Zonula occludens
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung möglicher Lokalisationen von HNSCCs.....	6
Abbildung 2:	Entwicklungsstadien des HNSCCs u. Mutationen während der Tumorprogression	8
Abbildung 3:	Weltweite Inzidenz von HNSCC im Jahr 2020.....	10
Abbildung 4:	Altersspezifische Neuerkrankungsrate an Tumoren der Mundhöhle und des Rachens unterteilt nach Geschlecht.	11
Abbildung 5:	Exophytisch wachsendes Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und maligne entartete Leukoplakie des Zungenrandes	12
Abbildung 6:	Zusammensetzung des Tumorgewebes.	15
Abbildung 7:	Differenzierung von MSCs.	16
Abbildung 8:	Geeignete Gewebe zur Isolation von MSCs.	17
Abbildung 9:	Einfluss von MSCs auf die Tumorprogression und -suppression von HNSCCs....	19
Abbildung 10:	Interaktion von MSCs mit Tumorzellen im Rahmen der Tumorprogression.	22
Abbildung 11:	Immunsuppressiver Einfluss von MSCs auf die Immunantwort in Tumoren.....	24
Abbildung 12:	Übersicht bekannter MMPs.	28
Abbildung 13:	Schematische Darstellung der Struktur von MMPs am Beispiel der Gelatinasen	29
Abbildung 14:	Schematischer Ablauf der MMP-Synthese.....	30
Abbildung 15:	Schematische Darstellung der 3D-Zellkultivierung.....	45
Abbildung 16:	Schematischer Plasmid-Aufbau des MMP-9- und Co-Vektors (245).....	50
Abbildung 17:	Ablaufende chemische Reaktionen der Firefly- und Renilla-Luciferase	51
Abbildung 18:	Schematische Darstellung des Luciferaseassays.....	52
Abbildung 19:	Chemische Reaktionen des BCA Assay zur Proteinquantifizierung.....	54
Abbildung 20:	Exemplarisches mit Coomassie-Blau gefärbetes Zymographie-Gel.	58
Abbildung 21:	Densitometrische Analyse der Zymographie.	59
Abbildung 22:	Formel zur Berechnung der relativen Flächenänderung auf Matrigel®.	60
Abbildung 23:	Beispielhafte Ausmessung von Flächen mittels Polygon-Auswahl.	61
Abbildung 25:	Einfluss der Zellzahl auf Renilla Luciferase-Signalzunahme in 2D- und 3D	65
Abbildung 26:	Optimierung der 3D-Zelllyse durch zusätzliche Anwendung von aktiver Lyse.....	66
Abbildung 27:	Lyseeffizienz in 3D-Zellkultur nach Einsatz von Ultraschallwellen.	67
Abbildung 28:	Relative MMP-9 Promotoraktivität in HNSCC-Zellen aus 2D und 3D.	68
Abbildung 29:	Änderung der MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen bei Co-Kultivierung mit BMSCs, 2D-Zellkultur.....	69
Abbildung 30:	Änderung der MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen bei Co-Kultivierung mit BMSCs, 3D-Zellkultur.....	70
Abbildung 31:	MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen in Abhängigkeit von Konfluenz und dem Verhältnis von BMSCs zu HNSCC-Zellen, 2D-Zellkultur.....	72
Abbildung 32:	MMP-9 Promotoraktivität von HNSCC-Zellen in Abhängigkeit von Sphäroidgröße und dem Verhältnis von BMSCs zu HNSCC-Zellen, 3D-Kultur.	73
Abbildung 33:	Ermittlung der MMP-9 Proteinexpression, -sekretion und Aktivität in HNSCC-Zellen und/oder BMSCs mittels Zymographie im Überstand.....	76
Abbildung 34:	Nachweis der MMP-9 Aktivität in Mischsphäroiden nach MMP-9 siRNA KD in BMSCs bzw. HNSCC-Zellen mittels Zymographie.	78

Abbildung 35: Quantifizierung der im Zymogramm detektierten MMP-9 Aktivität in Mischsphäroiden nach MMP-9 KD.....	79
Abbildung 36: Nachweis und semiquantitative Analyse der MMP-9 Aktivität in Mischsphäroiden nach Runx2 siRNA KD in HNSCC-Zellen mittels Zymographie.....	81
Abbildung 37: Ausbreitungsverhalten von HNSCC-Zellen in Abhängigkeit von BMSCs.....	83
Abbildung 38: Quantifizierung der Flächenänderung im Spreadingassay.....	84
Abbildung 39: Zellmorphologien im Spreadingassay.....	85
Abbildung 40: Ausbreitungsfähigkeit in Abhängigkeit von Zellzahl und Mischungsverhältnis aus HNSCCs mit BMSCs.....	87
Abbildung 41: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Mischsphäroiden nach Inhibition der ALP-Aktivität durch Levamisol im Spreadingassay.....	89
Abbildung 42: Quantifizierung der Flächenausbreitung von Mischsphäroiden nach Inhibition der ALP-Aktivität durch Levamisol.....	90
Abbildung 43: Anzahl an Veröffentlichungen zu 3D-Tumormodellen.....	95
Abbildung 44: Erzeugte Effekte bei der 3D-Tumorsphäroid Generierung.....	96
Abbildung 45: Zellfusion von HNSCC und hMSC nach Co-Kultivierung.....	118
Abbildung 46: Relative Genexpression von Fibroblastenmarkern in BMSCs in 2D-Zellkultur....	125
Abbildung 47: Relative Genexpression von Fibroblastenmarkern in Mischsphäroiden, BMSCs und HNSCC-Zellen aus 3D-Zellkultur.....	126
Abbildung 48: Transfektionseffizienz zur Ermittlung der MMP-9 Promotoraktivität v. BMSCs.	127
Abbildung 49: Transfektionseffizienz zur Ermittlung der MMP-9 Promotoraktivität v. BMSCs nach Erhöhung der Lysezeit.....	128
Abbildung 50: Transfektionseffizienz zur Ermittlung der MMP-9 Promotoraktivität v. BMSCs mit aktiver Lyse.....	129

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HNSCC-Zellen.....	36
Tabelle 2: BMSCs.....	37
Tabelle 3: Reagenzien zur Zellkultivierung.....	38
Tabelle 4: siRNA-Transfektionsreagenzien	39
Tabelle 5: Plasmid-Transfektionsreagenzien	39
Tabelle 6: Reagenzien zur Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung.....	40
Tabelle 7: Reagenzien zur Zymographie	40
Tabelle 8: Reagenzien zur Plattenbeschichtung.....	41
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien	41
Tabelle 10: Geräte	42
Tabelle 11: Software	43
Tabelle 12: HNSCC-Zell-Medium zur 2D-Zellkultivierung.....	44
Tabelle 13: BMSCs/Co-Kultivierungs-Medium zur 2D-Zellkultivierung.....	44
Tabelle 14: Zusammensetzung des HD-Mediums zur 3D-Kultivierung	46
Tabelle 15: Zusammensetzung des HD-Mediums ohne Serum zur Ernte des Überstands.....	46
Tabelle 16: MMP-9c-Plasmid	47
Tabelle 17: Plasmid-Transfektion	48
Tabelle 18: siRNA Transfektion in HNSCC-Zellen.....	48
Tabelle 19: siRNA Transfektion in BMSCs	49
Tabelle 20: 10 % Acrylamidgel der Zymographie, 1 mm Dicke.....	55
Tabelle 21: 4,5 % Acrylamidgel der Zymographie, 1 mm Dicke.....	56
Tabelle 22: Zymographie-Ladepuffer, 5x.....	56
Tabelle 23: 10x SDS-Laufpuffer	56
Tabelle 24: Zymographie-Renaturierungspuffer.....	57
Tabelle 25: Zymographie-Verdaupuffer	57
Tabelle 26: Zymographie-Färbelösung.....	57
Tabelle 27: Zymographie-Entfäber I	57
Tabelle 28: Zymographie-Entfäber II	57
Tabelle 29: Zymographie-Entwässerungslösung.....	58
Tabelle 30: Beschichtung von Matrigel® mit Levamisol.....	61

6.5 Literaturverzeichnis

1. BW S, CP W. World Cancer Report 2014 [Internet]. [zitiert 12. Juli 2020]. Verfügbar unter: <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>
2. Koch-Institut R. Krebs in Deutschland | 2015/2016. :160.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, u. a. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
4. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primer.* 26. November 2020;6(1):1–22.
5. Galland S, Stamenkovic I. Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *J Pathol.* 2020;250(5):555–72.
6. Mondal S, Adhikari N, Banerjee S, Amin SA, Jha T. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *Eur J Med Chem.* Mai 2020;194:112260.
7. RIVERA C, VENEGAS B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett.* Juli 2014;8(1):7–11.
8. Organization WH, Cancer IA for R on. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC; 2005. 440 S.
9. Maulina T, Iskandarsyah A, Hardianto A, Sjamsudin E, Nandini M, Kasim A, u. a. The incidence of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its relationship with orofacial pain in oral cancer patients in West Java Province, Indonesia. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol.* 1. Januar 2017;29(1):29–32.
10. Marron M, Boffetta P, Zhang ZF, Zaridze D, Wünsch-Filho V, Winn DM, u. a. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol.* 1. Februar 2010;39(1):182–96.
11. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, u. a. Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. *Cancer Res.* 1. Juni 1988;48(11):3282–7.
12. Michaud DS, Langevin SM, Eliot M, Nelson HH, Pawlita M, McClean MD, u. a. High-risk HPV types and head and neck cancer. *Int J Cancer J Int Cancer.* 1. Oktober 2014;135(7):1653–61.
13. Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human Papillomavirus and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Recent Evidence and Clinical Implications. *J Dent Res.* 1. April 2009;88(4):300–6.
14. Chan KCA, Woo JKS, King A, Zee BCY, Lam WKJ, Chan SL, u. a. Analysis of Plasma Epstein–Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer. *N Engl J Med.* 10. August 2017;377(6):513–22.
15. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol.* 10. Oktober 2015;33(29):3235–42.
16. Rautava J, Syrjänen S. Biology of Human Papillomavirus Infections in Head and Neck Carcinogenesis. *Head Neck Pathol.* 1. Juli 2012;6(1):3–15.
17. Su CC, Yang HF, Huang SJ, Lian IB. Distinctive Features of Oral Cancer in Changhua County: High Incidence, Buccal Mucosa Preponderance, and a Close Relation to Betel Quid Chewing Habit. *J Formos Med Assoc.* 1. Januar 2007;106(3):225–33.
18. Ko YC, Huang YL, Lee CH, Chen MJ, Lin LM, Tsai CC. Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med*

- Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol. November 1995;24(10):450–3.
19. Thavarajah R, Rao A, Raman U, Rajasekaran ST, Joshua E, R. H, u. a. Oral lesions of 500 habitual psychoactive substance users in Chennai, India. *Arch Oral Biol.* 1. Juni 2006;51(6):512–9.
 20. Zhang LW, Li J, Cong X, Hu XS, Li D, Wu LL, u. a. Incidence and mortality trends in oral and oropharyngeal cancers in China, 2005–2013. *Cancer Epidemiol.* 1. Dezember 2018;57:120–6.
 21. Guha N, Boffetta P, Wunsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, u. a. Oral Health and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck and Esophagus: Results of Two Multicentric Case-Control Studies. *Am J Epidemiol.* 15. November 2007;166(10):1159–73.
 22. Velleuer E, Dietrich R. Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma. *Mol Cell Pediatr.* 1. November 2014;1(1):9.
 23. Powell SF, Vu L, Spanos WC, Pyeon D. The Key Differences between Human Papillomavirus-Positive and -Negative Head and Neck Cancers: Biological and Clinical Implications. *Cancers.* Januar 2021;13(20):5206.
 24. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 29. Januar 2015;517(7536):576–82.
 25. Haddad RI, Shin DM. Recent Advances in Head and Neck Cancer [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0707975>. Massachusetts Medical Society; 2009 [zitiert 15. Juli 2021]. Verfügbar unter: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra0707975>
 26. Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, u. a. Tumor Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Semin Oncol.* 1. April 2014;41(2):217–34.
 27. Ha PK, Chang SS, Glazer CA, Califano JA, Sidransky D. Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 1. April 2009;45(4):335–9.
 28. Califano J, Riet P van der, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, u. a. Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. *Cancer Res.* 1. Juni 1996;56(11):2488–92.
 29. Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA N Y N.* Januar 2019;25(1):1–16.
 30. Doukas SG, Vageli DP, Lazopoulos G, Spandidos DA, Sasaki CT, Tsatsakis A. The Effect of NNK, A Tobacco Smoke Carcinogen, on the miRNA and Mismatch DNA Repair Expression Profiles in Lung and Head and Neck Squamous Cancer Cells. *Cells.* 21. April 2020;9(4):1031.
 31. Peng HY, Hsiao JR, Chou ST, Hsu YM, Wu GH, Shieh YS, u. a. MiR-944/CISH mediated inflammation via STAT3 is involved in oral cancer malignance by cigarette smoking. *Neoplasia N Y N.* November 2020;22(11):554–65.
 32. Khariwala SS, Ma B, Ruszczak C, Carmella SG, Lindgren B, Hatsukami DK, u. a. High Level of Tobacco Carcinogen–Derived DNA Damage in Oral Cells Is an Independent Predictor of Oral/Head and Neck Cancer Risk in Smokers. *Cancer Prev Res Phila Pa.* September 2017;10(9):507–13.
 33. Li YC, Cheng AJ, Lee LY, Huang YC, Chang JTC. Multifaceted Mechanisms of Areca Nuts in Oral Carcinogenesis: the Molecular Pathology from Precancerous Condition to Malignant Transformation. *J Cancer.* 8. Juli 2019;10(17):4054–62.
 34. Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe.* 12. März 2014;15(3):266–82.
 35. Parfenov M, Pedamallu CS, Gehlenborg N, Freeman SS, Danilova L, Bristow CA, u. a. Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers.

- Proc Natl Acad Sci U S A. 28. Oktober 2014;111(43):15544–9.
36. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. August 2010;10(8):550–60.
 37. Ren S, Gaykalova DA, Guo T, Favorov AV, Fertig EJ, Tamayo P, u. a. HPV E2, E4, E5 drive alternative carcinogenic pathways in HPV positive cancers. *Oncogene*. Oktober 2020;39(40):6327–39.
 38. Pyeon D, Newton MA, Lambert PF, Boon JA den, Sengupta S, Marsit CJ, u. a. Fundamental Differences in Cell Cycle Deregulation in Human Papillomavirus–Positive and Human Papillomavirus–Negative Head/Neck and Cervical Cancers. *Cancer Res*. 15. Mai 2007;67(10):4605–19.
 39. Siddiqui IA, Farooq MU, Siddiqui RA, Rafi SMT. Role of Toluidine Blue in Early Detection of Oral Cancer. *Pak J Med Sci*. 2006;22(2):184–7.
 40. Gatta G, Botta L, Sánchez MJ, Anderson LA, Pierannunzio D, Licitra L, u. a. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EUROCARE-5 population-based study. *Eur J Cancer*. 1. Oktober 2015;51(15):2130–43.
 41. Linsen SS, Gellrich NC, Krüskemper G. Age- and localization-dependent functional and psychosocial impairments and health related quality of life six months after OSCC therapy. *Oral Oncol*. 1. Juni 2018;81:61–8.
 42. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Herausgeber. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 2021;(13). Verfügbar unter: <https://edoc.rki.de/handle/176904/9042>
 43. Cancer Today [Internet]. 2020 [zitiert 18. Januar 2022]. Verfügbar unter: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=5_14_1_4_3&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=0%255B10%252C0%255D
 44. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018 [Internet]. SEER. [zitiert 9. Juli 2021]. Verfügbar unter: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/index.html
 45. Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T, u. a. Increasing Incidence of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma in Young White Women, Age 18 to 44 Years. *J Clin Oncol*. 7. März 2011;29(11):1488–94.
 46. Mourad M, Jetmore T, Jategaonkar AA, Moubayed S, Moshier E, Urken ML. Epidemiological Trends of Head and Neck Cancer in the United States: A SEER Population Study. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. Dezember 2017;75(12):2562–72.
 47. Windon MJ, D’Souza G, Rettig EM, Westra WH, Zante A van, Wang SJ, u. a. Increasing prevalence of human papillomavirus–positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer*. 2018;124(14):2993–9.
 48. Honorato J, Rebelo MS, Dias FL, Camisasca DR, Faria PA, Azevedo e Silva G, u. a. Gender differences in prognostic factors for oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1. Oktober 2015;44(10):1205–11.
 49. Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primer*. 26. November 2020;6(1):1–22.
 50. Warnakulasuriya S, Johnson NW, Waal IVD. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(10):575–80.
 51. Markopoulos AK. Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. *Open Dent J*. 10.

- August 2012;6:126–30.
52. Scott SE, Grunfeld EA, Main J, McGurk M. Patient delay in oral cancer: a qualitative study of patients' experiences. *Psychooncology*. 2006;15(6):474–85.
 53. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. Januar 2011;11(1):9–22.
 54. Jong RJB de, Hermans J, Molenaar J, Briaire JJ, Cessie S le. Prediction of survival in patients with head and neck cancer. *Head Neck*. 2001;23(9):718–24.
 55. Alsahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, u. a. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis*. 15. Juli 2019;10(8):1–17.
 56. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *The Lancet*. 17. Mai 2008;371(9625):1695–709.
 57. Chandolia B, Basu SK, Kumar M. Can MMP-9 be a Prognosticator Marker for Oral Squamous Cell Carcinoma? *J Clin Diagn Res JCDR*. Januar 2016;10(1):ZC09-ZC13.
 58. Eckert AW, Lautner MHW, Dempf R, Schubert J, Bilkenroth U. Prognostische Aussagen zum Mundhöhlenkarzinom. *Chir*. Februar 2009;80(2):138–43.
 59. Pulte D, Brenner H. Changes in Survival in Head and Neck Cancers in the Late 20th and Early 21st Century: A Period Analysis. *The Oncologist*. September 2010;15(9):994–1001.
 60. Cheng G, Dong H, Yang C, Liu Y, Wu Y, Zhu L, u. a. A review on the advances and challenges of immunotherapy for head and neck cancer. *Cancer Cell Int*. 31. Juli 2021;21(1):406.
 61. Stafford M, Kaczmar J. The neoadjuvant paradigm reinvigorated: a review of pre-surgical immunotherapy in HNSCC. *Cancers Head Neck*. 16. März 2020;5:4.
 62. Saâda-Bouزيد E, Defaucheux C, Karabajakian A, Coloma VP, Servois V, Paoletti X, u. a. Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol*. 1. Juli 2017;28(7):1605–11.
 63. Chow LQM. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 2. Januar 2020;382(1):60–72.
 64. Brana I, Siu LL. Locally advanced head and neck squamous cell cancer: treatment choice based on risk factors and optimizing drug prescription. *Ann Oncol*. 1. September 2012;23:x178–85.
 65. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, u. a. Improved Survival of Patients With Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Prospective Clinical Trial. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 20. Februar 2008;100(4):261–9.
 66. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, u. a. Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 10. November 2011;29(32):4294–301.
 67. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. Oktober 2001;1(1):46–54.
 68. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes — bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. November 2004;4(11):839–49.
 69. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4. März 2011;144(5):646–74.
 70. Cornelissen AS, Majtenburg MW, Nolte MA, Voermans C. Organ-specific migration of mesenchymal stromal cells: Who, when, where and why? *Immunol Lett*. 1. Dezember 2015;168(2):159–69.
 71. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, u. a. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International*

- Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 1. Januar 2006;8(4):315–7.
72. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, u. a. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 2. April 1999;284(5411):143–7.
 73. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. März 1968;6(2):230–47.
 74. Atiya H, Frisbie L, Pressimone C, Coffman L. Mesenchymal Stem Cells in the Tumor Microenvironment. In: Birbrair A, Herausgeber. *Tumor Microenvironment: Non-Hematopoietic Cells* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. S. 31–42. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-030-37184-5_3
 75. Ugarte DAD, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, u. a. Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174(3):101–9.
 76. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, u. a. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*. 01 2001;264(1):51–62.
 77. Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 15. Oktober 2001;98(8):2396–402.
 78. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, u. a. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2000;2(6):477–88.
 79. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*. 2004;6(6):543–53.
 80. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. April 2000;109(1):235–42.
 81. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. 1. August 2002;30(8):896–904.
 82. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5. Dezember 2000;97(25):13625–30.
 83. Dzobo K. Recent Trends in Multipotent Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Learning from History and Advancing Clinical Applications. *OMICS J Integr Biol*. 1. Juni 2021;25(6):342–57.
 84. Anthony DF, Shiels PG. Exploiting paracrine mechanisms of tissue regeneration to repair damaged organs. *Transplant Res*. 20. Juni 2013;2:10.
 85. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. September 2008;8(9):726–36.
 86. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 15. April 2009;106(6):984–91.
 87. Chitteti BR, Cheng YH, Poteat B, Rodriguez-Rodriguez S, Goebel WS, Carlesso N, u. a. Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function. *Blood*. 22. April 2010;115(16):3239–48.
 88. Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, u. a. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress

- T-cell activation. *Bone Marrow Transplant*. März 2004;33(6):597–604.
89. Granéli C, Thorfve A, Ruetschi U, Brisby H, Thomsen P, Lindahl A, u. a. Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem Cell Res*. 1. Januar 2014;12(1):153–65.
 90. Mansilla E, Marín GH, Drago H, Sturla F, Salas E, Gardiner C, u. a. Bloodstream Cells Phenotypically Identical to Human Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells Circulate in Large Amounts Under the Influence of Acute Large Skin Damage: New Evidence for Their Use in Regenerative Medicine. *Transplant Proc*. 1. April 2006;38(3):967–9.
 91. Ramírez M, Lucia A, Gómez-Gallego F, Esteve-Lanao J, Pérez-Martínez A, Foster C, u. a. Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury. *Br J Sports Med*. 1. August 2006;40(8):719–22.
 92. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, Hérault O, Bonnet P, Charbord P, u. a. Multipotential Mesenchymal Stem Cells Are Mobilized into Peripheral Blood by Hypoxia. *STEM CELLS*. 2006;24(10):2202–8.
 93. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, u. a. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8. Juli 2003;100(14):8407–11.
 94. Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, u. a. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*. 15. Juli 2005;106(2):756–63.
 95. Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SSW. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2004;22(3):415–27.
 96. Wu GD, Nolta JA, Jin YS, Barr ML, Yu H, Starnes VA, u. a. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation*. 15. März 2003;75(5):679–85.
 97. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, u. a. Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. Blagosklonny MV, Herausgeber. *PLoS ONE*. 7. April 2009;4(4):e4992.
 98. Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, Frommhold D, Apel A, Mattern J, u. a. VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer*. 19. August 2008;99(4):622–31.
 99. Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlinchon S, Boissière F, Laune D, u. a. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res*. 29. Januar 2007;9(1):R15.
 100. Boissière-Michot F, Lazenec G, Frugier H, Jarlier M, Roca L, Duffour J, u. a. Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-unstable colorectal cancer. *OncoImmunology*. 1. Juni 2014;3(6):e29256.
 101. Klopp Ann H., Gupta Anshul, Spaeth Erika, Andreeff Michael, Marini Frank. Concise Review: Dissecting a Discrepancy in the Literature: Do Mesenchymal Stem Cells Support or Suppress Tumor Growth? *STEM CELLS*. 28. Januar 2011;29(1):11–9.
 102. Stappenbeck TS, Miyoshi H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science*. 26. Juni 2009;324(5935):1666–9.
 103. Hutchinson L, Stenstrom B, Chen D, Piperdi B, Levey S, Lyle S, u. a. Human Barrett's Adenocarcinoma of the Esophagus, Associated Myofibroblasts, and Endothelium Can Arise from Bone Marrow-Derived Cells After Allogeneic Stem Cell Transplant. *Stem Cells Dev*. Januar 2011;20(1):11–7.

104. Liotta F, Querci V, Mannelli G, Santarlaschi V, Maggi L, Capone M, u. a. Mesenchymal stem cells are enriched in head neck squamous cell carcinoma, correlates with tumour size and inhibit T-cell proliferation. *Br J Cancer*. 17. Februar 2015;112(4):745–54.
105. De Boeck A, Narine K, De Neve W, Mareel M, Bracke M, De Wever O. Resident and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 1. Mai 2010;46(5):336–42.
106. Li HC, Stoicov C, Rogers AB, Houghton J. Stem cells and cancer: Evidence for bone marrow stem cells in epithelial cancers. *World J Gastroenterol WJG*. 21. Januar 2006;12(3):363–71.
107. Li L, Tian H, Yue W, Zhu F, Li S, Li W. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*. 2011;226(7):1860–7.
108. Liu C, Feng X, Wang B, Wang X, Wang C, Yu M, u. a. Bone marrow mesenchymal stem cells promote head and neck cancer progression through Periostin-mediated phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin. *Cancer Sci*. März 2018;109(3):688–98.
109. Wang J, Yang W, Wang T, Chen X, Wang J, Zhang X, u. a. Mesenchymal Stromal Cells-Derived β 2-Microglobulin Promotes Epithelial–Mesenchymal Transition of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. *Sci Rep*. 3. April 2018;8(1):5422.
110. Rowan BG, Lacayo EA, Sheng M, Anbalagan M, Gimble JM, Jones RK, u. a. Human Adipose Tissue-Derived Stromal/Stem Cells Promote Migration and Early Metastasis of Head and Neck Cancer Xenografts. *Aesthet Surg J*. 1. Januar 2016;36(1):93–104.
111. Wu YL, Li HY, Zhao XP, Jiao JY, Tang DX, Yan LJ, u. a. Mesenchymal stem cell-derived CCN2 promotes the proliferation, migration and invasion of human tongue squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci*. 2017;108(5):897–909.
112. Hong D, Liu T, Huang W, Liao Y, Wang L, Zhang Z, u. a. Gremlin1 Delivered by Mesenchymal Stromal Cells Promoted Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(5):1785–99.
113. Shi S, Zhang Q, Xia Y, You B, Shan Y, Bao L, u. a. Mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitate nasopharyngeal carcinoma progression. *Am J Cancer Res*. 15. Januar 2016;6(2):459–72.
114. Chen Y, Wang X, Fang J, Song J, Ma D, Luo L, u. a. Mesenchymal stem cells participate in oral mucosa carcinogenesis by regulating T cell proliferation. *Clin Immunol*. 1. Januar 2019;198:46–53.
115. Liu C, Billet S, Choudhury D, Cheng R, Haldar S, Fernandez A, u. a. Bone marrow mesenchymal stem cells interact with head and neck squamous cell carcinoma cells to promote cancer progression and drug resistance. *Neoplasia*. 1. Januar 2021;23(1):118–28.
116. Kansy BA, Dißmann PA, Hemeda H, Bruderek K, Westerkamp AM, Jagalski V, u. a. The bidirectional tumor - mesenchymal stromal cell interaction promotes the progression of head and neck cancer. *Stem Cell Res Ther*. 12. August 2014;5(4):95.
117. Zielske SP, Livant DL, Lawrence TS. Radiation Increases Invasion of Gene-modified Mesenchymal Stem Cells into Tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1. November 2009;75(3):843–53.
118. Tan TT, Lai RC, Padmanabhan J, Sim WK, Choo ABH, Lim SK. Assessment of Tumorigenic Potential in Mesenchymal-Stem/Stromal-Cell-Derived Small Extracellular Vesicles (MSC-sEV). *Pharmaceuticals*. April 2021;14(4):345.
119. Bruna F, Plaza A, Arango M, Espinoza I, Conget P. Systemically administered allogeneic mesenchymal stem cells do not aggravate the progression of precancerous lesions: a new biosafety insight. *Stem Cell Res Ther*. 11. Mai 2018;9(1):137.
120. Bruna F, Arango-Rodríguez M, Plaza A, Espinoza I, Conget P. The administration of

- multipotent stromal cells at precancerous stage precludes tumor growth and epithelial dedifferentiation of oral squamous cell carcinoma. *Stem Cell Res.* 1. Januar 2017;18:5–13.
121. Wang Y, Fan H, Zhou B, Ju Z, Yu L, Guo L, u. a. Fusion of human umbilical cord mesenchymal stem cells with esophageal carcinoma cells inhibits the tumorigenicity of esophageal carcinoma cells. *Int J Oncol.* 1. Februar 2012;40(2):370–7.
 122. Ji X, Zhang Z, Han Y, Song J, Xu X, Jin J, u. a. Mesenchymal stem cells derived from normal gingival tissue inhibit the proliferation of oral cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 1. November 2016;49(5):2011–22.
 123. Rajantie I, Ilmonen M, Alminaitte A, Ozerdem U, Alitalo K, Salven P. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood.* 1. Oktober 2004;104(7):2084–6.
 124. Bexell D, Gunnarsson S, Tormin A, Darabi A, Gisselsson D, Roybon L, u. a. Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stroma Cells Act as Pericyte-like Migratory Vehicles in Experimental Gliomas. *Mol Ther.* 1. Januar 2009;17(1):183–90.
 125. Huang WH, Chang MC, Tsai KS, Hung MC, Chen HL, Hung SC. Mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of tumors in mice. *Oncogene.* September 2013;32(37):4343–54.
 126. Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, Pujol JP, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, u. a. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone.* 1. April 2007;40(4):1078–87.
 127. Wang HH, Cui YL, Zaorsky NG, Lan J, Deng L, Zeng XL, u. a. Mesenchymal stem cells generate pericytes to promote tumor recurrence via vasculogenesis after stereotactic body radiation therapy. *Cancer Lett.* 1. Juni 2016;375(2):349–59.
 128. Birnbaum T, Roeder J, Schankin CJ, Padovan CS, Schichor C, Goldbrunner R, u. a. Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *J Neurooncol.* 1. Juli 2007;83(3):241–7.
 129. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, u. a. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* Oktober 2007;449(7162):557–63.
 130. Xu W ting, Bian Z yu, Fan Q ming, Li G, Tang T ting. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett.* 18. August 2009;281(1):32–41.
 131. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, u. a. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer.* 15. November 2010;127(10):2323–33.
 132. Tsukamoto S, Honoki K, Fujii H, Tohma Y, Kido A, Mori T, u. a. Mesenchymal stem cells promote tumor engraftment and metastatic colonization in rat osteosarcoma model. *Int J Oncol.* 1. Januar 2012;40(1):163–9.
 133. Halpern JL, Kilbarger A, Lynch CC. Mesenchymal stem cells promote mammary cancer cell migration in vitro via the CXCR2 receptor. *Cancer Lett.* 1. September 2011;308(1):91–9.
 134. Escobar P, Bouclier C, Serret J, Bièche I, Brigitte M, Caicedo A, u. a. IL-1 β produced by aggressive breast cancer cells is one of the factors that dictate their interactions with mesenchymal stem cells through chemokine production. *Oncotarget.* 4. August 2015;6(30):29034–47.
 135. Luo J, Ok Lee S, Liang L, Huang CK, Li L, Wen S, u. a. Infiltrating bone marrow mesenchymal stem cells increase prostate cancer stem cell population and metastatic ability via secreting cytokines to suppress androgen receptor signaling. *Oncogene.* Mai 2014;33(21):2768–78.

136. Makinoshima H, Dezawa M. Pancreatic cancer cells activate CCL5 expression in mesenchymal stromal cells through the insulin-like growth factor-I pathway. *FEBS Lett.* 19. November 2009;583(22):3697–703.
137. Coffelt SB, Marini FC, Watson K, Zwezdaryk KJ, Dembinski JL, LaMarca HL, u. a. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proc Natl Acad Sci.* 10. März 2009;106(10):3806–11.
138. Mi Z, Bhattacharya SD, Kim VM, Guo H, Talbot LJ, Kuo PC. Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis. *Carcinogenesis.* 1. April 2011;32(4):477–87.
139. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* April 2009;9(4):265–73.
140. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, u. a. Epithelial–mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci.* 2010;101(2):293–9.
141. Grünert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* August 2003;4(8):657–65.
142. Jechlinger M, Grunert S, Tamir IH, Janda E, Lüdemann S, Waerner T, u. a. Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene.* Oktober 2003;22(46):7155–69.
143. Martin FT, Dwyer RM, Kelly J, Khan S, Murphy JM, Curran C, u. a. Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Res Treat.* 1. November 2010;124(2):317–26.
144. Xue Z, Wu X, Chen X, Liu Y, Wang X, Wu K, u. a. Mesenchymal Stem Cells Promote Epithelial to Mesenchymal Transition and Metastasis in Gastric Cancer Through Paracrine Cues and Close Physical Contact. *J Cell Biochem.* 2015;116(4):618–27.
145. Shi Y, Du L, Lin L, Wang Y. Tumour-associated mesenchymal stem/stromal cells: emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* Januar 2017;16(1):35–52.
146. Sappino AP, Skalli O, Jackson B, Schürch W, Gabbiani G. Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int J Cancer.* 15. Mai 1988;41(5):707–12.
147. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SSW, Takashi S, u. a. Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth. *Cancer Cell.* 15. Februar 2011;19(2):257–72.
148. Jotzu C, Alt E, Welte G, Li J, Hennessy BT, Devarajan E, u. a. Adipose tissue derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor derived factors. *Cell Oncol.* 1. Februar 2011;34(1):55–67.
149. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, u. a. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* 6. Mai 2005;121(3):335–48.
150. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, u. a. Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments using In Vivo Bioluminescence Imaging. *Stem Cells Dayt Ohio.* Oktober 2009;27(10):2614–23.
151. Gonzalez ME, Martin E, Anwar T, Arellano-Garcia C, Medhora N, Lama A, u. a. Mesenchymal stem cell induced DDR2 mediates stromal-breast cancer interactions and metastasis growth. *Cell Rep.* 31. Januar 2017;18(5):1215–28.
152. Hill BS, Pelagalli A, Passaro N, Zannetti A. Tumor-educated mesenchymal stem cells

- promote pro-metastatic phenotype. *Oncotarget*. 14. August 2017;8(42):73296–311.
153. Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, Molens JP, Bensa JC, Favrot MC. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia*. September 2005;19(9):1597–604.
 154. Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood*. 1. September 2006;108(5):1435–40.
 155. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, u. a. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 1. Januar 2006;107(1):367–72.
 156. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. Januar 2006;24(1):74–85.
 157. Bassi ÈJ, Aita CAM, Câmara NOS. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells*. 26. Januar 2011;3(1):1–8.
 158. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677–704.
 159. Rivera-Cruz CM, Shearer JJ, Figueiredo Neto M, Figueiredo ML. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell Polarization within the Tumor Microenvironment Niche. *Stem Cells Int*. 2017;2017:4015039.
 160. Papait A, Stefani FR, Cargnoni A, Magatti M, Parolini O, Silini AR. The Multifaceted Roles of MSCs in the Tumor Microenvironment: Interactions With Immune Cells and Exploitation for Therapy. *Front Cell Dev Biol [Internet]*. 2020 [zitiert 18. Januar 2022];8. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.00447>
 161. Harrell CR, Volarevic A, Djonov VG, Jovicic N, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cell: A Friend or Foe in Anti-Tumor Immunity. *Int J Mol Sci*. 18. November 2021;22(22):12429.
 162. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLOS ONE*. 26. April 2010;5(4):e10088.
 163. Liang W, Chen X, Zhang S, Fang J, Chen M, Xu Y, u. a. Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in tumor growth: focusing on MSC-derived cytokines. *Cell Mol Biol Lett*. 20. Januar 2021;26(1):3.
 164. Bliss SA, Sinha G, Sandiford OA, Williams LM, Engelberth DJ, Guiro K, u. a. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Stimulate Cycling Quiescence and Early Breast Cancer Dormancy in Bone Marrow. *Cancer Res*. 1. Oktober 2016;76(19):5832–44.
 165. Teng IW, Hou PC, Lee KD, Chu PY, Yeh KT, Jin VX, u. a. Targeted Methylation of Two Tumor Suppressor Genes Is Sufficient to Transform Mesenchymal Stem Cells into Cancer Stem/Initiating Cells. *Cancer Res*. 1. Juli 2011;71(13):4653–63.
 166. Skolekova S, Matuskova M, Bohac M, Toro L, Durinikova E, Tyciakova S, u. a. Cisplatin-induced mesenchymal stromal cells-mediated mechanism contributing to decreased antitumor effect in breast cancer cells. *Cell Commun Signal*. 12. Januar 2016;14(1):4.
 167. Sugrue T, Brown JAL, Lowndes NF, Ceredig R. Multiple Facets of the DNA Damage Response Contribute to the Radioresistance of Mouse Mesenchymal Stromal Cell Lines. *STEM CELLS*. 2013;31(1):137–45.
 168. Yang L, Zhang Y, Cheng L, Yue D, Ma J, Zhao D, u. a. Mesenchymal Stem Cells Engineered to Secrete Pigment Epithelium-Derived Factor Inhibit Tumor Metastasis and the Formation of Malignant Ascites in a Murine Colorectal Peritoneal Carcinomatosis Model. *Hum Gene Ther*. 11. Januar 2016;27(3):267–77.
 169. Cai C, Hou L, Zhang J, Zhao D, Wang Z, Hu H, u. a. The Inhibitory Effect of

- Mesenchymal Stem Cells with rAd-NK4 on Liver Cancer. *Appl Biochem Biotechnol.* 1. September 2017;183(1):444–59.
170. Ohlsson LB, Varas L, Kjellman C, Edvardsen K, Lindvall M. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp Mol Pathol.* Dezember 2003;75(3):248–55.
171. Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood.* 30. April 2009;113(18):4197–205.
172. Ho IAW, Toh HC, Ng WH, Teo YL, Guo CM, Hui KM, u. a. Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Suppress Human Glioma Growth Through Inhibition of Angiogenesis. *STEM CELLS.* 1. Januar 2013;31(1):146–55.
173. Whiteside TL. Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment. *Semin Immunol.* Februar 2018;35:69–79.
174. Lee JK, Park SR, Jung BK, Jeon YK, Lee YS, Kim MK, u. a. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress Angiogenesis by Down-Regulating VEGF Expression in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE [Internet].* 31. Dezember 2013 [zitiert 5. Mai 2020];8(12). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3877259/>
175. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, u. a. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med.* 15. Mai 2006;203(5):1235–47.
176. Qiao L, Xu Z li, Zhao T jun, Ye L hong, Zhang X dong. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett.* 28. September 2008;269(1):67–77.
177. Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, u. a. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res.* April 2008;18(4):500–7.
178. Lu Y rong, Yuan Y, Wang X jie, Wei L ling, Chen Y nan, Cong C, u. a. The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther.* 4. Februar 2008;7(2):245–51.
179. Cousin B, Ravet E, Poglio S, De Toni F, Bertuzzi M, Lulka H, u. a. Adult Stromal Cells Derived from Human Adipose Tissue Provoke Pancreatic Cancer Cell Death both In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE [Internet].* 17. Juli 2009 [zitiert 30. Mai 2020];4(7). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2707007/>
180. Yulyana Y, Ho IAW, Sia KC, Newman JP, Toh XY, Endaya BB, u. a. Paracrine Factors of Human Fetal MSCs Inhibit Liver Cancer Growth Through Reduced Activation of IGF-1R/PI3K/Akt Signaling. *Mol Ther.* 1. April 2015;23(4):746–56.
181. Attar-Schneider O, Zismanov V, Drucker L, Gottfried M. Secretome of human bone marrow mesenchymal stem cells: an emerging player in lung cancer progression and mechanisms of translation initiation. *Tumor Biol.* 1. April 2016;37(4):4755–65.
182. Broekman W, Khedoe PPSJ, Schepers K, Roelofs H, Stolk J, Hiemstra PS. Mesenchymal stromal cells: a novel therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease? *Thorax.* Juni 2018;73(6):565–74.
183. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol.* 30. April 2012;5:19.
184. Suma GN, Arora MP, Lakhanpal M. Stem cell therapy: A novel treatment approach for oral mucosal lesions. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015;7(1):2–8.
185. Wang Y, Yi H, Song Y. The safety of MSC therapy over the past 15 years: a meta-analysis. *Stem Cell Res Ther.* Oktober 2021;12(1):545.
186. Oggu GS, Sasikumar S, Reddy N, Ella KKR, Rao ChM, Bokara KK. Gene Delivery

- Approaches for Mesenchymal Stem Cell Therapy: Strategies to Increase Efficiency and Specificity. *Stem Cell Rev Rep*. 1. Dezember 2017;13(6):725–40.
187. Gao Z, Zhang L, Hu J, Sun Y. Mesenchymal stem cells: a potential targeted-delivery vehicle for anti-cancer drug loaded nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 1. Februar 2013;9(2):174–84.
 188. Mohr A, Zwacka R. The future of mesenchymal stem cell-based therapeutic approaches for cancer – From cells to ghosts. *Cancer Lett*. 1. Februar 2018;414:239–49.
 189. Mohammadi M, Jaafari MR, Mirzaei HR, Mirzaei H. Mesenchymal stem cell: a new horizon in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*. September 2016;23(9):285–6.
 190. Jackson BC, Nebert DW, Vasiliou V. Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Hum Genomics*. 1. Februar 2010;4(3):194–201.
 191. Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem*. 30. Juli 1999;274(31):21491–4.
 192. Puente XS, Sánchez LM, Overall CM, López-Otín C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet*. Juli 2003;4(7):544–58.
 193. Djuric T, Zivkovic M. Overview of MMP Biology and Gene Associations in Human Diseases. *Role Matrix Met Hum Body Pathol* [Internet]. 20. Dezember 2017 [zitiert 19. September 2020]; Verfügbar unter: <https://www.intechopen.com/books/the-role-of-matrix-metalloproteinase-in-human-body-pathologies/overview-of-mmp-biology-and-gene-associations-in-human-diseases>
 194. Girigoswami K, Saini D, Girigoswami A. Extracellular Matrix Remodeling and Development of Cancer. *Stem Cell Rev Rep*. 1. Juni 2021;17(3):739–47.
 195. Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. *Genes Dis*. 1. März 2015;2(1):26–34.
 196. Jacobsen JA, Major Jourden JL, Miller MT, Cohen SM. To bind zinc or not to bind zinc: An examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 1. Januar 2010;1803(1):72–94.
 197. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem*. 17. März 1995;270(11):5872–6.
 198. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 15. Februar 2006;69(3):562–73.
 199. Gonzalez-Avila G, Sommer B, García-Hernández AA, Ramos C. Matrix Metalloproteinases' Role in Tumor Microenvironment. In: Birbrair A, Herausgeber. *Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Components – Part A* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. S. 97–131. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-030-40146-7_5
 200. Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 1. April 1999;55(4):639–52.
 201. Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 1. Januar 2010;1803(1):3–19.
 202. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 7. Februar 2001;93(3):178–93.
 203. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*. 2007;211(1):19–26.
 204. Pratap J, Javed A, Languino LR, Wijnen AJ van, Stein JL, Stein GS, u. a. The Runx2

- Osteogenic Transcription Factor Regulates Matrix Metalloproteinase 9 in Bone Metastatic Cancer Cells and Controls Cell Invasion. *Mol Cell Biol.* 1. Oktober 2005;25(19):8581–91.
205. Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, Torres-Romero JC, Arana-Argáez V, Lara-Riegos J, u. a. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2019 [zitiert 18. Januar 2022];9. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.01370>
206. Nagase H, Enghild JJ, Suzuki K, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry.* 19. Juni 1990;29(24):5783–9.
207. Vandooren J, Steen PEV den, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1. Mai 2013;48(3):222–72.
208. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem.* 25. Februar 1992;267(6):3581–4.
209. Fridman R, Toth M, Peña D, Mobashery S. Activation of Progelatinase B (MMP-9) by Gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* 15. Juni 1995;55(12):2548–55.
210. Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS. Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem.* 15. Oktober 1990;265(29):17401–4.
211. Higashi S, Miyazaki K. Identification of a Region of β -Amyloid Precursor Protein Essential for Its Gelatinase A Inhibitory Activity. *J Biol Chem.* 18. April 2003;278(16):14020–8.
212. Mott JD, Thomas CL, Rosenbach MT, Takahara K, Greenspan DS, Banda MJ. Post-translational Proteolytic Processing of Procollagen C-terminal Proteinase Enhancer Releases a Metalloproteinase Inhibitor. *J Biol Chem.* 14. Januar 2000;275(2):1384–90.
213. Moses MA, Marikovsky M, Harper JW, Vogt P, Eriksson E, Klagsbrun M, u. a. Temporal study of the activity of matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during wound healing. *J Cell Biochem.* 1. März 1996;60(3):379–86.
214. Cañete-Soler R, Gui YH, Linask KK, Muschel RJ. Developmental expression of MMP-9 (gelatinase B) mRNA in mouse embryos. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* September 1995;204(1):30–40.
215. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, u. a. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell.* 1. Mai 1998;93(3):411–22.
216. Ahrens D, Koch AE, Pope RM, Stein-Picarella M, Niedbala MJ. Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* September 1996;39(9):1576–87.
217. Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, u. a. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* Oktober 1996;149(4):1241–56.
218. Theruvath TP, Jones JA, Ikonomidis JS. Matrix Metalloproteinases and Descending Aortic Aneurysms: Parity, Disparity, and Switch. *J Card Surg.* Januar 2012;27(1):81–90.
219. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer—Trials and Tribulations. *Science.* 29. März 2002;295(5564):2387–92.
220. Roeb E, Dietrich CG, Winograd R, Arndt M, Breuer B, Fass J, u. a. Activity and cellular

- origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9. *Cancer*. 15. November 2001;92(10):2680–91.
221. Woessner JF. The Matrix Metalloproteinase Family. In: Parks WC, Mecham RP, Herausgeber. *Matrix Metalloproteinases* [Internet]. San Diego: Academic Press; 1998 [zitiert 31. Mai 2020]. S. 1–14. (Biology of Extracellular Matrix). Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125450904500021>
 222. Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer*. 30. März 2019;18:63.
 223. Gobin E, Bagwell K, Wagner J, Mysona D, Sandirasegarane S, Smith N, u. a. A pan-cancer perspective of matrix metalloproteases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential. *BMC Cancer*. 14. Juni 2019;19(1):581.
 224. Zou M, Zhang C, Sun Y, Wu H, Xiao F, Gao W, u. a. Comprehensive analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Oncol*. Dezember 2021;0(0):1–11.
 225. Patil R, Mahajan A, Pradeep GL, Prakash N, Patil S, Khan SM. Expression of matrix metalloproteinase-9 in histological grades of oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP*. 2021;25(2):239–46.
 226. Mohtasham N, Babakoochi S, Shiva A, Shadman A, Kamyab-Hesari K, Shakeri MT, u. a. Immunohistochemical study of p53, Ki-67, MMP-2 and MMP-9 expression at invasive front of squamous cell and verrucous carcinoma in oral cavity. *Pathol - Res Pract*. Februar 2013;209(2):110–4.
 227. Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. Mai 2005;1755(1):37–69.
 228. Deryugina EI, Quigley JP. Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:564259.
 229. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*. 15. Januar 2000;14(2):163–76.
 230. Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev*. 1. Januar 1999;13(1):35–48.
 231. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, u. a. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*. Oktober 2002;2(4):289–300.
 232. Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures into Future Successes. *Mol Cancer Ther*. Juni 2018;17(6):1147–55.
 233. Hoeger KM. The Use of an MMP Inhibitor, Doxycycline, to Reduce Ovarian Androgen Production and Restore Normal Cycling in Women With Polycystic Ovarian Syndrome [Internet]. clinicaltrials.gov; 2015 Dez [zitiert 13. Januar 2022]. Report No.: NCT01788215. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01788215>
 234. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, Herausgeber. *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*. [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer: IARC; 2020. Verfügbar unter: <http://publications.iarc.fr/586>
 235. Eichberger J, Weber F, Spanier G, Gerken M, Schreml S, Schulz D, u. a. Loss of MMP-27 Predicts Mandibular Bone Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*. Januar 2022;14(16):4044.
 236. Hass R. Role of MSC in the Tumor Microenvironment. *Cancers*. August 2020;12(8):2107.

237. de Miranda MC, Melo MIA de, Cunha P da S, Gentilini J, Faria JAQA, Rodrigues MA, u. a. Roles of mesenchymal stromal cells in the head and neck cancer microenvironment. *Biomed Pharmacother.* Dezember 2021;144:112269.
238. Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, Anzai Y, Brizel DM, u. a. Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 1. Juli 2020;18(7):873–98.
239. Wessely A, Waltera A, Reichert TE, Stöckl S, Grässel S, Bauer RJ. Induction of ALP and MMP9 activity facilitates invasive behavior in heterogeneous human BMSC and HNSCC 3D spheroids. *FASEB J.* 2019;33(11):11884–93.
240. Rao SR, Snaith AE, Marino D, Cheng X, Lwin ST, Orriss IR, u. a. Tumour-derived alkaline phosphatase regulates tumour growth, epithelial plasticity and disease-free survival in metastatic prostate cancer. *Br J Cancer.* 17. Januar 2017;116(2):227–36.
241. Zhang D, Song Y, Li D, Liu X, Pan Y, Ding L, u. a. Cancer-associated fibroblasts promote tumor progression by lncRNA-mediated RUNX2/GDF10 signaling in oral squamous cell carcinoma. *Mol Oncol [Internet].* 2021 [zitiert 17. Januar 2022];n/a(n/a). Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1878-0261.12935>
242. Valenti MT, Serafini P, Innamorati G, Gili A, Cheri S, Bassi C, u. a. Runx2 expression: A mesenchymal stem marker for cancer. *Oncol Lett.* November 2016;12(5):4167–72.
243. Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, Gollin SM, Whiteside TL, Koch WM, u. a. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: Established models and rationale for selection. *Head Neck.* Februar 2007;29(2):163–88.
244. Heo DS, Snyderman C, Gollin SM, Pan S, Walker E, Deka R, u. a. Biology, Cytogenetics, and Sensitivity to Immunological Effector Cells of New Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Lines. *Cancer Res.* 15. September 1989;49(18):5167–75.
245. Em H, K LB, M D, I M, I SC, Fc M, u. a. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 1. Januar 2005;7(5):393–5.
246. Bedal KB, Grässel S, Oefner PJ, Reinders J, Reichert TE, Bauer R. Collagen XVI Induces Expression of MMP9 via Modulation of AP-1 Transcription Factors and Facilitates Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLOS ONE.* 23. Januar 2014;9(1):e86777.
247. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, u. a. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* Juli 2012;9(7):676–82.
248. Bioluminescent Reporters | Reporter Gene Applications | An Introduction to Reporter Genes [Internet]. [zitiert 16. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://www.promega.de/resources/guides/cell-biology/bioluminescent-reporters/>
249. Kleiner DE, Stetlerstevenson WG. Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases. *Anal Biochem.* 1. Mai 1994;218(2):325–9.
250. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, u. a. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* Oktober 1985;150(1):76–85.
251. Otieno BA, Krause CE, Rusling JF. Chapter Seven - Bioconjugation of Antibodies and Enzyme Labels onto Magnetic Beads. In: Kumar CV, Herausgeber. *Methods in Enzymology [Internet].* Academic Press; 2016 [zitiert 16. Januar 2022]. S. 135–50. (Rational Design of Enzyme-Nanomaterials; Bd. 571). Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687915006369>
252. A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med.* 1. Januar 1977;145(1):204–20.
253. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol.* 1. Oktober 2005;15(5):378–86.

254. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *PROTEOMICS*. 2010;10(9):1886–90.
255. Benton G, Kleinman HK, George J, Arnaoutova I. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *Int J Cancer*. 2011;128(8):1751–7.
256. Sherf BA, Navarro SL, Hannah RR, Wood KV. Dual-Luciferase™ Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays. :8.
257. Wong RJ, Keel SB, Glynn RJ, Varvares MA. Histological pattern of mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope*. Januar 2000;110(1):65–72.
258. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *STEM CELLS*. 2007;25(10):2648–59.
259. Tondreau T, Meuleman N, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Delforge A, Dejeneffe M, u. a. In vitro study of matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase production by mesenchymal stromal cells in response to inflammatory cytokines: the role of their migration in injured tissues. *Cytotherapy*. 1. Januar 2009;11(5):559–69.
260. Acharya S, Kale J, Rai P, Anehosur V, Hallikeri K. Serum alkaline phosphatase in oral squamous cell carcinoma and its association with clinicopathological characteristics. *South Asian J Cancer*. September 2017;6(3):125–8.
261. Deiana M, Dalle Carbonare L, Serena M, Cheri S, Parolini F, Gandini A, u. a. New Insights into the Runt Domain of RUNX2 in Melanoma Cell Proliferation and Migration. *Cells*. 20. November 2018;7(11):220.
262. Karhade AV, Thio QCBS, Kuverji M, Ogink PT, Ferrone ML, Schwab JH. Prognostic value of serum alkaline phosphatase in spinal metastatic disease. *Br J Cancer*. März 2019;120(6):640–6.
263. Chang WM, Lin YF, Su CY, Peng HY, Chang YC, Lai TC, u. a. Dysregulation of RUNX2/Activin-A Axis upon miR-376c Downregulation Promotes Lymph Node Metastasis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res*. 15. Dezember 2016;76(24):7140–50.
264. Weng J jie, Su Y. Nuclear matrix-targeting of the osteogenic factor Runx2 is essential for its recognition and activation of the alkaline phosphatase gene. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 1. März 2013;1830(3):2839–52.
265. Méry B, Rancoule C, Guy JB, Espenel S, Wozny AS, Battiston-Montagne P, u. a. Preclinical models in HNSCC: A comprehensive review. *Oral Oncol*. Februar 2017;65:51–6.
266. Grässel S, Stöckl S, Jenei-Lanzl Z. Isolation, culture, and osteogenic/chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012;879:203–67.
267. Hatlapatka T, Moretti P, Lavrentieva A, Hass R, Marquardt N, Jacobs R, u. a. Optimization of culture conditions for the expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem or stromal cell-like cells using xeno-free culture conditions. *Tissue Eng Part C Methods*. April 2011;17(4):485–93.
268. Choi MR, Kim HY, Park JY, Lee TY, Baik CS, Chai YG, u. a. Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 19. März 2010;472(2):94–8.
269. Chitturi Suryaprakash RT, Kujan O, Shearston K, Farah CS. Three-Dimensional Cell Culture Models to Investigate Oral Carcinogenesis: A Scoping Review. *Int J Mol Sci*. Januar 2020;21(24):9520.
270. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FDP. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*. Januar 2015;230(1):16–26.

271. Hutmacher DW. Biomaterials offer cancer research the third dimension. *Nat Mater*. Februar 2010;9(2):90–3.
272. National Library of Medicine. PubMed-Datenbanksuche „3D tumor model“ [Internet]. [zitiert 15. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=3D+tumor+model>
273. Jensen C, Shay C, Teng Y. The New Frontier of Three-Dimensional Culture Models to Scale-Up Cancer Research. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2022;2343:3–18.
274. Xu J, Qi G, Wang W, Sun XS. Advances in 3D peptide hydrogel models in cancer research. *Npj Sci Food*. 1. Juni 2021;5(1):14.
275. Kamatar A, Gunay G, Acar H. Natural and Synthetic Biomaterials for Engineering Multicellular Tumor Spheroids. *Polymers*. November 2020;12(11):2506.
276. Tibbitt MW, Anseth KS. Dynamic Microenvironments: The Fourth Dimension. *Sci Transl Med* [Internet]. 14. November 2012 [zitiert 19. Januar 2022]; Verfügbar unter: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/scitranslmed.3004804>
277. Corrò C, Novellademunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1. Juli 2020;319(1):C151–65.
278. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci*. Januar 2021;22(22):12200.
279. Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. Dezember 2019;8(12):1620.
280. Curcio E, Salerno S, Barbieri G, De Bartolo L, Drioli E, Bader A. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials*. Dezember 2007;28(36):5487–97.
281. PerkinElmer. CellCarrier-96 Spheroid ULA /CS-6055330-6055334|PerkinElmer [Internet]. [zitiert 19. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://www.perkinelmer.com/product/cellcarrier-96-spheroid-ula-cs-10x1-6055330>
282. Nunes AS, Barros AS, Costa EC, Moreira AF, Correia IJ. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnol Bioeng*. 2019;116(1):206–26.
283. Murphy KC, Hung BP, Browne-Bourne S, Zhou D, Yeung J, Genetos DC, u. a. Measurement of oxygen tension within mesenchymal stem cell spheroids. *J R Soc Interface*. 28. Februar 2017;14(127):20160851.
284. Rufaihah AJ, Cheyyatraivendran S, Mazlan MDM, Lim K, Chong MSK, Mattar CNZ, u. a. The Effect of Scaffold Modulus on the Morphology and Remodeling of Fetal Mesenchymal Stem Cells. *Front Physiol* [Internet]. 2018 [zitiert 19. Januar 2022];9. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.01555>
285. Riffle S, Hegde RS. Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. *J Exp Clin Cancer Res*. 3. August 2017;36(1):102.
286. Brennen WN, Chen S, Denmeade SR, Isaacs JT. Quantification of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) at sites of human prostate cancer. *Oncotarget*. Januar 2013;4(1):106–17.
287. Poggi A, Varesano S, Zocchi MR. How to Hit Mesenchymal Stromal Cells and Make the Tumor Microenvironment Immunostimulant Rather Than Immunosuppressive. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [zitiert 19. Januar 2022];9. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00262>
288. Kanazawa T, Nishino H, Hasegawa M, Ohta Y, Iino Y, Ichimura K, u. a. Interleukin-6 directly influences proliferation and invasion potential of head and neck cancer cells. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. Juli 2007;264(7):815–21.

289. Kothari P, Pestana R, Mesraoua R, Elchaki R, Khan KMF, Dannenberg AJ, u. a. IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. Januar 2014;192(1):349–57.
290. Sun W, Liu DB, Li WW, Zhang LL, Long GX, Wang JF, u. a. Interleukin-6 promotes the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cell lines and upregulates the expression of MMP-2 and MMP-9. *Int J Oncol*. 1. Mai 2014;44(5):1551–60.
291. Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, Zhang MC, Guo D, Urbanski SJ, u. a. Interleukin-6 Regulation of Matrix Metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP-1) Expression in Malignant Non-Hodgkin's Lymphomas. *Blood*. 15. September 1999;94(6):2080–9.
292. Jimenez L, Jayakar SK, Ow TJ, Segall JE. Mechanisms of Invasion in Head and Neck Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. November 2015;139(11):1334–48.
293. Ji N, Yu JW, Ni XC, Wu JG, Wang SL, Jiang BJ. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells increase drug resistance in CD133-expressing gastric cancer cells by regulating the PI3K/AKT pathway. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. November 2016;37(11):14637–51.
294. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med*. 1. Januar 1989;169(1):333–8.
295. Greiner Bio-One. Zellkultureinsätze ThinCert® | Greiner Bio-One [Internet]. [zitiert 20. Januar 2022]. Verfügbar unter:
https://shop.gbo.com/de/germany/products/bioscience/covid-19/0110_9000_0075/
296. Wessely A. Der Einfluss von humanen mesenchymalen Stammzellen auf die Expression und Funktion tumorassoziierter Marker in 2D- und 3D-Zellkultur, unveröffentlicht [Masterarbeit]. Universität Regensburg; 2016.
297. Carraro DM, Elias EV, Andrade VP. Ductal carcinoma in situ of the breast: morphological and molecular features implicated in progression. *Biosci Rep*. 17. Januar 2014;34(1):e00090.
298. Chang J, Chaudhuri O. Beyond proteases: Basement membrane mechanics and cancer invasion. *J Cell Biol*. 17. Juli 2019;218(8):2456–69.
299. Tamamura R, Nagatsuka H, Siar CH, Katase N, Naito I, Sado Y, u. a. Comparative analysis of basal lamina type IV collagen α chains, matrix metalloproteinases-2 and -9 expressions in oral dysplasia and invasive carcinoma. *Acta Histochem*. 1. März 2013;115(2):113–9.
300. Carter M, Shieh J. Chapter 15 - Biochemical Assays and Intracellular Signaling. In: Carter M, Shieh J, Herausgeber. *Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [zitiert 19. Januar 2022]. S. 311–43. Verfügbar unter:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128005118000150>
301. Kim J, Koo BK, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Oktober 2020;21(10):571–84.
302. Schmidt M, Scholz CJ, Polednik C, Roller J. Spheroid-based 3-dimensional culture models: Gene expression and functionality in head and neck cancer. *Oncol Rep*. April 2016;35(4):2431–40.
303. Cheng L, Ziegelhoffer PR, Yang NS. In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15. Mai 1993;90(10):4455–9.
304. Bou-Ghannam S, Kim K, Grainger DW, Okano T. 3D cell sheet structure augments mesenchymal stem cell cytokine production. *Sci Rep*. 14. April 2021;11(1):8170.

305. Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, Ploegert S, Demougin P, Heberer M, u. a. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: A high density oligonucleotide array study. *J Cell Physiol.* 2005;204(2):522–31.
306. Melissaridou S, Wiechec E, Magan M, Jain MV, Chung MK, Farnebo L, u. a. The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell Int.* 2019;19:16.
307. Heid J, Affolter A, Jakob Y, Kern J, Rotter N, Tenschert E, u. a. 3D cell culture alters signal transduction and drug response in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 1. Juni 2022;23(6):1–7.
308. Gu JJ, Hoj J, Rouse C, Pendergast AM. Mesenchymal stem cells promote metastasis through activation of an ABL-MMP9 signaling axis in lung cancer cells. *PLOS ONE.* 29. Oktober 2020;15(10):e0241423.
309. Yang J, Min KW, Kim DH, Son BK, Moon KM, Wi YC, u. a. High TNFRSF12A level associated with MMP-9 overexpression is linked to poor prognosis in breast cancer: Gene set enrichment analysis and validation in large-scale cohorts. *PLOS ONE.* 24. August 2018;13(8):e0202113.
310. Niu H, Li F, Wang Q, Ye Z, Chen Q, Lin Y. High expression level of MMP9 is associated with poor prognosis in patients with clear cell renal carcinoma. *PeerJ.* 4. Juli 2018;6:e5050.
311. Zhou W, Yu X, Sun S, Zhang X, Yang W, Zhang J, u. a. Increased expression of MMP-2 and MMP-9 indicates poor prognosis in glioma recurrence. *Biomed Pharmacother.* Oktober 2019;118:109369.
312. Ruokolainen H, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Potential Marker for Prognosis. *Clin Cancer Res.* 1. Mai 2004;10(9):3110–6.
313. Smriti K, Ray M, Chatterjee T, Shenoy RP, Gadicherla S, Pentapati KC, u. a. Salivary MMP-9 as a Biomarker for the Diagnosis of Oral Potentially Malignant Disorders and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2020;21(1):233–8.
314. Liu T, Zhou L, Li D, Andl T, Zhang Y. Cancer-Associated Fibroblasts Build and Secure the Tumor Microenvironment. *Front Cell Dev Biol [Internet].* 2019 [zitiert 19. Januar 2022];7. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2019.00060>
315. Van Kilsdonk JWJ, Bergers M, Van Kempen LCLT, Schalkwijk J, Swart GWM. Keratinocytes drive melanoma invasion in a reconstructed skin model. *Melanoma Res.* Oktober 2010;20(5):372–80.
316. Javed A, Gutierrez S, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, u. a. Multiple Cbfa/AML Sites in the Rat Osteocalcin Promoter Are Required for Basal and Vitamin D-Responsive Transcription and Contribute to Chromatin Organization. *Mol Cell Biol.* November 1999;19(11):7491–500.
317. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res.* 1. Februar 2011;343(2):289–302.
318. Fujita T, Azuma Y, Fukuyama R, Hattori Y, Yoshida C, Koida M, u. a. Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. *J Cell Biol.* 5. Juli 2004;166(1):85–95.
319. Dalle Carbonare L, Innamorati G, Valenti MT. Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. *Stem Cell Rev Rep.* September 2012;8(3):891–7.
320. Kayed H, Jiang X, Keleg S, Jesnowski R, Giese T, Berger MR, u. a. Regulation and functional role of the Runt-related transcription factor-2 in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 22. Oktober 2007;97(8):1106–15.
321. Martin JW, Zielenska M, Stein GS, van Wijnen AJ, Squire JA. The Role of RUNX2 in

- Osteosarcoma Oncogenesis. Sarcoma [Internet]. 2011 [zitiert 8. April 2020];2011. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3005824/>
322. Li W, Xu S, Lin S, Zhao W. Overexpression of Runt-Related Transcription Factor-2 Is Associated with Advanced Tumor Progression and Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2012 [zitiert 8. April 2020];2012. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3475129/>
323. Wang ZQ, Keita M, Bachvarova M, Gobeil S, Morin C, Plante M, u. a. Inhibition of RUNX2 Transcriptional Activity Blocks the Proliferation, Migration and Invasion of Epithelial Ovarian Carcinoma Cells. *PLOS ONE*. 10. April 2013;8(10):e74384.
324. Owens TW, Rogers RL, Best S, Ledger A, Mooney AM, Ferguson A, u. a. Runx2 is a novel regulator of mammary epithelial cell fate in development and breast cancer. *Cancer Res*. 15. September 2014;74(18):5277–86.
325. Chang WM, Lin YF, Su CY, Peng HY, Chang YC, Hsiao JR, u. a. Parathyroid Hormone-Like Hormone is a Poor Prognosis Marker of Head and Neck Cancer and Promotes Cell Growth via RUNX2 Regulation. *Sci Rep* [Internet]. 25. Januar 2017 [zitiert 8. April 2020];7. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5264159/>
326. Li ZH, Liao W, Zhao Q, Huan T, Feng P, Wei X, u. a. Effect of Cbfa1 on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells under hypoxia condition. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(3):540–8.
327. Yan C, Wang H, Boyd DD. KiSS-1 Represses 92-kDa Type IV Collagenase Expression by Down-regulating NF- κ B Binding to the Promoter as a Consequence of I κ B α -induced Block of p65/p50 Nuclear Translocation *. *J Biol Chem*. 12. Januar 2001;276(2):1164–72.
328. Takagi S, Simizu S, Osada H. RECK Negatively Regulates Matrix Metalloproteinase-9 Transcription. *Cancer Res*. 12. Februar 2009;69(4):1502–8.
329. Xia B, Hong T, He X, Hu X, Gao Y. A circular RNA derived from MMP9 facilitates oral squamous cell carcinoma metastasis through regulation of MMP9 mRNA stability. *Cell Transplant*. Dezember 2019;28(12):1614–23.
330. de Carvalho TG, Pellenz FM, Laureano A, da Rocha Silla LM, Giugliani R, Baldo G, u. a. A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett*. 1. März 2018;40(3):617–22.
331. Wang W, Xu X, Li Z, Lendlein A, Ma N. Genetic engineering of mesenchymal stem cells by non-viral gene delivery. *Clin Hemorheol Microcirc*. 1. Januar 2014;58(1):19–48.
332. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*. August 2014;15(8):541–55.
333. Tecrea. Nanocin PLASMID [Internet]. Tecrea. [zitiert 19. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://www.tecrea.com/product/nanocin-plasmid/>
334. Kelly AM, Plautz SA, Zempeni J, Pannier AK. Glucocorticoid Cell Priming Enhances Transfection Outcomes in Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Mol Ther*. 1. Februar 2016;24(2):331–41.
335. Hoare M, Greiser U, Schu S, Mashayekhi K, Aydogan E, Murphy M, u. a. Enhanced lipoplex-mediated gene expression in mesenchymal stem cells using reiterated nuclear localization sequence peptides. *J Gene Med*. 2010;12(2):207–18.
336. Mangraviti A, Tzeng SY, Gullotti D, Kozielski KL, Kim JE, Seng M, u. a. Non-virally engineered human adipose mesenchymal stem cells produce BMP4, target brain tumors, and extend survival. *Biomaterials*. 1. September 2016;100:53–66.
337. Qadan MA, Piuze NS, Boehm C, Bova W, Moos M, Midura RJ, u. a. Variation in primary and culture-expanded cells derived from connective tissue progenitors in human bone marrow space, bone trabecular surface and adipose tissue. *Cytherapy*. März 2018;20(3):343–60.

338. Yang Y, Wang X, Hu X, Kawazoe N, Yang Y, Chen G. Influence of Cell Morphology on Mesenchymal Stem Cell Transfection. *ACS Appl Mater Interfaces*. 16. Januar 2019;11(2):1932–41.
339. Madeira C, Mendes RD, Ribeiro SC, Boura JS, Aires-Barros MR, da Silva CL, u. a. Nonviral Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells Using Cationic Liposomes for Gene and Cell Therapy. *J Biomed Biotechnol*. 24. Juni 2010;2010:e735349.
340. Peister A, Mellad JA, Wang M, Tucker HA, Prockop DJ. Stable transfection of MSCs by electroporation. *Gene Ther*. Januar 2004;11(2):224–8.
341. Aslan H, Zilberman Y, Arbeli V, Sheyn D, Matan Y, Liebergall M, u. a. Nucleofection-Based Ex Vivo Nonviral Gene Delivery to Human Stem Cells as a Platform for Tissue Regeneration. *Tissue Eng*. 1. April 2006;12(4):877–89.
342. Nakashima S, Matsuyama Y, Nitta A, Sakai Y, Ishiguro N. Highly efficient transfection of human marrow stromal cells by nucleofection. *Transplant Proc*. Juni 2005;37(5):2290–2.
343. Stewart MP, Langer R, Jensen KF. Intracellular Delivery by Membrane Disruption: Mechanisms, Strategies, and Concepts. *Chem Rev*. 22. August 2018;118(16):7409–531.
344. UniProt. UniProtKB - P14780 (MMP9_HUMAN) [Internet]. [zitiert 15. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://www.uniprot.org/uniprot/P14780>
345. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*. 8. Januar 2021;49(D1):D480–9.
346. Howard EW, Banda MJ. Binding of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 to two distinct sites on human 72-kDa gelatinase. Identification of a stabilization site. *J Biol Chem*. 25. September 1991;266(27):17972–7.
347. UniProt. UniProtKB - P08253 (MMP2_HUMAN) [Internet]. [zitiert 15. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://www.uniprot.org/uniprot/P08253>
348. Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, u. a. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*. Dezember 2007;9(12):1392–400.
349. Eatemadi A, Aiyelabegan HT, Negahdari B, Mazlomi MA, Daraee H, Daraee N, u. a. Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment. *Biomed Pharmacother*. 1. Februar 2017;86:221–31.
350. Jacob A, Prekeris R. The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2015 [zitiert 19. Januar 2022];3. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2015.00004>
351. Miguel AFP, Mello FW, Melo G, Rivero ERC. Association between immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases and metastasis in oral squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2020;42(3):569–84.
352. Andisheh-Tadbir A, Mardani M, Pourshahidi S, Nezarati K, Bahadori P. Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 expression in oral squamous cell carcinoma and its association with angiogenesis. *J Clin Exp Dent*. 1. April 2016;8(2):e130–5.
353. Salo S, Bitu C, Merkku K, Nyberg P, Bello IO, Vuoristo J, u. a. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Induce Collagen Production and Tongue Cancer Invasion. *PLOS ONE*. 21. Oktober 2013;8(10):e77692.
354. Ma G, Hou J, Qiu J, Fan J, Yang J. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) with High Expression miR-155 Affect the Proliferation and Metastasis of Oral Squamous Cell Carcinoma by Regulating Phosphatase and Tensin Homolog 12 (PTEN12). *J Biomater Tissue Eng*. 1. August 2021;11(8):1571–5.
355. Zuo JH, Zhu W, Li MY, Li XH, Yi H, Zeng GQ, u. a. Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like

- phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin. *J Cell Biochem.* September 2011;112(9):2508–17.
356. Zhu W, Huang L, Li Y, Qian H, Shan X, Yan Y, u. a. Mesenchymal stem cell-secreted soluble signaling molecules potentiate tumor growth. *Cell Cycle.* 15. September 2011;10(18):3198–207.
357. Yan X long, Fu C jiang, Chen L, Qin J hua, Zeng Q, Yuan H feng, u. a. Mesenchymal stem cells from primary breast cancer tissue promote cancer proliferation and enhance mammosphere formation partially via EGF/EGFR/Akt pathway. *Breast Cancer Res Treat.* 1. Februar 2012;132(1):153–64.
358. Kaszak I, Witkowska-Piłaszewicz O, Niewiadomska Z, Dworecka-Kaszak B, Ngosa Toka F, Jurka P. Role of Cadherins in Cancer-A Review. *Int J Mol Sci.* 15. Oktober 2020;21(20):E7624.
359. Böhrnsen F, Fricke M, Sander C, Leha A, Schliephake H, Kramer FJ. Interactions of human MSC with head and neck squamous cell carcinoma cell line PCI-13 reduce markers of epithelia-mesenchymal transition. *Clin Oral Investig.* Juni 2015;19(5):1121–8.
360. Wiegand S, Dünne AA, Müller HH, Mandic R, Barth P, Davis RK, u. a. Metaanalysis of the significance of matrix metalloproteinases for lymph node disease in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.* 1. Juli 2005;104(1):94–100.
361. You DH, Nam MJ. Effects of human epidermal growth factor gene-transfected mesenchymal stem cells on fibroblast migration and proliferation. *Cell Prolif.* August 2013;46(4):408–15.
362. Schulz D, Wetzel M, Eichberger J, Piendl G, Brockhoff G, Wege AK, u. a. Differential Expression of PD-L1 during Cell Cycle Progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* Januar 2021;22(23):13087.
363. Xing Q, Parvizi M, Lopera Higuaita M, Griffiths LG. Basement membrane proteins modulate cell migration on bovine pericardium extracellular matrix scaffold. *Sci Rep.* 25. Februar 2021;11(1):4607.
364. Chen C, Li WJ, Weng JJ, Chen ZJ, Wen YY, Deng T, u. a. Cancer-associated fibroblasts, matrix metalloproteinase-9 and lymphatic vessel density are associated with progression from adenocarcinoma *in situ* to invasive adenocarcinoma of the lung. *Oncol Lett.* 1. November 2020;20(5):1–1.
365. Dayer C, Stamenkovic I. Recruitment of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) to the Fibroblast Cell Surface by Lysyl Hydroxylase 3 (LH3) Triggers Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Activation and Fibroblast Differentiation *. *J Biol Chem.* 29. Mai 2015;290(22):13763–78.
366. Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood.* 1. Mai 2007;109(9):4055–63.
367. Clutter SD, Fortney J, Gibson LF. MMP-2 Is Required for Bone Marrow Stromal Cell Support of Chemotaxis. *Exp Hematol.* Oktober 2005;33(10):1192–200.
368. Oja S, Komulainen P, Penttilä A, Nystedt J, Korhonen M. Automated image analysis detects aging in clinical-grade mesenchymal stromal cell cultures. *Stem Cell Res Ther.* 10. Januar 2018;9(1):6.
369. Haasters F, Prall WC, Anz D, Bourquin C, Pautke C, Endres S, u. a. Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing. *J Anat.* Mai 2009;214(5):759–67.
370. Kremers GJ, Gilbert SG, Cranfill PJ, Davidson MW, Piston DW. Fluorescent proteins at a glance. *J Cell Sci.* 15. Januar 2011;124(Pt 2):157–60.

371. Melzer C, Yang Y, Hass R. Interaction of MSC with tumor cells. *Cell Commun Signal CCS* [Internet]. 8. September 2016 [zitiert 22. März 2018];14(1). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5016940/>
372. Saénz-de-Santa-María I, Celada L, Chiara MD. The Leader Position of Mesenchymal Cells Expressing N-Cadherin in the Collective Migration of Epithelial Cancer. *Cells*. März 2020;9(3):731.
373. Promega. CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) [Internet]. [zitiert 19. Januar 2022]. Verfügbar unter: https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-non_radioactive-cell-proliferation-assay-_mtt_/
374. Abcam. Resazurin Assay Kit (Cell Viability) (ab129732) | Abcam [Internet]. [zitiert 19. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://www.abcam.com/resazurin-assay-kit-cell-viability-ab129732.html>
375. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, u. a. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. Juni 1999;5(6):1369–79.
376. Hanna H, Mir LM, Andre FM. In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Res Ther*. 27. Juli 2018;9(1):203.
377. Bacci G, Picci P, Ferrari S, Orlandi M, Ruggieri P, Casadei R, u. a. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase measurements in patients with osteosarcoma treated with adjuvant or neoadjuvant chemotherapy. *Cancer*. 15. Februar 1993;71(4):1224–30.
378. Wei JS, Chung NC, Wei LL, Tzeng WF, Liu TZ, Wang JY. High-molecular-mass alkaline phosphatase as a tumor marker for colorectal cancer: comparison of two test methods. *Clin Chem*. März 1993;39(3):540–3.
379. Chicco D, Oneto L. Computational intelligence identifies alkaline phosphatase (ALP), alpha-fetoprotein (AFP), and hemoglobin levels as most predictive survival factors for hepatocellular carcinoma. *Health Informatics J*. 1. Januar 2021;27(1):1460458220984205.
380. Oremek GM, Weis A, Sapoutzis N, Sauer-Eppel H. Diagnostic value of bone and tumour markers in patients with malignant diseases. *Anticancer Res*. April 2003;23(2A):987–90.
381. Jin Y, Yuan MQ, Chen JQ, Zhang YP. Serum alkaline phosphatase predicts survival outcomes in patients with skeletal metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Clinics*. April 2015;70(4):264–72.
382. van der Kamp MF, Muntinghe FOW, Iepsma RS, Plaat BEC, van der Laan BFAM, Algassab A, u. a. Predictors for distant metastasis in head and neck cancer, with emphasis on age. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1. Januar 2021;278(1):181–90.
383. Duprez F, Berwouts D, De Neve W, Bonte K, Boterberg T, Deron P, u. a. Distant metastases in head and neck cancer. *Head Neck*. 2017;39(9):1733–43.
384. Grisanti S, Bianchi S, Locati LD, Triggiani L, Vecchio S, Bonetta A, u. a. Bone metastases from head and neck malignancies: Prognostic factors and skeletal-related events. *PLoS ONE*. 20. März 2019;14(3):e0213934.
385. Lou Z, Lin W, Zhao H, Jiao X, Wang C, Zhao H, u. a. Alkaline phosphatase downregulation promotes lung adenocarcinoma metastasis via the c-Myc/RhoA axis. *Cancer Cell Int*. 15. April 2021;21(1):217.
386. Hegde M, Karki SS, Thomas E, Kumar S, Panjamurthy K, Ranganatha SR, u. a. Novel Levamisole Derivative Induces Extrinsic Pathway of Apoptosis in Cancer Cells and Inhibits Tumor Progression in Mice. *PLOS ONE*. 9. Oktober 2012;7(9):e43632.

387. Harris H. The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. *Clin Chim Acta*. 15. Januar 1990;186(2):133–50.
388. Han J, Yong B, Luo C, Tan P, Peng T, Shen J. High serum alkaline phosphatase cooperating with MMP-9 predicts metastasis and poor prognosis in patients with primary osteosarcoma in Southern China. *World J Surg Oncol*. 15. Februar 2012;10(1):37.
389. Vallet S, Bashari MH, Fan FJ, Malvestiti S, Schneeweiss A, Wuchter P, u. a. Pre-Osteoblasts Stimulate Migration of Breast Cancer Cells via the HGF/MET Pathway. *PLOS ONE*. 3. Februar 2016;11(3):e0150507.
390. Zhou HE, He H, Wang CY, Zayzafoon M, Morrissey C, Vessella RL, u. a. Human Prostate Cancer Harbors the Stem Cell Properties of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Clin Cancer Res*. 15. April 2011;17(8):2159–69.
391. Tan CC, Li GX, Tan LD, Du X, Li XQ, He R, u. a. Breast cancer cells obtain an osteomimetic feature via epithelial-mesenchymal transition that have undergone BMP2/RUNX2 signaling pathway induction. *Oncotarget*. 29. November 2016;7(48):79688–705.
392. Knerr K, Ackermann K, Neidhart T, Pyerin W. Bone metastasis: Osteoblasts affect growth and adhesion regulons in prostate tumor cells and provoke osteomimicry. *Int J Cancer*. 2004;111(1):152–9.
393. Yang C, Pan H, Shen L. Pan-Cancer Analyses Reveal Prognostic Value of Osteomimicry Across 20 Solid Cancer Types. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2020 [zit. 20. Januar 2022];7. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2020.576269>
394. Furesi G, Rauner M, Hofbauer LC. Emerging Players in Prostate Cancer–Bone Niche Communication. *Trends Cancer*. 1. Februar 2021;7(2):112–21.
395. Awolaran O, Brooks SA, Lavender V. Breast cancer osteomimicry and its role in bone specific metastasis; an integrative, systematic review of preclinical evidence. *Breast Edinb Scotl*. Dezember 2016;30:156–71.
396. Fang C, Kang Y. Cellular plasticity in bone metastasis. *Bone*. Oktober 2020;115693.
397. Yang YHK, Ogando CR, Wang See C, Chang TY, Barabino GA. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 11. Mai 2018;9(1):131.
398. Baghaban Eslaminejad M, Bagheri F, Zomorodian E. Matrigel Enhances in vitro Bone Differentiation of Human Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *Iran J Basic Med Sci*. 1. Januar 2010;13(1):187–94.
399. Eichberger J, Schulz D, Pscheidl K, Fiedler M, Reichert TE, Bauer RJ, u. a. PD-L1 Influences Cell Spreading, Migration and Invasion in Head and Neck Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. Januar 2020;21(21):8089.

6.6 Publikation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Wessely, A., Waltera, A., Reichert, T.E., Stöckl, S., Grässel, S. and Bauer, R.J. (2019), Induction of ALP and MMP9 activity facilitates invasive behavior in heterogeneous human BMSC and HNSCC 3D spheroids. *The FASEB Journal*, 33: 11884-11893. <https://doi.org/10.1096/fj.201900925R>

7 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei:

Meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn Prof. Dr. Richard Bauer, für die Bereitstellung des Themas, die umfassende und strukturierte Betreuung, sein offenes Ohr für jegliche Fragen, seinen Pragmatismus und seinen Sinn für Humor.

Frau Prof. Dr. Susanne Grässel und dem Team der Experimentellen Orthopädie, dafür, dass so großzügigerweise die Knochenmarksstammzellen zur Verfügung gestellt wurden. Zudem gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Susanne Grässel dafür, dass sie sich bereit erklärt hat, meine Arbeit als Zweitgutachterin zu bewerten.

Frau Brigitta Hauer, für die hilfreichen Tipps, die geduldige Einarbeitung und die großartige Zeit im Labor, und auch außerhalb des Labors. Gitta, ich habe die Zeit mit dir genossen.

Frau Dr. Daniela Schulz und allen Doktoranden der Arbeitsgruppe Bauer für den regen Austausch und die herzliche Atmosphäre.

Meiner Familie und meinen Freunden für die ständige Unterstützung und Liebe.